

# UNIVERSITÄT GREIFSWALD

Wissen lockt. Seit 1456



Aus dem Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung: Molekulare Genetik und Infektionsbiologie

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Sven Hammerschmidt)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät in Kooperation mit der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Untersuchungen zur Immunantwort gegen potenzielle Vakzinkandidaten  
von *Streptococcus pneumoniae***

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2018

vorgelegt von:

Sidney Werner

geb.:19.08.1992

in Meiningen

Dekan: **Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich**

1. Gutachter: **Herr Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt**

2. Gutachter: **Herr Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer**

Tag der Disputation: **05.10.2022**

*Meiner Familie gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Streptococcus pneumoniae</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 MetQ, DacB, PnrA und PsaA sind hochkonservierte Lipoproteine von</b> .....	<b>3</b>
<b>Streptococcus pneumoniae</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Funktion, Biosynthese und Modifikation von Lipoproteinen .....	3
1.2.2 MetQ ( <i>sp_0149</i> ) – Substratbindungsprotein eines Methionin-ABC-Transporters .....	4
1.2.3 DacB ( <i>sp_0629</i> ) L,D-Carboxypeptidase.....	5
1.2.4 PnrA ( <i>sp_0845</i> ) Substratbindungsprotein eines Nukleosid ABC Transporters .....	6
1.2.5 PsaA ( <i>sp_1650</i> ) Substratbindungsprotein eines Mangan (Mn <sup>2+</sup> ) ABC Transporters .....	7
<b>1.3 TLR2 vermittelte Immunantwort von Makrophagen auf S. pneumoniae Lipoproteine</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Materialien</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Chemikalien</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 Monozyten-Stimulanzen</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 Antibiotika</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4 Enzyme</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5 Nährmedien</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6 Geräte</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7 Molekularbiologische Kits</b> .....	<b>15</b>
<b>2.8 Eukaryotische Zellen</b> .....	<b>15</b>
<b>2.9 Bakterienstämme</b> .....	<b>15</b>
<b>2.10 Oligonukleotide</b> .....	<b>16</b>
<b>2.11 Plasmide</b> .....	<b>16</b>
<b>2.12 Antikörper</b> .....	<b>17</b>
<b>2.13 Verbrauchsgegenstände/ Materialien</b> .....	<b>18</b>
<b>3. Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1.1 Polymeraseketten-Reaktion (PCR – Polymerase chain reaction) .....	20
3.1.2 Kolonie PCR.....	21
3.1.3 DNA Agarose-Gelelektrophorese .....	22
3.1.4 Reinigung amplifizierter DNA aus PCR-Ansätzen.....	23
3.1.5 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	24
3.1.6 Restriktionsendonukleasen-Verdau .....	24
3.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gel .....	25
3.1.8 Ligation .....	25
3.1.9 Sequenzierung klonierter Gene .....	27
<b>3.2 Proteinanalytische Methoden</b> .....	<b>27</b>

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleinsäuren mittels NanoDrop.....	27
3.2.2 Heterologe Expression von MetQ, DacB, PnrA und PsaA in ClearColi® BL21(DE3) .....	28
3.2.3 Proteinauftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	29
3.2.4 Färbemethoden zur Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen .....	30
3.2.5 Western Blot Analyse .....	31
3.2.6 Reinigung der His <sub>6</sub> – getaggtten Proteine .....	32
3.2.7 Umpufferung von gelösten Proteinen mittels Dialyse .....	33
3.2.8 ELISA .....	34
<b>3.3 Mikrobiologische - und zellbiologische Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> ClearColi® BL21 (DE3) Zellen .....	35
3.3.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit rekombinanten Plasmiden .....	35
3.3.3 Isolation von PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) .....	36
3.3.4 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen-Subpopulationen (M1, M2a) .....	38
3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie .....	38
3.3.6 Stimulation differenzierter M1 und M2a Makrophagen mit Proteinen .....	40
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1. Heterologe Expression der lipidierten und nicht-lipidierten Proteine	
MetQ, DacB, PnrA und PsaA in <i>E. coli</i> .....	41
4.2 Differenzierung von humanen Blut-Monozyten zu M1- Makophagen	
und M2a-Makrophagen .....	46
4.3 Von M1 und M2a Makrophagen vermittelte Immunantwort gegen lipidierte	
und nicht-lipidierten Pneumokokken-Proteine .....	48
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>59</b>
1. Proteinreinigung/Chromatogramme .....	60
2. Plasmidkarten .....	64
2.1 pET28TEV Plasmid .....	64
2.2 pETlip3 Plasmid.....	64
3. Sequenzierungsergebnisse .....	65
3.1 Sequenzierungsergebnis pET28TEV (pTP1) <i>dacB</i> .....	65
3.2 Sequenzierungsergebnis pETlip3 <i>metQ</i> .....	66
4. Berechnete Cytokinkonzentrationen .....	67
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* (ugs. Pneumokokkus) befindet sich laut WHO unter den Top 12 der gefährlichsten Krankheitserreger für die Menschheit (WHO, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics; <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>). Jährlich sterben etwa 826.000 Kinder und 600.000 – 800.000 Erwachsene an den Folgen von Pneumokokken-Infektionen (Becker-Dreps et al. 2017; Muley et al. 2017).

Das ovale, Gram-positive Bakterium produziert eine Polysaccharid-Kapsel und tritt meist in Paaren (Diplokokken) oder kurzen Ketten auf. *S. pneumoniae* stellt einen humanspezifischen, extrazellulären Kommensalen des oberen respiratorischen Traktes dar. Bei intaktem Immunsystem kommt es meist zu einer asymptomatischen Kolonisation der Schleimhäute durch das Bakterium (Henriques-Normark und Tuomanen 2013; Aliberti et al. 2014). Diese Besiedlung findet im frühen Kindesalter, meist bereits vor dem zweiten Lebensjahr statt. Da *S. pneumoniae* kein anderes natürliches Habitat außer dem Menschen besitzt, ist die Übertragung von Person zu Person essentiell für die Kolonisation (Feldman und Anderson 2016; Song et al. 2013).

Die unterschiedlich aufgebaute Polysaccharidkapsel, welche den Hauptvirulenzfaktor von *S. pneumoniae* darstellt, lässt eine Einteilung des Bakteriums in > 94 Kapselserotypen zu (Song et al. 2013). Die Kapsel befähigt den Erreger unter oft ungeklärten Umständen, bei Risikogruppen und supprimiertem Immunsystem verschiedene Krankheitsbilder auszulösen. Unterschieden wird hierbei zwischen nicht-invasiven und invasiven Infektionen. Die häufigeren nicht-invasiven bzw. lokal begrenzten Infektionen stellen Mittelohrentzündungen (Otitis media) und Nasennebenhöhlenentzündungen (Sinusitis) dar. Invasive Infektionen werden als IPD „invasive pneumococcal disease“ (invasive Pneumokokken Erkrankung) bezeichnet. Dazu zählen Hirnhautentzündungen (Meningitis) und die Dissemination der Bakterien in die Blutbahn (Bakteriämie) (Feldman und Anderson 2016). Letztere stellen sehr schwere und oftmals lebensbedrohliche systemische Erkrankungen dar. Die Lungenentzündung (Pneumonie) kann sowohl nicht-invasiv als auch invasiv verlaufen, je nachdem, ob *S. pneumoniae* durch Schädigung des Lungengewebes Anschluss an

das Blutgefäßsystem gewinnt (Feldman und Anderson 2016). Besonders Kinder unter 5 Jahren und ältere Erwachsene über 65 Jahren, sowie Personen mit Vorerkrankungen und immunsupprimierte Patienten sind besonders anfällig für Pneumokokken-assoziierte Erkrankungen. Der ältere und durch Vorerkrankungen belastete Teil der Bevölkerung ist immer häufiger auf Pflegeheim- und Krankenhausaufenthalte angewiesen. Gerade diese hospitalisierten und oft immobilen Menschen sind durch invasive Pneumokokken-Erkrankungen bedroht (Örtqvist et al. 2005). In diesem Zusammenhang stellt die zunehmende Antibiotikaresistenz verschiedener Pneumokokken-Serotypen die Therapie vor immer größere Probleme (Örtqvist et al. 2005; Feldman und Anderson 2016; Drijkoningen und Rohde 2014).

Die Prävention hat daher einen sehr hohen Stellenwert. Mittels Impfungen soll ein wirksamer Schutz gegen Pneumokokken-Erkrankungen aufgebaut werden. Zwei Klassen an Impfstoffen stehen heute zur Verfügung: 1) PPSV23, ein 23 Serotypen abdeckender Pneumokokken Polysaccharid Impfstoff und 2) PCV7/13, ein 7 bzw. 13 Serotypen abdeckender Pneumokokken-Konjugat-Impfstoff. Letztere wurden entwickelt, um Kleinkinder unter 2 Jahren immunisieren zu können, da Polysaccharid-Impfstoffe allein im jungen Immunsystem keine ausreichende Immunantwort und damit verbunden keinen wirksamen Schutz hervorrufen können. PCV13 vermittelt hierbei Immunität gegen die Serotypen 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F (Schulz und Hammerschmidt 2013; Daniels et al. 2016).

Die aktuell verfügbaren Impfstoffe generieren einen Kapselserotyp-abhängigen Schutz sowohl vor nicht-invasiven, als auch vor invasiven Pneumokokken-Erkrankungen. Andere Serotypen können jedoch den Nasen-Rachenraum weiterhin kolonisieren, was die Voraussetzung für schwere Infektionen durch diese Serotypen darstellt. Seit Einführung der o.g. Impfstoffe kommt es vermehrt zu einem Serotypen-Austausch (Lu und Huang 2016). Dabei werden jene Serotypen, gegen die erfolgreich immunisiert werden kann (VT: Vakzinetypen), von nicht Vakzine-Serotypen (NVT) verdrängt, die zum Teil Antibiotikaresistenzen aufweisen. Dies ist auf die häufig indikationslose oder falsche Applikation diverser Antibiotika zurückzuführen. Zum Beispiel treten die Serotypen 24F, 22F, 8 und 15A seit Einführung des PCV13 im Jahr 2010 häufiger in Erscheinung. Des Weiteren haben Infektionen durch Serotyp 35B in den USA deutlich zugenommen (Daniels et al. 2016; Lu und Huang 2016; Lu et al. 2015a; Khan und Pichichero 2014). Zudem spitzen sogenannte Durchbruchinfektionen die Lage zu. Hierbei können Serotypen wie 19A durch beispielsweise un-



vollständige Immunisierung weiterhin schwere Infektionen auslösen. Besonders bedroht durch diesen Serotypen sind Kinder zwischen 2 und 5 Jahren (Lu et al. 2015a). Diese Entwicklungen in Kombination mit dem demographischen Wandel machen die genannten Erkrankungen zu einem Gesundheitsproblem mit immer größerer Tragweite. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung Serotyp-unabhängiger Impfstoffe seit langem Gegenstand der Forschung. Als vielversprechende Impfstoffkandidaten wurden hoch-konservierte, oberflächenassoziierte und gleichzeitig immunogene Proteine von *S. pneumoniae* vorgeschlagen und zum Teil auch schon untersucht. Diese Kriterien erfüllen auch Lipoproteine, die sich in bisherigen Arbeiten insbesondere durch eine Toll-like Rezeptor (TLR) 2 vermittelte Immunantwort auszeichnen (Moffitt et al. 2014; Moffitt und Malley 2011). In Untersuchungen konnten bereits Mäuse mittels hochkonservierter Pneumokokken Lipoproteinen wie PiaA und PiuA erfolgreich gegen Infektionen durch *S. pneumoniae* immunisiert werden (Jomaa et al. 2006; Tai 2006). Welche genauen Mechanismen jedoch im Menschen mittels eines Protein-Vakzins eine Immunität erzeugen und in wie weit Erkenntnisse aus Maus-Modellen auf den Menschen übertragbar sind, wird aktuell untersucht.

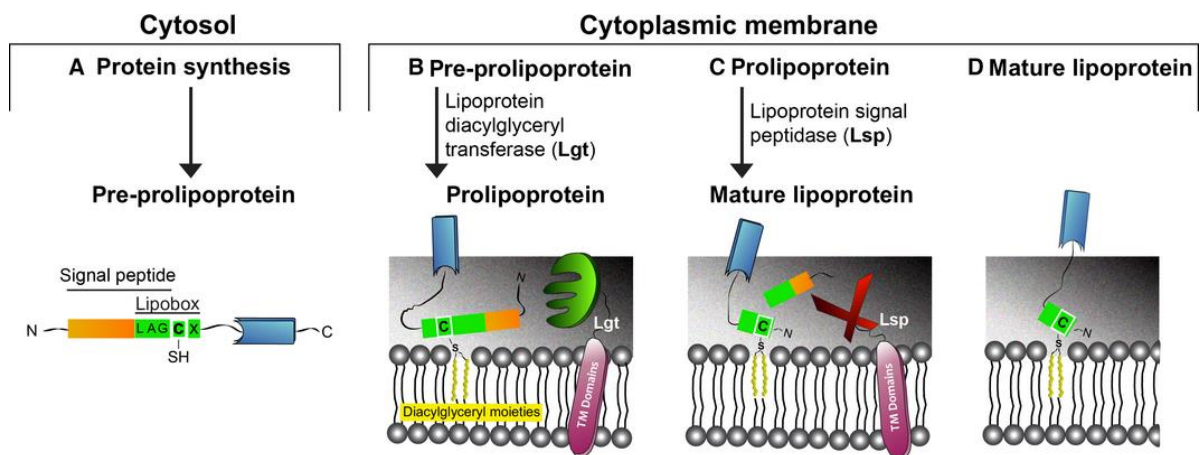
## **1.2 MetQ, DacB, PnrA und PsaA sind hochkonservierte Lipoproteine von *Streptococcus pneumoniae***

### **1.2.1 Funktion, Biosynthese und Modifikation von Lipoproteinen**

Lipoproteine sind wichtige Bestandteile der Bakterienoberfläche von *S. pneumoniae*. Sie spielen bedeutende Rollen beispielsweise für die Nährstoffaufnahme, Proteinfaltung, aber auch Adhäsion an Wirtszellen, Immunevasion sowie Antibiotikaresistenz. Dies bedeutet, dass Lipoproteine eine entscheidende Rolle sowohl in Physiologie als auch Virulenzpotenzial von *S. pneumoniae* spielen (Petit et al. 2001; Kovacs-Simon et al. 2011). Dabei machen Lipoproteine ca. 2 % des gesamten Pneumokokken-Proteoms und über 40 %, und damit einen beachtlichen Anteil der Oberflächenproteine, aus (Pribyl et al. 2014; Babu et al. 2006). Die Translation von Proteinen erfolgt im Zytoplasma von *S. pneumoniae*. Hierbei werden zunächst Prä-prolipoproteine generiert. Diese Vorstufen besitzen ein N-terminales Signalpeptid, welches für die weitere posttranslationale Modifikation verantwortlich ist. Eine Besonderheit stellt die in diesem Signalpeptid implementierte Lipobox dar. Es handelt sich hierbei um eine bestimmte Aminosäuresequenz (LXXC), welche auch ein Cystein beinhaltet, das für

die Lipidierung der Proteine die entscheidende Rolle spielt (Babu et al. 2006). Über verschiedene Transportwege können die Prä-prolipoproteine die Zellmembran passieren. Auf der Außenseite der Membran verknüpft die Lipoprotein-Diacylglycerol-Transferase (Lgt) die Thiolgruppe des Cysteins der Lipobox kovalent mit einem Diacylglycerol der Zellmembran unter Generierung eines Thioesters (Sankaran und Wu 1994) (Abbildung 1). Das generierte Prolipoprotein wird bei Gram-negativen und selten bei Gram-positiven Bakterien noch mit einer dritten Acylkette direkt am Cystein über eine Amidbindung verknüpft (Gupta et al. 1993).

Abschließend wird durch die Lipoprotein-Signalpeptidase II (Lsp) das Signalpeptid N-terminal des Cysteins der Lipopox abgespalten (Tokunaga et al. 1982).



**Abbildung 1: Biosynthese und Modifikation von Lipoproteinen**

Dargestellt ist der Syntheseweg vom Prä-prolipoprotein im Cytosol, über die kovalente Verknüpfung mittels Lgt an die Zellmembran und Generierung des Prolipoproteins, bis hin zum reifen Lipoprotein auf der Membranoberfläche nach Abspaltung des Signalpeptides durch die Lsp (Kohler et al. 2016).

### 1.2.2 MetQ (*sp\_0149*) – Substratbindungsprotein eines Methionin-ABC-Transporters

MetQ ist ein oberflächenassoziiertes Lipoprotein von *S. pneumoniae*. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 30,4 kDa (Bhushan et al. 2011) und wird durch das Gen *sp\_0149* des Pneumokokken-TIGR4 Genoms kodiert. Es weist eine hohe Konservierung innerhalb der bekannten Pneumokokken Serotypen auf (>97 %) (Basavanna et al. 2013). Die Prozessierung des Lipoproteins erfolgt typisch durch die Enzyme Lgt und Lsp. MetQ stellt das substratbindende Protein der Methionin-ATP-

Bindungskassette (ABC) Transporters MetQNP dar. MetN stellt in diesem Zusammenhang als ATPase die Energie für den Transport zur Verfügung und MetP als Permease den Transportweg durch die Membran. MetQ weist eine hohe Affinität zu L-Methionin mit einer Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von ca. 26 nM auf. Das enzymatische Maximum wird also schon bei niedrigen Substratkonzentrationen erreicht. Untersuchungen mit MetQ-defizienten Pneumokokken-Mutanten haben gezeigt, dass bei für Säugetiere typischen Blutkonzentrationen an Methionin von 7-43  $\mu$ M keine Methioninaufnahme mehr stattfindet. Das weist darauf hin, dass MetQ ein essentieller Bestandteil des Methioninaufnahmesystems von *S. pneumoniae* bei physiologischen Konzentrationen darstellt. Da Methionin eine der seltensten Aminosäuren in Organismen darstellt und zudem unabdingbar für Proteinsynthese und Bestandteil von S-Adenosylmethionin ist, spielt MetQ eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Vitalität und für das Wachstum von Pneumokokken (Basavanna et al. 2013; Bhushan et al. 2011; Saleh et al. 2014). Des Weiteren haben Untersuchungen mit MetQ-defizienten Pneumokokken-Mutanten eine verringerte Pathogenität im Mausmodell nachweisen können, was die vitale Rolle von MetQ für *S. pneumoniae* bestätigt (Saleh et al. 2014).

### 1.2.3 DacB (*sp\_0629*) L,D-Carboxypeptidase

DacB ist ein oberflächenassoziiertes Lipoprotein, dessen Gen im hochkonservierten Genlocus *sp\_0629* des Pneumokokken Serotyps TIGR4 lokalisiert ist (Abdullah et al. 2014). Auch DacB wird lipoproteintypisch in der äußeren Zellmembran verankert und durch die Enzyme Lgt und Lsp posttranslational modifiziert. DacB zeichnet sich durch seine L,D-Carboxypeptidase-Aktivität aus. Hierbei werden Peptidbindungen zwischen Aminosäuren bzw. zwischen Aminosäuren und Zuckermolekülen hydrolytisch gespalten. Es muss dabei zwischen den jeweiligen D- und L-Enantiomeren der Aminosäuren unterschieden werden, wobei die L,D Carboxypeptidase Peptidbindungen zwischen sowohl L-als auch D-Aminosäuren spalten kann. Dies spielt eine entscheidende Rolle in der Homöostase der Peptidoglykanschicht (PGN) der Zellwand von *S. pneumoniae*. Diese PGN Schicht liegt der Zellmembran auf und ist aus zwei im Wechsel angeordneten Zuckermolekülen aufgebaut (N-Acetylglucosamin und N-Actelymuraminsäure), welche untereinander durch Peptide bestehend aus L- und D-Aminosäuren quervernetzt werden und so eine stabile Schicht bilden (Heijenoort

2001). Auf diese Weise erfüllt die PGN Schicht wichtige Aufgaben als Exoskelett und osmotische Barriere (Garcia-Bustos et al. 1987; Severin und Tomasz 1996). Da die PGN Schicht für Zellwachstum und Teilung einem ständigen Umbau unterliegen muss, ist ein kontinuierlicher Auf- und Abbau unerlässlich. Die Enzyme DacA, ein Penicillin-Bindungsprotein (PBP3) und DacB arbeiten sequentiell und brechen die PGN-Bestandteile auf, um eine neue Modellierung der Zellwand, die Zellteilung und Recyclen der Zellwandbestandteile zu ermöglichen. DacB spaltet hierbei die von DacA generierten Tetrapeptide hydrolytisch zu Tripeptiden. Nur diese sind der PGN Biosynthese zugänglich und daher für diese essentiell. Untersuchungen mit DacB-defizienten Pneumokokken-Mutanten ergaben eine veränderte Morphologie, veränderte Zellteilungsprozesse und niedrigere Wachstumsdichten. Letztere sind auf eine erhöhte Autolyse aufgrund der artifiziellen Zellwand zurückzuführen. Dies verdeutlicht den Stellenwert von DacB im Erhalt der strukturellen Integrität und der Vermehrung von *S. pneumoniae* (Abdullah et al. 2014; Barendt et al. 2011).

#### **1.2.4 PnrA (*sp\_0845*) Substratbindungsprotein eines Nukleosid ABC Transporters**

Bei PnrA handelt es sich ebenfalls um ein typisches Lipoprotein, welches auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* lokalisiert ist. Es wird über den hochkonservierten (>98 %) Genlocus *sp\_0845* im TIGR4 Pneumokokken-Genom kodiert (Saxena et al. 2015). Wie bei MetQ ist PnrA als Teil eines ATP-abhängigen ABC Transport-Enzymkomplexes für die Substratbindung verantwortlich. Als ATPase wird das Protein im Genlocus *sp\_0846* und als Permeasen die Proteine in von den Genen *sp\_0847* und *sp\_0848* kodiert. Hierbei bindet PnrA nach derzeitigem Kenntnisstand bevorzugt die Nukleoside Cytidin, Guanosin, Uridin und Inosin. Vorangegangene Experimente mit PnrA-defizienten Pneumokokken-Mutanten haben eine verringerte Virulenz ergeben. Damit spielt das hochkonservierte PnrA eine bedeutende Rolle im Erhalt der Virulenz und damit in der Pathogenität von *S. pneumoniae* (Saxena et al. 2015).

### **1.2.5 PsaA (sp\_1650) Substratbindungsprotein eines Mangan (Mn<sup>2+</sup>) ABC Transporters**

Als Teil des Mangan ABC Transporters PsaBCA ist das oberflächenassoziierte Lipoprotein PsaA für die Substratbindung verantwortlich. Es handelt sich um ein hochkonserviertes Protein und wird von allen bekannten *S. pneumoniae* Serotypen exprimiert (Lu et al. 2015b). PsaB stellt hierbei die ATPase und PsaC die Transmembrandomäne des Multienzymkomplexes dar. Seine Bedeutung erhält PsaA durch die angenommenen anti-oxidativen Eigenschaften von Mangan in *S. pneumoniae*. Besonders im Bereich von Infektionen werden bspw. von Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt, welche intrazellulär oxidativen Stress verursachen (Sica und Mantovani 2012). Generierte PsaA-defiziente Pneumokokken-Mutanten wiesen eine blockierte Zink- als auch Manganaufnahme auf, sodass sie anfällig gegenüber oxidativen Zellschäden wurden, da Mangan ein wichtiger Kofaktor für die bakterielle Superoxid Dismutase darstellt (Kohler et al. 2016). Die Mutante wies weiterhin eine reduzierte Virulenz und damit eine verminderte Fähigkeit zur Kolonisation des Nasen-Rachen-Raumes auf (McAllister et al. 2004). Das Virulenz-Defizit scheint eine Folge des Manganmangels zu sein, zurückzuführen auf verringertes Wachstum und erhöhte Anfälligkeit gegen oxidativen Stress (Kohler et al. 2016). Zusätzlich konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass PsaA ein wichtiges Adhäsionsmolekül von *S. pneumoniae* darstellt. Das Protein nutzt hierfür E-Cadherin als Rezeptor zur Bindung an menschlichen Epithelzellen der nasopharyngealen Schleimhaut (Anderton et al. 2007).

Die vorgestellten Pneumokokken-Lipoproteine wurden aufgrund ihres konservierten (>95 %) Auftretens, ihrer oberflächlichen Lage, ihrer Immunogenität und ihrer Bedeutung für die Vitalität, das Wachstum und die Virulenz von *S. pneumoniae*, als potenzielle Vakzinkandidaten für Serotyp-unabhängige Impfstoffe eingestuft.

### **1.3 TLR2 vermittelte Immunantwort von Makrophagen auf *S. pneumoniae* Lipoproteine**

Makrophagen sind mononukleäre Zellen des angeborenen Immunsystems und in verschiedensten Geweben des menschlichen Körpers ansässig (van Furth et al. 1972). Es werden zwei Arten von Makrophagen hinsichtlich ihrer Genese beschrie-

ben. Residente Makrophagen entwickeln sich aus embryonalen Vorläuferzellen unabhängig der Hämatopoese (Sieweke und Allen 2013; Epelman et al. 2014). Auf der anderen Seite entwickeln sich rekrutierte Makrophagen, aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, zirkulieren als Monozyten im Blut und differenzieren nach Auswanderung im Gewebe zu Makrophagen (Sieweke und Allen 2013).

Makrophagen erfüllen in ihren Gewebsnischen Aufgaben der Homöostase, wobei apoptotische Zellen abgebaut, Gewebstrümmer verwertet und dabei Nährstoffe recycelt werden (Sieweke und Allen 2013; Gordon und Martinez 2010; van Furth et al. 1972). Die Hauptaufgabe der Makrophagen besteht jedoch in der Aufnahme und dem unschädlich machen von körperfremden Eindringlingen, wobei das Hauptaugenmerk hier auf Mikroben liegen soll (Gordon und Martinez 2010). Makrophagen erkennen, phagozytieren und prozessieren potenzielle Pathogene und präsentieren deren Bestandteile auf ihrer Oberfläche mittels *Major Histocompatibility Complex II* (MHCII) T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems (Unanue et al. 1976; Aderem und Underhill 1999). Des Weiteren besitzen Makrophagen eine Reihe von Rezeptoren, die ihnen das Erkennen von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) (hochkonservierte Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen, zu denen auch Lipoproteine gehören) ermöglichen (Peiser und Gordon 2001; Ozinsky et al. 2000). Zu diesen Rezeptoren gehören u.a. die TLRs. Diese befähigen die Makrophagen bei Kontakt mit PAMPs ein breites Spektrum von Cytokinen und Chemokinen freizusetzen um andere Zellen der Immunabwehr anzulocken und die Entzündungsmechanismen des Körpers in Gang zu setzen (Nau et al. 2002; Benoit et al. 2008; Ozinsky et al. 2000). Durch verschiedene Stimulantien differenzieren Monozyten in Makrophagen-Untergruppen. Der Kontakt mit Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interferon-gamma ( $INF\gamma$ ) in Kombination mit Lipopolysaccharid (LPS), einem PAMP Gram-negativer Bakterien, polarisiert Monozyten zu pro-inflammatorischen Makrophagen (M1) (Ohradanova-Repic et al. 2016). Diese produzieren Entzündungsmediatoren wie  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 und ein ganzes Set an Chemokinen wie bspw. CCL2, CCL5, CXCL8 und CXCL10 (Veckman 2003; van Ginderachter et al. 2006). Auf diese Weise können M1 Makrophagen Entzündungsreaktionen auslösen und weitere Immunzellen rekrutieren (Benoit et al. 2008). Des Weiteren wird durch die M1 Makrophagen das adaptive Immunsystem für eine spezifische Abwehrreaktion und die Entwicklung einer Immunität aktiviert, um Pathogene effektiv zu eliminieren (Hoebe et al. 2004; Mackaness 1964).

Andererseits differenzieren Monozyten durch Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) und IL-4 in eine anti-inflammatorische Form (M2a) (Ohradanova-Repic et al. 2016). Diese regulieren die Immunantworten, fördern die Gewebsreparatur und sind für die Parasitenabwehr verantwortlich (Gordon 2003). Diese Zellen zeichnen sich durch IL-10, IL-1ra und TGF- $\beta$  Produktion aus. Des Weiteren setzen sie die Chemokine CCL-17, 18, 22 und 24 frei (Foey 2014; Ohradanova-Repic et al. 2016). Weitere Subklassen von M2 Makrophagen stellen M2b- und M2c-Makrophagen dar (Martinez 2008). Die Polarisation in pro- bzw. anti-inflammatorische Makrophagen ist jedoch nicht endgültig. Die Zellen behalten die Fähigkeit sich nach bereits vorangegangener Polarisation erneut umzudifferenzieren. Diese Plastizität erlaubt den Makrophagen eine funktionelle Adaptation auf verschiedene Einflüsse z.B. Cytokinmuster oder Kontakt mit LPS (Stout et al. 2005).

*S. pneumoniae* Lipoproteine werden von Makrophagen mittels TLR2 und TLR6 erkannt (Mukherjee et al. 2016). Diese Rezeptoren bilden ein Heterodimer, welches die diacylierten Lipoproteine des Gram-positiven Pathogenes detektiert. Zur Erkennung der triacylierten Lipoproteine Gram-negativer Bakterien bilden TLR2 und TLR1 ein Heterodimer (Mukherjee et al. 2016; Kawai und Akira 2006). Nach Erkennung der Antigene aktivieren die Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade, welche unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt. Darauf folgend kommt es zur Synthese und Freisetzung der verschiedenen Cytokine und Chemokine (Watters et al. 2007; Oeckinghaus et al. 2011).

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, die induzierte Immunreaktion sowohl von pro- als auch anti-inflammatorisch polarisierten Makrophagen auf die Stimulation durch die lipidierten sowie nicht-lipidierten Pneumokokken Oberflächenproteine MetQ, DacB, PnrA und PsaA zu untersuchen. Hiermit soll beleuchtet werden, in wie weit lipidierte Oberflächenproteine von *S. pneumoniae* eine stärkere Immunreaktion in humanen Makrophagen im Vergleich mit den entsprechend nicht-lipidierten Proteinvarianten induzieren.

## **2. Materialien**

### **2.1 Chemikalien**

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

Substanz	Hersteller
A. dest.	Institutseigene Herstellung
Acryl/Acrylamid	Roth
Agarose	Genaxxon
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
$\beta$ -Mercapthoethanol	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)	Carl Roth GmbH
Coomassie Brillant Blau G-250	AppliChem
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	AppliChem
Essigsäure	Institut für Biochemie, Greifswald
FCS (fetales Kälber-Serum)	Gibco
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare
Glycin	AppliChem
Glycerin	Roth
HD GreenPlus™ DNA Stain	INTAS
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Imidazol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Luminol	Carl Roth GmbH
L-Glutamin-Lösung (100ml)	PAA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH



### **Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

Substanz	Hersteller
NaCl	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumcarbonat	AppliChem
Pepton	Carl Roth GmbH
Pyruvat-Lösung (100ml)	PAA
p-Coumarsäure	Carl Roth GmbH
Saccharose	Carl Roth GmbH
Silbernitrat	Carl Roth GmbH
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Applichem
Triton-X	Applichem
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH

## **2.2 Monozyten-Stimulanzen**

### **Tabelle 2: Verwendete Stimulanzen**

Stimulanz	Art. Nummer	Hersteller
rekombinanter humaner Granulozyten Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (rh GM-CSF)	11343125	ImmunoTools
rekombinanter humaner Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (rh M- CSF)	11343115	ImmunoTools
Interleukin 4 (IL-4)	11340045	ImmunoTools
Lipopolysaccharid (LPS)	L4391	Sigma-Aldrich

## 2.3 Antibiotika

**Tabelle 3: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Hersteller
Kanamycin	Carl Roth GmbH

## 2.4 Enzyme

**Tabelle 4: Verwendete Enzyme**

Enzym	Hersteller
DreamTaq-Polymerase	Thermo Scientific
PFU-DNA-Polymerase	AG Hammerschmidt
Restriktionsenzym FD <i>NdeI</i>	Thermo Scientific
Restriktionsenzym FD <i>BamHI</i>	Thermo Scientific
Restriktionsenzym FD <i>NheI</i>	Thermo Scientific
Restriktionsenzym FD <i>HindIII</i>	Thermo Scientific
T4-Ligase	BioLabs

## 2.5 Nährmedien

**Tabelle 5: Verwendete Nährmedien**

Medium	Inhaltsstoffe
LB-Medium (lysogeny broth)	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro Liter A. dest
LB-Agar	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 12 g Agar pro Liter A. dest
LB-Miller-Medium (für <i>ClearColi</i> ®)	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro Liter A. dest

## Fortsetzung Tabelle 5: Verwendete Nährmedien

Medium	Inhaltsstoffe
RPMI 1640 + Zusätze	20 mM L-Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Natrium-Pyruvat Lösung + 1 % Penicillin/Streptomycin

## 2.6 Geräte

**Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte**

Gerät	Hersteller
Agarose Elektrophoresekammer	CSB Scientific
ÄKTApurifier™-900	GE Healthcare
Allegra X-12R Centrifuge	Beckman Coulter
Brutschrank 37°C	Laborgeräte Berlin
ChemoCam	INTAS
CO <sub>2</sub> Inkubator, Hera cell 160i	Thermo Scientific
Digital Heatblock- Heizblock	VWR
Fluoreszenz Mikroskop Observer.Z1	Zeiss, Visitron Systems
FLUOstar®Omega	BMG LABTECH
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Siemens
Geldokumentation	INTAS GDS®, INTAS
SDS-Gelkämme	Biorad
Heraeus Pico17 Centrifuge	Thermo Scientific
Innova 44 Inkubationsschüttler	New Brunswick
LUNARIS™ Reader	AYOXXA

### Fortsetzung Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	PEQLAB
Pipetten (1000µl; 200µl; 20µl)	Gilson
PHC19 Thermoblock	Grant
pH-Meter, seven easy	Mettler Toledo
Photometer Ultrospec 1100 pro	Biochron, Cambridge
Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke	Thermo Scientific
SDS Gelkammer	Biorad
Standard Power Pack P25	Biometra
T3 Thermocycler	Biometra
T1 Thermocycler	Biometra
Tiefkühltruhe -80°C	New Brunswick Scientific, Thermo Scientific
Transblot SD Semidry Transfer	Cell Biorad
Ultraschall-Sonotrode	Bandelin Sonopuls GM70, Bandelin electronics
UV-Leuchttisch	TFX-20M, Vilbert Lourmat
Vielkolbenschüttler VKS 75 A control	Edmund Bühler® GmbH

## 2.7 Molekularbiologische Kits

**Tabelle 7: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller
LUNARIS™ Human 5-Plex Cytokine Kit	AYOXXA
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	R&D Systems®

## 2.8 Eukaryotische Zellen

**Tabelle 8: Verwendete eukaryotische Zelllinien**

Zellstamm	Herkunft	Verwendung
PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)	Isolation aus Buffy-Coat Blut (Transfusionsmedizin Greifswald)	Differenzierung zu Makrophagen (M1, M2a), Cytokinantwort auf Proteinreiz

## 2.9 Bakterienstämme

**Tabelle 9: Verwendete *Streptococcus pneumoniae* Stämme**

Bakterienstamm	Herkunft/Referenz	Verwendungszweck
TIGR4/ <i>lux</i> (PN315)	(Schulz et al. 2014)	DNA als Template für PCR

**Tabelle 10: Verwendete *E. coli* Stämme**

Bakterienstamm	Herkunft/Referenz	Verwendungszweck
XL-1 blue (E227)	Stratagene	Klonierung, Transformation
DH5 $\alpha$	Novagen	Klonierung, Transformation
ClearColi® BL21 (DE3) (E220)	Lucigen®	Heterologe Protein-Expression

In Klammern ist die Stammsammlungsnummer der AG Hammerschmidt angegeben

## 2.10 Oligonukleotide

**Tabelle 11: Verwendete Primer**

Primer	Sequenz (5'→3')
<i>metQ</i> _pETlip forward (1835)	GCGCCATATGGGAAACTCA- GAAAAGAAAGCAGA
<i>metQ</i> _pETlip reverse (1836)	GCGCGATCCTTAATGATGATGATGAT- GATGCCAAACTGGTTGATCC
<i>dacB</i> forward (484)	GCGCGCTAGCCAAGAAAAACAAAAAAT GAAG
<i>dacB</i> reverse (485)	GGCCAAGCTTAATCGACGTAGTCTCC

In Klammern ist die Stammsammlungsnummer der AG Hammerschmidt angegeben

## 2.11 Plasmide

**Tabelle 12: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Herkunft	Verwendungszweck
pETlip3 <i>dacB</i> (1105)	AG Hammerschmidt (Doktorarbeit Franziska Voß <sup>1</sup> )	heterologe Expression
pETlip3 <i>metQ</i> (1180)	Diese Arbeit (Doktorarbeit F. Voß)	heterologe Expression

<sup>1</sup>Promotionsarbeit Dr. Franziska Voß, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung für molekulare Genetik und Infektionsbiologie; Prof. Hammerschmidt

## Fortsetzung Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft	Verwendungszweck
pETlip3 <i>pnrA</i> (1106)	AG Hammerschmidt (Doktorarbeit F.Voß)	heterologe Expression
pETlip3 <i>psaA</i> (1107)	AG Hammerschmidt (Doktorarbeit F.Voß)	heterologe Expression
pET28TEV (pTP1) <i>metQ</i> (732)	AG Hammerschmidt (Voß et al. 2018)	heterologe Expression
pET28TEV (pTP1) <i>dacB</i> (829)	Diese Arbeit (Doktorarbeit F.Voß) (Abdullah et al. 2014)	heterologe Expression
pET28TEV (pTP1) <i>pnrA</i> (827)	AG Hammerschmidt (Voß et al. 2018)	heterologe Expression
pET28TEV (pTP1) <i>psaA</i> (831)	AG Hammerschmidt (Voß et al. 2018)	heterologe Expression

In Klammern ist die Stammsammlungsnummer der AG Hammerschmidt angegeben

## 2.12 Antikörper

**Tabelle 13: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Hersteller/Herkunft	Verdünnung
Maus-Anti penta His-IgG	Qiagen	1:2500
Maus-Anti-MetQ-IgG	AG Hammerschmidt (F. Voß)	1:1500
Maus-Anti-DacB-IgG	AG Hammerschmidt (F. Voß)	1:1500
Maus-Anti-PnrA-IgG	AG Hammerschmidt (F. Voß)	1:1500
Maus-Anti-PsaA-IgG	AG Hammerschmidt (F. Voß)	1:1500
Ziege-Anti-Maus POX	Jackson ImmoResearch	1:5000

### Fortsetzung Tabelle 13: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller/Herkunft	Verdünnung
Maus-Anti-Mensch CD68	abcam®	1:500
Kaninchen-Anti-Mensch CD206 Alexa Fluor® 647	abcam®	1:1000
Kaninchen-Anti-Mensch CD86	abcam®	1:1000
Ziege-Anti-Kaninchen Alexa-Fluor® 488	Invitrogen	1:500

### 2.13 Verbrauchsgegenstände/ Materialien

**Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien**

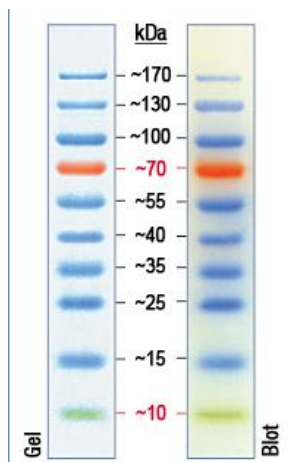
Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Typ
Dialyseschlauch	16 mm Flachbreite, MWCO 12-14000 Da; Medicell international
Gewebekultur Flasche; Cellstar; T175	Greiner Bio-One
Handschuhe	Sarstedt
HisTrap™ FF Crude 1 ml	GE Healthcare
Küvetten (Polystyrol 1 ml)	Sarstedt
Kryoröhrchen	Sarstedt
Mikrotiterplatte; Cellstar 24-Vertiefungen	Greiner Bio-One
Nitrocellulose-Membran Protan®	Whatman Protran®
PCR-Reaktionsgefäß (200 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Rotizell® Tissue-Tücher	Roth
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Whatman-Papier	Chromatography Paper, GE Healthcare
Zentrifugenröhrchen (250 ml, 50 ml, 15 ml)	Sarstedt



**Tabelle 15: Größenmarker**

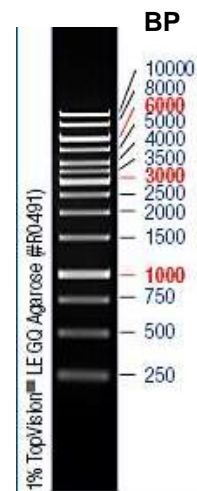
Marker	Größen	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000,	Fermentas
DNA Ladder	2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp	
PageRuler™ Prestained	10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 90, 130,	Fermentas
Protein Ladder	170 kDa	

**A**



PageRuler™ Prestained Protein Ladder

**B**



GeneRuler™ 1kbDNA Ladder

## **3.Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

Die rekombinanten Plasmide pETlip3 *dacB*, *pnrA* und *psaA* (Doktorarbeit F. Voß), sowie pET28TEV *metQ* (Saleh et al. 2014), *pnrA* und *psaA* (Abdullah et al. 2014) waren in der AG Hammerschmidt bereits vorhanden. Die rekombinanten Plasmide pETlip3 *metQ* und pET28TEV *dacB* wurden *de novo* mittels Klonierung hergestellt.

#### **3.1.1 Polymeraseketten-Reaktion (PCR – Polymerase chain reaction)**

Zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-(Desoxyribunukleinsäure) Abschnitten kommt die PCR zum Einsatz. Bei diesem Verfahren werden mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primern) sowohl stromauf- (5') als auch stromabwärts (3') begrenzte DNA-Abschnitte vervielfältigt. Eingesetzt werden hierbei verschiedene temperaturstabile DNA-Polymerasen (Pfu-Polymerase, DreamTaq-Polymerase). Die drei grundlegenden Schritte sind hierbei die Denaturierung des Template (DNA-Fragment, genomische DNA) bei 94-96°C, die Hybridisierung der Primer entsprechend ihrer Länge und Sequenz vorzugsweise bei 55°C und die Elongation durch die Polymerase bei 72°C. Diese Schritte werden zwischen 15 und 30-mal im Thermocycler wiederholt womit sich auch kleinste DNA Mengen vervielfältigen lassen.

Die einzelnen Schritte des Verfahrens wurden hinsichtlich Dauer, Temperatur und Anzahl der Zyklen variiert. Die verwendeten Primer zur Amplifizierung der Gens für *metQ*, welches mittels pETlip3 Vektor lipidiert werden sollte, fügten dem Fragment eine Zusatzsequenz für einen His<sub>6</sub>-Tag hinzu. Für die PCR des *dacB* Fragmentes war dies nicht nötig, da der His<sub>6</sub>-Tag durch den Vektor vermittelt wurde. Als Template kamen 50-500 ng isolierte genomische DNA des Pneumokokken-Stammes TIGR4*lux* zum Einsatz.

**Tabelle 16: PCR-Ansatz zur Amplifizierung von *metQ* und *dacB***

Komponente	Volumen
10x Pfu-Ultra Puffer	5 µl
dNTP-Lösung 10mM	1 µl
Primer <i>metQ/dacB</i> forward	1 µl
Primer <i>metQ/dacB</i> reverse	1 µl
genomische DNA von TIGR4/ <i>lux</i> (Template) 1:10	50-500 ng
A. dest.	80 µl
Pfu DNS-Polymerase	2 µl

**Tabelle17: PCR-Programm zur Amplifizierung von *metQ* und *dacB*:**

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	5 s	Zyklen:
Primer-Hybridisierung	55°C	30 s	30
Elongation	72°C	30 s	
Abschließende Elongation	72°C	300 s	
Pause	7°C	Nach Bedarf	

### 3.1.2 Kolonie PCR

Zur Kontrolle der Transformationen der *E. coli* Klone mit den rekombinanten Plasmiden wurden die Klone mittels Kolonie PCR auf das gewünschte DNA-Fragment untersucht. Hierfür wurde von auf Agar-Platten gewachsenen Bakterien einzelne Kolonien in 50µl A.dest. aufgenommen. Die suspendierten Zellen wurden für 10min bei 96°C im Thermocycler lysiert. Anschließend wurden 16,53µl des Lysats und 3,74µl PCR-Mastermix gemischt und der entsprechende DNA-Abschnitt unter Nutzung des Thermocyclers amplifiziert.

**Tabelle18: PCR-Master Mix zur Kontrolle auf *metQ*- und *dacB*-DNA**

Komponente	Volumen
DreamTaq Puffer 10x	82 µl
dNTP-Lösung 10mM	16,4 µl
Primer <i>metQ</i> _pETlip/ <i>dacB</i> forward	24,6 µl
Primer <i>metQ</i> _pETlip/ <i>dacB</i> reverse	24,6 µl
DreamTaq Polymerase	5,125 µl

**Tabelle19: Kolonie PCR-Programm zur Kontrolle auf *metQ*- und *dacB*-DNA**

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	96°C	120 s	
Denaturierung	96°C	30 s	Zyklen
Primer-Hybridisierung	55°C	30 s	15
Elongation	72°C	70 s	
Abschließende Elongation	72°C	300 s	
Pause	7°C	Nach Bedarf	

### 3.1.3 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Lösungen und Puffer:

*TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (20x): 800 mM TRIS, 20 mM EDTA, in 1 l A. dest, pH 8,0*

*Agarose-Ladepuffer: 25 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, in 1x TAE-Puffer*

Die Gelelektrophorese wurde unter Verwendung von Agarosegelen mit 0,8% Agarose durchgeführt.

**Tabelle20: Zusammensetzung 0,8 % Agarosegel**

Gel	Zusammensetzung
0,8 % Agarosegel	2,4 g Agarose Broad Range 300 ml 1x TAE Puffer 18 µl HDGreen™ Plus DNA Stain

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren größenspezifisch aufgetrennt werden. Verwendung finden hierfür 0,8 % Agarosegele.

Aufgrund der Poren des Agarose-Gels werden nach Anlegen einer Spannung die größeren DNA-Fragmente an einer schnellen Passage durch das Gel behindert, während die kleineren Moleküle schneller und weiter im Gel wandern können. Zur Kontrolle wurde stets ein Größenstandard (GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer durchgeführt. Die DNA-haltigen Lösungen wurden mit Agarose-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Fluoreszenz-Farbstoff HDGreen™ Plus, welcher dem Agarosegel beigemischt wurde, lagert sich an die DNA an und macht sie unter UV-Licht detektierbar. Anschließend wurden die Proben bei einer Spannung von 70-90 V aufgetrennt.

Die Auswertung und Dokumentation fand unter Nutzung eines UV-Tisches und der Geldokumentationskamera von INTAS statt.

### **3.1.4 Reinigung amplifizierter DNA aus PCR-Ansätzen**

Nach durchgeführter PCR und positiver Kontrolle auf das gewünschte DNA Fragment mittels Gelelektrophorese sollte die DNA aus der Lösung des PCR-Ansatzes isoliert werden.

Zu diesem Zweck kam das „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ der Firma *Promega* zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll und unter Nutzung der dem Kit beiliegenden Reagenzien.

Die auf diese Weise isolierte DNA wurde erneut mittels Gelelektrophorese auf korrekte Größe und Reinheit kontrolliert.

### 3.1.5 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

*E. coli* DH5 $\alpha$ , welche mit rekombinanter Plasmid-DNA transformiert wurden und auf ihren entsprechenden mit Antibiotika versetzten Selektivagarplatten wuchsen, wurden für Plasmid-Isolierungen herangezogen. Die Isolation erfolgte mittels Säulenchromatographie aus angesetzten 7ml Kulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die Übernachtskulturen wurden bei Zimmertemperatur für 5-10min bei 3.300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment für die Plasmidisolierung mittels dem „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System“ von Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend des dem Kit beiliegenden Protokolls sowie mittels der mitgelieferten Reagenzien. Die Präparation des Plasmids wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA in Lösung erfolgte mit NanoDrop Spektrophotometrie.

### 3.1.6 Restriktionsendonukleasen-Verdau

Die Enden der zu klonierende DNA Fragmente und die Schnittstellen des Vektors mussten mittels Restriktionsenzymen für eine Ligation prozessiert werden. Es handelt sich dabei um Nukleasen, welche an palindromischen Nukleotidsequenzen binden und anschließend eine Spaltung durchführen. Bei den entstehenden Endstücken handelt es sich bei den verwendeten Enzymen um Überhänge (sticky Ends). Notwendig ist dieser Schritt, um zum einen den Vektor zu linearisieren und zum anderen sowohl Vektor als auch das zu klonierende DNA-Fragment für die DNA-Ligase prozessierbar zu machen.

Der Vektor besitzt die entsprechenden Erkennungssequenzen in sogenannten „multiplen Klonierungsabschnitten“ (*multiple cloning sites*) während in die zu klonierende DNA die Sequenzen während der PCR mittels der verwendeten Primer inseriert wurde.

**Tabelle 21: Restriktionsansatz für pETlip3 und pET28TEV**

Reaktions-Komponente	Volumen $\mu\text{l}$	Reaktions-Komponente	Volumen $\mu\text{l}$
pETlip3 Plasmid	9,2 (1 $\mu\text{g}$ )	pET28TEV	11,5 (1 $\mu\text{g}$ )
FD Puffer 10x	1,5	FD Puffer 10x	1,5
FD <i>NdeI</i>	1	FD <i>NheI</i>	1
FD <i>BamHI</i>	1	FD <i>HindIII</i>	1
A. dest.	2,3		

Die Restriktionsansätze wurden bei 37 °C im Heizblock für 1h inkubiert.

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden mit den entsprechend gleichen Enzymen und Puffern prozessiert.

### 3.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gel

Um nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Lösungen im Agarose-Gel die gewünschten DNA-Fragmente zu isolieren, wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht mittels Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Gewichtsbestimmung des Gelfragmentes. Die Reinigung der DNA erfolgte unter Nutzung des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Die Durchführung fand entsprechend des dem Kit beiliegenden Protokolls sowie mittels der mitgelieferten Reagenzien statt.

### 3.1.8 Ligation

Mittels der Ligation werden die durch die Restriktionsspaltung vorbereiteten Plasmide und die *lacB*- bzw. *metQ*-DNA miteinander verknüpft. Hierfür kommen Enzyme, die sogenannten Ligasen zum Einsatz. Sie verbinden die durch gleiche Restriktionsenzyme erstellten überhängenden Enden (sticky ends) von Plasmid und DNA-Fragment. Zur Berechnung der einzusetzenden Masse der zu klonierenden DNA kommt eine Formel zum Einsatz:

$$\frac{3 * mVektor * Länge DNA Fragment}{Länge Vektor} = mDNA$$

Als Vektor wurde die Masse des Vektors eingesetzt, welche im Ligationsansatz verwendet werden soll. Im Fall dieser Arbeit wurden durchgehend 200 ng Plasmid/Vektor verwendet. Die Sequenzlänge von *metQ* beträgt 855 bp, die von *dacB* 717 bp. Die Vektoren pETlip3 und Pet28TEV besitzen eine Größe von 3158 bp bzw. 6412 bp. Für die Ligation kam das Enzym T4 Ligase von BioLabs zum Einsatz.

Das pET28TEV Plasmid (pTP1) wurde genutzt, um Proteine in nicht-lipidiertem Zustand heterolog exprimieren zu können. Der Vektor beinhaltet ein Kanamycin- sowie ein Erythromycin-Resistenzgen, wobei letzteres während des Restriktionsendonukleaseverdaus herausgeschnitten wurde. Weiterhin vermittelt das Plasmid dem klonierten Gen einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag sowie eine Bindungsstelle für die TEV-Protease. Die exprimierten Proteine akkumulieren im Zytoplasma, da bei der Amplifizierung der Protein kodierenden Gene mittels PCR, durch die verwendeten Primer, die Sequenz der Signalpeptide nicht amplifiziert wurde. Entsprechend findet posttranslational kein Einbau der Proteine in die Zellmembran und hierbei auch keine enzymatische Verknüpfung mit der Zellmembran statt, wodurch die Proteine nicht lipidiert werden.

Für die artifizielle Lipidierung der Proteine wurde das Plasmid pETlip3 verwendet. Es handelt sich um ein modifiziertes pETHis Plasmid, verfügt über ein Kanamycin-Resistenzgen, versetzt das Protein ebenfalls mit einem His<sub>6</sub>-Tag und fügt dem Protein die Signalsequenz OspA hinzu. Es handelt sich um die Signalsequenz des *Outer Surface Protein A* (OspA) von *Borrelia Burgdorferi* und vermittelt posttranslational eine Triacylierung des Proteins an einem Cysteinrest. Dies ist für die heterologe Expression in *E. coli* notwendig, da Lipoproteine des Gram-positiven *S. pneumoniae* eine Diacylierung aufweisen, während *E. coli* als Gram-negatives Bakterium weitestgehend triacylierte Lipoproteine in seine Membran integriert (Gupta et al. 1993).



**Tabelle 22: Ligationsansatz pETlip3 und pET28TEV mit entsprechender DNA**

Reaktions-Komponente	Volumen $\mu$ l	Reaktions-Komponente	Volumen $\mu$ l
Vektor pETlip3	5,4 (200 ng)	Vektor pET28TEV	13,3 (200 ng)
<i>metQ</i> - DNA	1,9 (145,5 ng)	<i>dacB</i> - DNA	3,7(82,7 ng)
T4 Ligase	1	T4 Ligase	1
T4 Puffer 10x	1,2	T4 Puffer 10x	2
A. dest.	2,5		

Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 14°C im THC19 Thermoblock über Nacht.

### 3.1.9 Sequenzierung klonierter Gene

Vor der Transformation in den Expressionsstamm musste mittels Sequenzierung die Sequenz des klonierten Gens im Plasmid überprüft werden. Dazu wurde das rekombinante Plasmid zur Firma MWG *eurofins* geschickt, welche die Sequenzierung mit den jeweiligen forward Primern für das pTP1 Plasmid bzw. dem T7 Promotor Primer (5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3') für das pETLip3 Plasmid durchführte.

## 3.2 Proteinanalytische Methoden

### 3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleinsäuren mittels NanoDrop

Mittels des Spektrophotometers ist es möglich die Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen in Lösungen zu bestimmen. Genutzt wurde das NanoDrop Spektrophotometer 1000. Bei dieser Methode wird sich das Absorptionsverhalten der Nukleinsäuren bei 260 nm Wellenlänge zu Nutze gemacht. Bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird die Absorption bei 280 nm bestimmt. Hierbei wird die Konzentration unter Berücksichtigung der Hintergrundabsorption bei 310 nm mit der nachfolgenden Formel berechnet.

$$\text{Konzentration mg/ml} = \frac{E_{280 \text{ nm}} - E_{310 \text{ nm}} * MG}{EK}$$

Die Absorptionen (E) bei 280 und 310 nm werden voneinander subtrahiert, mit dem Molekulargewicht (MG) multipliziert und durch den molekularen Extinktionskoeffizienten (EK) dividiert

### 3.2.2 Heterologe Expression von MetQ, DacB, PnrA und PsaA in ClearColi® BL21(DE3)

Verwendete Puffer und Lösungen:

*LB-Medium für ClearColi®: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 Liter A.dest*

*SDS- 2x Probenpuffer: 6 ml A.dest., 4 ml Sammelgelpuffer, 10 % (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml β-Mercaptoethanol, eine Spatelspitze Bromphenolblau*

*E. coli ClearColi® BL21 (DE3)* Klone, die zuvor erfolgreich mit den rekombinanten Plasmiden pETlip3 *metQ*, *dacB*, *pnrA* und *psaA* sowie pET28TEV *metQ*, *dacB*, *pnrA* und *psaA* transformiert wurden, können durch die Eigenschaften des Plasmids zur heterologen Expression der Proteine angeregt werden. Dazu wurde eine Vorkultur der Bakterien in 40 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angesetzt und über Nacht bei 30°C im Schüttelinkubator (110 rpm) angezogen. Am folgenden Tag wurden 800 ml LB-Medium für *ClearColi®* mit 50 µg/ml Kanamycin als Selektionsfaktor versetzt und mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 beimpft. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Die 800 ml Hauptkultur wurde bei 30°C und schütteln (100 rpm) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 1mM Endkonzentration) die heterologe Expression induziert. Es wurden vor der Induktion und drei Stunden lang stündlich nach Induktion 2 ml Proben der Hauptkultur entnommen.

Die Proben wurden zentrifugiert und anschließend mit A. dest. sowie 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben 10min im Heizblock bei 95°C lysiert und die Proteine denaturiert.

Mittels der SDS-PAGE und anschließender Färbung durch Coomassie Brilliant Blau wurde die Proteinexpression kontrolliert. Nach 3h erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation mit 5000 xg bei 4°C für 10 min. Das Zellsediment wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3 Proteinauftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese(SDS-PAGE)

Verwendete Puffer und Lösungen:

*SDS-Sammelgelpuffer: 500 mM TRIS-HCl, in A. dest, pH 6,8*

*SDS- Trenngelpuffer: 1,5 M TRIS-HCl, in A. dest, pH 8,8*

*SDS-10x Laufpuffer: 0,23 M TRIS, 1,52 M Glycin, 1 % SDS (w/v) in A. dest.*

*SDS- 5x Probenpuffer: 6 ml A. dest., 10 ml Sammelgelpuffer, 10 % (w/v) SDS, 10 ml Glycerin, 5 ml  $\beta$ -Mercapthoethanol, eine Spatelspitze Bromphenolblau*

*SDS- 2x Probenpuffer: 6 ml A.dest., 4 ml Sammelgelpuffer, 10 % SDS (w/v), 4 ml Glycerin, 2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, eine Spatelspitze Bromphenolblau*

In dieser Arbeit wurden durchgehend 12 % SDS-Gele hergestellt und verwendet.

**Tabelle 23: Herstellung SDS-Gel 12%, 1,5 mm:**

Komponente	Volumen für Sammelgel in $\mu$ l	Volumen für Trenngel in $\mu$ l
A. dest.	3400	3300
Acryl/Bisacrylamid	830	4000
Sammelgelpuffer	630	-
Trenngelpuffer	-	2500
SDS-Lösung 10%ig	50	100
APS 10%ig	50	100
TEMED	5	4

Entsprechend des Schemas wurde zuerst das Trenngel gegossen, mit einer dünnen Schicht Isopropanol überlagert und für 20-30 min zum polymerisieren ruhen gelassen. Anschließend wurde nach abgießen des Isopropanols das Sammelgel auf das feste Trenngel gegossen und der Gelkamm blasenfrei eingesetzt. Nach ca. 20 min war die Polymerisierung abgeschlossen.

Die SDS-PAGE dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei werden die anionischen Eigenschaften des Detergens SDS genutzt, durch welche die Proteine eine konsequent negative Ladung erhalten. Die Eigenladung der Proteine spielt dadurch keine Rolle mehr, wodurch sie in einem elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt werden können. Die Eigenschaften des Sammelgels führen vorerst zu einer Fokussierung und Konzentrierung der Proteine. Nach Eintritt der

Proben in das Trenngel, wandern kleine Moleküle aufgrund der Porengröße schneller und weiter während die größeren, schwereren Moleküle an einer schnellen Passage gehindert werden und höher im Gel laufen. Dabei wurde das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli genutzt (Laemmli 1970). Die Proteinproben wurden vor der SDS-PAGE mit SDS- 5x Probenpuffer versetzt und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Auftrennung der Proteine wurde das Gel in eine mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 90 V angelegt bis das Sammelgel durchlaufen wurde. Anschließend wurde die Spannung auf 120-140 V angehoben. Zur Identifizierung von Molekülgröße/Molekülmasse wird zusätzlich ein Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) mit aufgetragen.

### 3.2.4 Färbemethoden zur Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Verwendete Puffer und Lösungen:

*Coomassie-Blau-Färbelösung: 65 % (v/v) A. dest., 25% (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau G-250;*

*Entfärbelösung: 65 % (v/v) A. dest., 25 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure*

*Fixierlösung (Silber): 12 ml Essigsäure, 50 ml Ethanol, 50 µl Formaldehyd (37 %), 38 ml A. dest.*

*Sensitivierungslösung: 100 µl Natriumthiosulfat-Pentahydrat (10 %ig), 49,9 ml A. dest.*

*Silberfärbelösung: 0,1 g Silbernitrat, 37,5 µl Formaldehyd (37 %), 50 ml A. dest.*

*Entwicklungslösung: 1,5 g Natriumcarbonat, 2 µl Natriumthiosulfat-Pentahydrat (10 %ig), 25 µl Formaldehyd (37 %), 50 ml A. dest.*

*Waschlösung: 50 ml Ethanol (96 %), 46 ml A. dest.*

*Stopplösung: 2 g Glycin, 200 ml A. dest.*

Zur Detektion von Proteinbanden im SDS-Gel werden diese mittels verschiedener Färbemethoden sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurden die Färbungen mittels Coomassie-Brillant-Blau sowie Silbernitrat genutzt.

Zur Färbung mit Coomassie Brillant Blau wurde das Gel für etwa 2-3 Stunden in die Färbelösung eingelegt und geschwenkt. Nach abgießen der Färbelösung wurde die Entfärbelösung hinzugegeben und das Gel über Nacht unter Schwenken entfärbt. Am nächsten Tag konnten im entfärbten Gel die nach wie vor gefärbten Proteinban-

den beurteilt werden. Der Farbstoff bildet Komplexe vor allem mit unpolaren und basischen Seitenketten von Proteinen und lässt sich daher nicht ohne weiteres von diesen entfernen. Aus diesem Grund bleiben die Proteine weiterhin gefärbt während das Gel nach der Entfärbung ungefärbt vorliegt.

Bei der Färbung mittels Silbernitrat wurde das Gel vorerst 2-3 Stunden bzw. über Nacht in der Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde das Gel zweimal 20 min mit der Waschlösung gewaschen. Das gewaschene Gel wurde eine Minute mit Sensitivierungslösung behandelt und darauffolgend dreimal 20 s mit A. dest. gewaschen. Es folgte der Färbeschritt mittels Silberfärbelösung für 20 min. Nach dreimaligem Waschen für 20 s mit A. dest., wurde zur Entwicklung die Entwicklerlösung hinzugegeben und die Reaktion bei gewünschter Färbung der Proteinbanden mit Stopplösung beendet. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit A. dest. für 30 s und anschließend für 10-30 min ein erneuter Auftrag von Stopplösung um die Entwicklungsreaktion vollständig zu beenden. Die Lagerung des Gels erfolgte in A. dest.

### 3.2.5 Western Blot Analyse

Verwendete Puffer und Lösungen:

*TBS (TRIS buffered saline) (10x): 0,5 M TRIS, 2 M Natriumchlorid, in 1 l A. dest, pH 7,4*

*Semi-Dry-Blot SDS Puffer 20x: 0,96 M TRIS, 0,77 M Glycin, 74 ml 10 % SDS, auf 1 l mit A. dest.*

*Semi-Dry-Blot SDS Puffer 1x: 50 ml 20x Semi-Dry-Blot-SDS-Blotting-Puffer, 200 ml Methanol, 750 ml A. dest.; Blockierungslösung 5 %: 6 ml TBS-Puffer, 0,3 g Magermilchpulver*

*Waschlösung 0,05 %: 298,5 ml TBS, 1,5 ml TWEEN® 20*

*Chemolumineszenz-Lösung: 2 ml Lösung A, 0,89 ml Lösung B, 20 ml Lösung C, auf 200 ml mit A. dest.*

*Stammlösung A: 250 mM Luminol in 20 ml DMSO; Stammlösung B: 90 mM p-Coumarsäure in 50 ml DMSO; Stammlösung C: 1 M TRIS-HCl in 100 ml A. dest, pH 8,5*

Bei einem Immunoassay, zu denen auch der Western Blot gehört, werden Primärantikörper gegen ein bestimmtes Protein oder eine Markierung (Tag) verwendet, um diese zu markieren. Anschließend werden Sekundärantikörper hinzugegeben, welche spezifisch an die vorher genutzten Primärantikörper binden. Diese Sekundärantikörper sind mit einer Peroxidase konjugiert, die eine Farbreaktion auslöst, welche

mittels Chemoluminiszenz detektierbar und proportional zur enthaltenen Proteinmenge ist.

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese wurde ein Semi-Dry-Blot des Gels auf eine Nitrocellulose-Membran durchgeführt. Hierzu wurde das Gel mit der Membran zwischen zwei Whatman Filterpapiere luftblasenfrei in den Transblot SD Semidry Transfer gebettet und mit Semi-Dry-Blot SDS Puffer 1x befeuchtet. Für den Transfer wurde eine Spannung von 15 V für 1 Stunde angelegt. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C in 6 ml 5 % Blockierungslösung unter Rollen in einem 50 ml Reaktionsgefäß inkubiert. Durch die Milchproteine, an welche die genutzten Antikörper nicht binden, werden die freien Stellen der Membran blockiert. Anschließend wurden für die Detektion der Proteine MetQ, DacB, PnrA und PsaA jeweils ein proteinspezifischer polyklonaler Maus-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:1500 zur Blockierungslösung hinzugegeben. Nach einer Stunde inkubieren bei RT unter einer rollenden Bewegung folgten drei Waschschriffe von je 5 min mit jeweils 5 ml Waschlösung. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in einer Endkonzentration von 1:5000 in 5 ml Waschlösung hinzugegeben (anti-Maus-Antikörper IgG konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase). Nach erneuter Inkubation für eine Stunde bei RT und rollen, folgten drei Waschungen von je 5 min mit 5 ml Waschlösung. Zur Entwicklung wurden 6 ml Chemolumineszenz-Lösung und 2 µl Wasserstoffperoxid hinzugegeben und 1,5 min inkubiert. Anschließend konnten die detektierten Proteinbanden mittels ChemoCam dokumentiert werden.

### 3.2.6 Reinigung der His<sub>6</sub> – getaggtten Proteine

Verwendete Puffer und Lösungen:

*Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4 auf 1l mit A.dest.*

*Elutionspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4 auf 0,5l mit A.dest.*

Aufgrund des His<sub>6</sub>-Tags der Proteine, können diese mittels Affinitätschromatographie aus Lösungen isoliert werden. Bei diesem Verfahren macht man sich die hohe Affinität von Nickel zu Imidazol zu Nutze. Es kam eine nickelhaltige *HisTrap*<sup>TM</sup>FF crude 1 ml Säule zum Einsatz, welche die Imidazoleseitenketten der Histidinreste des His-Tags binden und somit Proteine aus ihrer Lösung isolieren konnte. Um die Säule

zu äquilibrieren und die Proben aufzutragen kam ein Bindungspuffer zum Einsatz. Des Weiteren wurde ein Elutionspuffer genutzt, um die Proteine von der Säule zu eluieren. Durch die hohe Imidazolkonzentration des Elutionspuffers werden die Proteine von den Nickelatomen verdrängt und von der Säule eluiert. Genutzt wurde dafür das *ÄKTApurifier protein purification system* von GE Healthcare. Die Bedienung des *ÄKTApurifier* erfolgte nach Anleitung.

Zur Vorbereitung der Proben für den *ÄKTApurifier* wurde das bei -20 °C gelagerte Zellsediment langsam aufgetaut. Die Zellen wurden in 8 ml Bindungspuffer suspendiert und anschließend 3-4 mal je 30 Sekunden bei 70-80 % mittels Ultraschall lytiert. Zur Solubilisierung der lipidierten Proteine wurde 0,123 g CHAPS zum Lysat hinzugegeben und für 4 h bei RT und schütteln inkubiert. Im Falle der nicht-lipidierten Proteine entfiel dieser Schritt.

Das Lysat wurde darauffolgend in 1,5 ml Reaktions-Röhrchen überführt und 20 min bei 4 °C und 17.000 xg zentrifugiert. Die entstandenen Überstände mit gelöstem Protein (8-10 ml) wurden auf die Säule aufgetragen.

Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE und Silberfärbung der entsprechenden Elutionsfraktionen.

### **3.2.7 Umpufferung von gelösten Proteinen mittels Dialyse**

Verwendete Puffer und Lösungen:

*PBS-Puffer (phosphate buffered saline): 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,42 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,27 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*

Bei der Dialyse nutzt man das Prinzip von semipermeablen Membranen, um ungewünschte Substanzen aus Lösungen zu entfernen. Dabei können nur Stoffe die Membran passieren, welche die Porengröße nicht überschreiten. In dieser Arbeit wurde mit einem Schlauchsystem gearbeitet, welches die Passage von Molekülen im Bereich von 12-14000 Da sowie Flüssigkeiten erlaubte. Auf diese Weise wurden die Proteine aus dem Elutionspuffer in 1x PBS umgepuffert.

Nach einbringen der Proteinfractionen in einen 16 mm Dialyseschlauch, wurde dieser in 2 l 1x PBS eingebracht und bei 4 °C ÜN bei leichtem Rühren inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Dialysat aus dem Schlauch entnommen und auf Präzipitationen überprüft. Von den Lösungen wurden Proben entnommen und die Proteine

mittels SDS-PAGE und Silberfärbung auf Reinheit und Integrität kontrolliert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch NanoDrop-Berechnung.

### 3.2.8 ELISA

Verwendete Puffer und Lösungen:

*Waschlösung: (PBS) 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,42 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,27 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % (v/v) TWEEN®20*

*Blockierlösung: 1 % (w/v) BSA in PBS*

*Verdünnungslösung: 1x TBS + 0,1 % (w/v) BSA + 0,05 % (v/v) TWEEN®20*

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient dem Nachweis von Proteinen, Hormonen, Cytokinen usw. basierend auf Antikörperbindung.

Zur Bestimmung der IL-8 Konzentration wurde auf das IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA Kit der Firma R&D Systems® zurückgegriffen. Bis auf Blockier-, Wasch- und Verdünnungslösung lagen sämtliche Lösungen dem Kit bei.

Beim Sandwich-ELISA kommen zwei Antikörper gegen das gesuchte Antigen zum Einsatz. Der primäre Antikörper wird auf einer 96-well Flachboden Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen der Platte mittels einer 1 % BSA Lösung blockiert. Nach Zugabe der in Verdünnungslösung verdünnten gesuchten Antigene und Bindung der Antigene durch die primären Antikörper, wird der sekundäre Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls spezifisch an das Antigen bindet. Nach Auswaschen der ungebundenen Antikörper mittels Waschlösung binden die Sekundärantikörper das Enzym Meerrettich-peroxidase gekoppelt an Streptavidin aus der Arbeitslösung. Nach Zugabe der Substratlösung, welche Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidine enthält, wird eine Reaktion ausgelöst und es kommt zu einer Emission von Licht. Die Konzentration des in der zugegebenen Lösung enthaltenen Antigens lässt sich nach Abstoppen der Reaktion anhand des emittierten Lichtes bei 450nm bestimmen. Dafür wurde das FLUOstar® Omega Gerät der Firma BMG LABTECH verwendet.



### 3.3 Mikrobiologische - und zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* ClearColi® BL21 (DE3) Zellen

Verwendete Puffer und Lösungen:

*LB-Medium für ClearColi®: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 Liter A. dest*

*Puffer 1: 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl (Rubidiumchlorid)*

*Puffer 2: 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin*

Um *E. coli* ClearColi® BL21 (DE3) zu befähigen extrazelluläre DNA durch Hitzeschocktransformation aufzunehmen, musste dieser erst die entsprechende Kompetenz erlangen. Dazu wurden Zellen aus der -80°C Kühlung in einer Flüssigkultur mit LB-Medium für ClearColi® (10 ml) angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und schütteln (110 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml der ÜN-Kultur in 500 ml LB-Medium für ClearColi® umgesetzt und bei 37°C und schütteln (110 rpm) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert. Es folgte die Zellernte bei konstant 4°C. Initial wurde die Kultur bei 4°C und 2300 xg 8 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgte das Resuspendieren des Zellsediments in 50 ml kaltem Puffer 1 und eine Inkubationsphase von 20 min auf Eis. Darauffolgend wurde erneut bei 4°C und 2300 xg für 6 min zentrifugiert und das gewonnene Zellsediment in 10 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis zu je 100 µl in 1,5 ml Reaktions-Röhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 3.3.2 Transformation kompetenter *E. coli* mit rekombinanten Plasmiden

Verwendete Puffer und Lösungen:

*LB-Medium (lysogeny broth): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 Liter A. dest.*

*LB-Medium für ClearColi®: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 Liter A. dest.*

*LB-Agar: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 12 g Agar auf 1 Liter A. dest.*

Für die Transformation von *E. coli* mit rekombinanter Plasmid-DNA kamen chemo-kompetente Zellen zum Einsatz, d.h. mit der Fähigkeit freie DNA mittels Hitzeschock aufzunehmen.

In dieser Arbeit wurden die chemokompetenten Bakterienstämme *E. coli* DH5 $\alpha$  und *ClearColi*<sup>®</sup> BL21 (DE3) mit den rekombinanten Plasmiden pETlip3*metQ*, pETlip3*dacB*, pETlip3*pnrA* und pETlip3*psaA*, sowie pET28TEV*metQ*, pET28TEV*dacB*, pET28TEV*pnrA* und pET28TEV*psaA* wie nachfolgend beschrieben transformiert.

Die Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 400 ng (pETlip3*metQ*), 200 ng (pET28TEV *dacB*) Ligationsansatz bzw. 2-3  $\mu$ l rekombinante Plasmid-DNA zu 100  $\mu$ l der Zellen gegeben. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubationszeit auf Eis gefolgt von 45 s Hitzeschock bei 42°C und erneut 2 min Inkubation auf Eis. Darauf folgte die Zugabe von 900  $\mu$ l LB-Medium bzw. LB-Medium für *ClearColi*<sup>®</sup> und 60 min Inkubationszeit bei 37°C im Schüttelinkubator bei 110 rpm. Jeweils 100 und 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurde auf Selektiv-Agarplatten (je nach vorhandenem Resistenzgen) ausgestrichen. Diese wurden entsprechend der Anforderungen der verwendeten Bakterien bei 37°C im Brutschrank kultiviert (DH5 $\alpha$ : 24 h; *ClearColi*<sup>®</sup>: 36-48 h).

Entsprechend gewachsene Klone wurden an den Folgetagen auf neuen Selektiv-Agarplatten ausgestrichen und eine Kolonie-PCR der entsprechenden Kolonien wurde durchgeführt.

### 3.3.3 Isolation von PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

Verwendete Puffer und Lösungen:

*PBS-Puffer (phosphate buffered saline): 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,42 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,27 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*

*RPMI1640 Medium mit Zusätzen: 20 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) inaktiviertes FCS, 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat Lösung, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin*

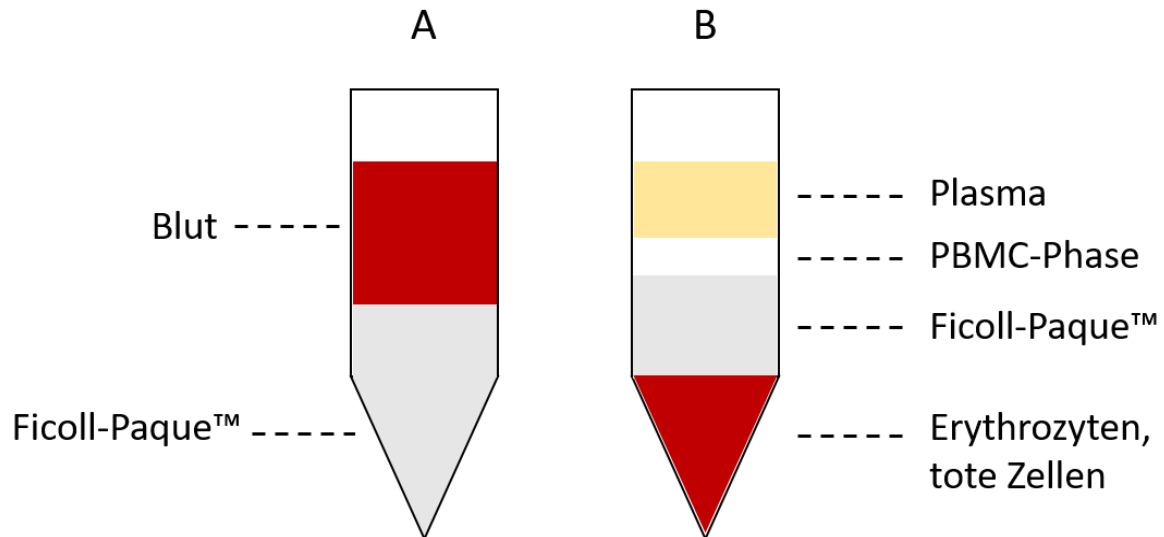
Die für die Experimente von freiwilligen Spendern stammenden und mit deren Zustimmung verwendeten Buffy Coats, wurden an der Universitätsmedizin Greifswald abgenommen (Greifswald, Deutschland). Die Studie wurde durch die regionale Ethikkommission in Greifswald genehmigt (**Ethikvotum: BB 014/14**). Die Studie wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Zur Isolation von humanen PBMCs wurde unter sterilen Bedingungen Blut aus Buffy Coats in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. In drei neuen 50 ml Gefäßen wurden je

20 ml Ficoll-Paque™ PLUS vorgelegt und anschließend je 20 ml Blut vorsichtig mittels serologischer Pipetten auf das Ficoll geschichtet. Das Ficoll erlaubt wegen seiner Polymerbeschaffenheit nur Blutbestandteilen höherer Dichte während des Zentrifugierens das Absetzen am Boden des Reaktionsgefäßes, während weniger Dichte Bestandteile sich schichtweise über dem Ficoll separieren. So entsteht ein weißer Ring bestehend aus Monozyten und Lymphozyten (PBMC) überlagert von Blutplasma (Abbildung 2). Die Zentrifugation muss mit minimaler Beschleunigung und ohne Bremse durchgeführt werden (931 xg, 20 min bei Raumtemperatur), um die instabile Dichteschichtung nicht zu stören. Der weiße Ring aus PBMCs wurde mittels Plastikpipetten abgenommen und in je ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden auf 50 ml mit sterilem 1x PBS überschichtet und anschließend zentrifugiert (380 xg, 7 min), um etwaige Thrombozyten auszuwaschen. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf 1 ml verworfen und die Zellen sanft suspendiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift durch auffüllen auf 50 ml mit 1x PBS Puffer und Zentrifugation (380 xg, 7 min). Um Verunreinigungen durch Erythrozyten zu beseitigen, wurden die Zellen mit 10 ml (Red blood cell) RBC-Lysis-Puffer bei 37°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen in ca. 10 ml RPMI1640 Medium ohne Zusätze resuspendiert und in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt. Den Monozyten wurde nun für 45 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> ermöglicht am Flaschenboden zu adhären. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS vorsichtig gewaschen und Lymphozyten sowie Verunreinigungen mit dem restlichen Medium und PBS abgenommen und verworfen. Die Monozyten konnten nach Zugabe von etwas RPMI1640 Medium mittels Zellschaber gelöst und abgenommen werden. In Medium resuspendiert erfolgte die Zählung der Zellen nach Verdünnung einer Probe im Verhältnis 1:10 in Trypan-Blau in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung folgender Formel:

$$\text{Zellzahl in Lösung} = \frac{\text{gezählte Zellen gesamt}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 10000$$

Die Zellen wurden erneut bei 380 xg für 7 min zentrifugiert und in entsprechendem Volumen RPMI1640 resuspendiert, um 5x10<sup>5</sup> Zellen in 1 ml pro Kavität in einer 24-well Platte auszusäen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.



**Abbildung 2: Schema der Dichtezentrifugation von PBMCs**

Dargestellt ist die Schichtung des Buffy-Coat-Blutes auf Ficoll Paque™ PLUS vor Zentrifugation (A). Nach Zentrifugation ohne Bremse und mit minimaler Beschleunigung (B) ergibt sich die dichteabhängige Schichtung von Plasma und der PBMC-Phase (weißer Ring), welche der Ficoll-Phase aufliegt. Am Boden des Reaktionsgefäßes sammeln sich Erythrozyten und tote Zellbestandteile.

### 3.3.4 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen-Subpopulationen (M1, M2a)

Zur Differenzierung von Monozyten zu pro-inflammatorischen Makrophagen (M1) sowie anti-inflammatorischen Makrophagen (M2a) wurden die Stimulantien GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor) für M1 und M-CSF (Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor) für M2a Differenzierung eingesetzt. Die Stimulation mit M-CSF erfolgte mit 50 ng/ml und bei GM-CSF mit 25 ng/ml. Die Stimulationsdauer betrug 7 Tage mit Mediumwechsel alle 48-72 Stunden. Zur endgültigen Differenzierung der Makrophagen in ihre Subpopulation wurde für weitere 48-72 Stunden mit 100 ng/ml LPS für M1 und 20 ng/ml IL4 für M2a Makrophagen stimuliert.

### 3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Verwendete Puffer und Lösungen:

*TBS-Tween 20 0,05% (TBS-T)*

*1 % (v/v) Triton X-100 in TBS-Tween 20 (TBS-T)*

*5 % (v/v) FCS in TBS-Tween 20 (Blockierungslösung 1)*

*1 % (v/v) normales Ziegen Serum in TBS-T (Blockierungslösung 2)*

*1% (w/v) BSA, 0,5% (v/v) Triton X, TBS-T (Antikörper-Diluent)*

*ProLong Diamond Antifade Mountant Medium (Invitrogen)*

Zum Nachweis der Differenzierung in M1 und M2a-Makrophagen, wurden die für die jeweilige Zellklasse höher exprimierten, spezifischen Marker (CD206 für M2a, CD86 für M1 und CD68 als allgemeiner Makrophagen-Marker) mittels Fluoreszenz detektiert und am Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Hierfür wurden die humanen Monozyten in Zellkultur auf Glasplättchen (ca. 1,8 cm<sup>2</sup>) in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät und entsprechend 3.3.4 zu M1 und M2a Makrophagen differenziert. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die Glasplättchen entnommen und 15 min mit TBS-T inkubiert. Anschließend wurde zur Reinigung und Permeabilisierung der Zellen 20 min mit 1 % Triton X-100 Lösung inkubiert. Es folgte ein 30-minütiger Absättigungsschritt unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung 1 bei RT. Anschließend wurde 3 mal 2 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 2 bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 2 min, wurde das Antikörper-Diluent, welches mit Anti-CD68 (Maus-Anti-Mensch CD68 1:500) und Anti-CD86 (Kaninchen-Anti-Mensch CD86 1:1000) versetzt wurde, auf die Zellen gegeben und diese ÜN bei 4°C inkubiert. Es folgten drei 2-minütige Waschungen mit TBS-T. Die sekundären Antikörper gegen CD68 (Ziege-Anti-Maus IgG, Alexa Fluor® 546), sowie gegen CD86 (Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor® 488) wurden als 1:500 Verdünnung für 30 min bei RT und Dunkelheit auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 2 min mit TBS-T gewaschen. CD206 wurde mittels einem Kaninchen-Anti-Mensch CD206 Antikörper (1:1000 Verdünnung in Antikörper-Diluent) markiert. Dieser Antikörper ist direkt mit Alexa Fluor® 647 gekoppelt und benötigt daher keinen sekundären Antikörper für Fluoreszenzmarkierung. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 4°C. Die Zellen wurden dreimal 2 min mit TBS-T gewaschen bevor die Glasplättchen auf einen mit einem Tropfen Mounting-Medium besetzten Objektträger aufgebracht wurden. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenz-Mikroskop.

### 3.3.6 Stimulation differenzierter M1 und M2a Makrophagen mit Proteinen

Verwendete Puffer und Lösungen:

*RPMI1640 Medium mit Zusätzen: 20 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) inaktiviertes FCS, 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat Lösung, 1% (v/v) Pennicillin/Streptomycin*

Um die Immunantwort gegen die Proteine MetQ, Lip-MetQ, DacB, Lip-DacB, PnrA, Lip-PnrA, PsaA, Lip-PsaA zu analysieren, sollten M1 und M2a Makrophagen mit den entsprechenden Proteinen inkubiert werden,

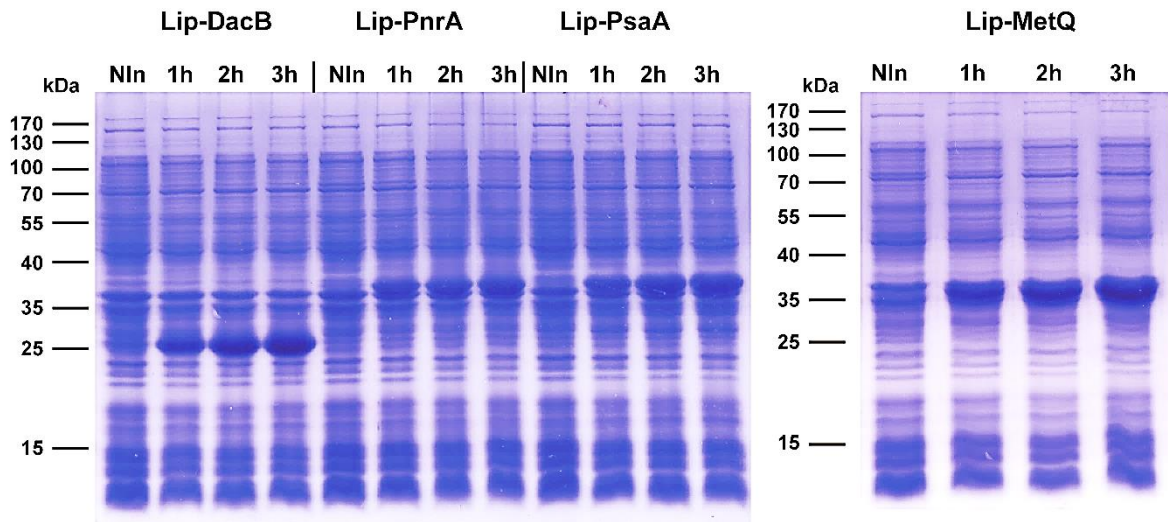
Nach erfolgreicher Polarisierung der Monozyten zu den genannten Makrophagen-Klassen, wurde von diesen das stimulanzhaltige Medium abgenommen. Es wurden Medium-Aliquots vorbereitet, die eine Proteinkonzentration von 1,25 µg/ml enthielten. Je 1 ml proteinhaltiges Medium wurden pro Vertiefung zu den Makrophagen gegeben. Als Negativkontrolle wurde mit PBS inkubiert. Zur Positivkontrolle wurden M1 Makrophagen mit IL4 und M2a Makrophagen mit LPS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h wurden die Überstände in 1,5 ml Reaktionsgefäße abpipettiert und 6 min bei 1500 xg zentrifugiert, um etwaige Zellen aus den Überständen zu isolieren. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Heterologe Expression der lipidierten und nicht-lipidierten Proteine MetQ, DacB, PnrA und PsaA in *E. coli***

Für die heterologe Expression wurde das *metQ*-Gen, nach Amplifizierung aus dem Genom von *S. pneumoniae* TIGR4*lux* mittels PCR, in das pETlip3 Plasmid kloniert. Für die heterologe Expression des LipMetQ-Proteins wurde der *E. coli* Stamm *ClearColi*® BL21 (DE3) mit dem klonierten Plasmid pETlip3*metQ* transformiert. Die bereits in *E. coli* DH5α vorliegenden Plasmide pETlip3*dacB*, pETlip3*pnrA* und pETlip3*psaA* wurden isoliert und *ClearColi*® BL21 (DE3) Stämme wurden ebenfalls mit diesen anderen Plasmiden transformiert. Identisch wurde für die Klonierung von *dacB* in das pET28TEV Plasmid verfahren. Die Klonierung der *dacB* und *metQ*-Gene wurde mittels Sequenzierung („Eurofins, Hamburg“) bestätigt. Die bereits in der Arbeitsgruppe Hammerschmidt vorliegenden Plasmide pET28TEV*metQ*, pET28TEV*pnrA* und pET28TEV*psaA* (Voß et al. 2018) wurden aus *E. coli* DH5α isoliert und *ClearColi*® BL21 (DE3) mit diesen transformiert. *ClearColi*® BL21 (DE3) wurde für die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen ausgewählt, da dieser *E. coli* Stamm ein modifiziertes LPS, welches keine Immunogenität im menschlichen Organismus mehr besitzt, enthält. Für die Analyse der Immunantwort der heterolog exprimierten Proteine ist dies von besonderem Stellenwert, da sonst die Ergebnisse durch das LPS und die Aktivierung des TLR4 Signalweges verfälscht würden.

Die Proteinexpression wurde in je 800 ml *ClearColi*® BL21 (DE3) pETlip3*dacB*, -*pnrA*, *psaA* und *metQ* Kulturen mit Kanamycin (50 µg/ml) mittels 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Proben wurden vor der Induktion und ab einer 3-stündigen Induktion jeweils alle 60 Minuten entnommen, um die Expression der lipidierten Proteine zu analysieren. Die Auswertung erfolgte nach Lyse der Zellen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Diese Untersuchungen zeigten eine sehr gute Expression der lipidierten Proteine (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Heterologe Expression lipidiierter Pneumokokken-Proteine**

Entnahme von Induktionsproben Lip-DacB, Lip-PnrA, Lip-PsaA und Lip-MetQ; Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE; vor Induktion (NIn), 1 h, 2 h und 3 h nach Induktion.

Die heterologe Expression der nicht-lipidierten Proteine erfolgte äquivalent zu der oben beschriebenen Methode für die lipidierten Proteine. Eine Expressionskontrolle wurde hierbei nicht durchgeführt. Die Reinigung mit dem *ÄKTApurifier protein purification system* erfolgte unter Nutzung einer *HisTrap™ FF crude 1ml Säule*. Abbildung 4A und 4B zeigen exemplarisch die Chromatogramme für die Reinigung lipidiertes Proteine (Lip-MetQ) bzw. nicht-lipidiertes Proteine (MetQ). Gut erkennbar ist hier die mit steigendem Imidazolgradienten anwachsende eluierte Proteinmenge, verdeutlicht durch eine ansteigende UV Absorption. Die Chromatogramme der übrigen Proteine sind im Anhang (Abbildung 1-3) dargestellt. Nach der Reinigung erfolgte die Dialyse der entsprechend proteinreichsten Fraktionen aus dem Elutionspuffer in 1x PBS.

Die Reinheit und Integrität der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft (Abbildung 5). Mittels Western Blot und proteinspezifischer Antikörper konnten die Proteine in ihrer Identität bestätigt werden. Mittels Massenspektrometrie durch die AG Prof. Becher (Institut für Mikrobiologie Universität Greifswald) wurden die Proteine und die Identität der zusätzlichen Banden als mögliche Dimere im Abgleich mit der Datenbank für Proteine aus dem Pneumokokken-Stamm TIGR4 bestätigt. Verunreinigungen der gereinigten Proteine konnten ausgeschlossen werden. Sowohl im Silbergel als auch im Western-Blot fällt auf, dass PsaA und Lip-PsaA nur



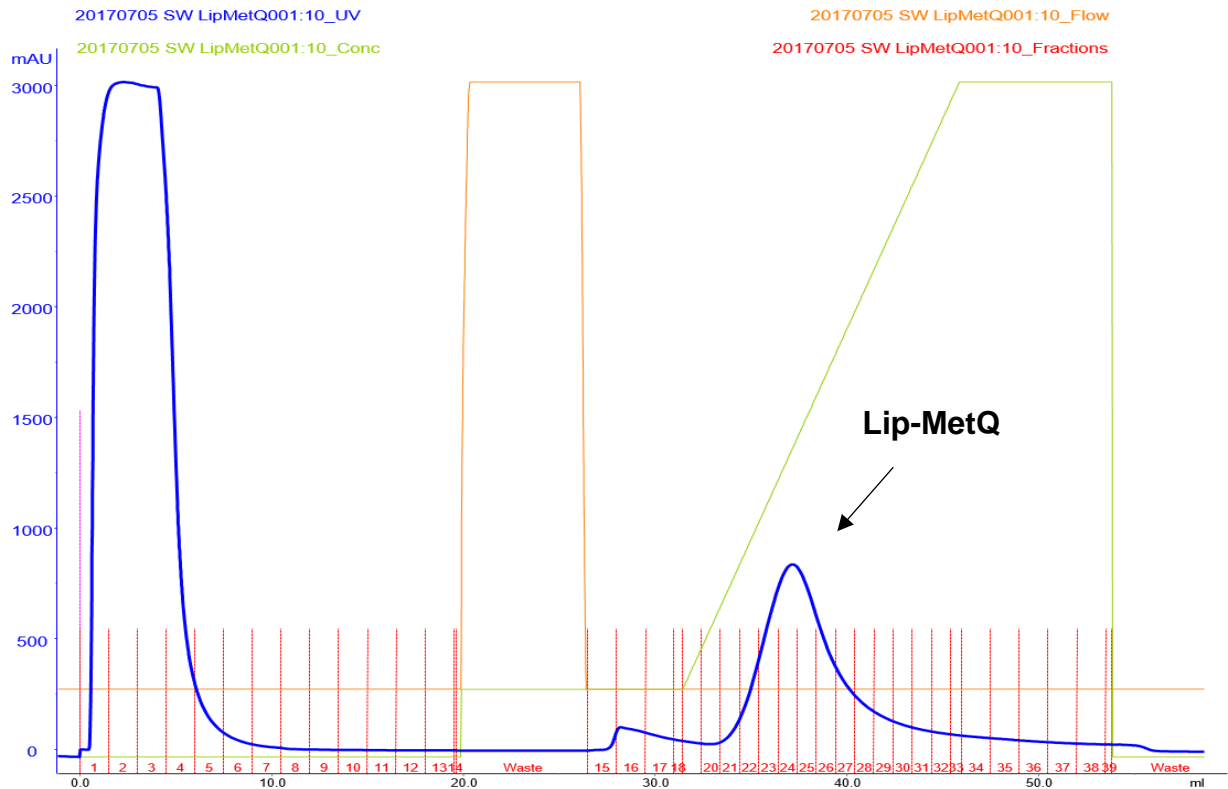
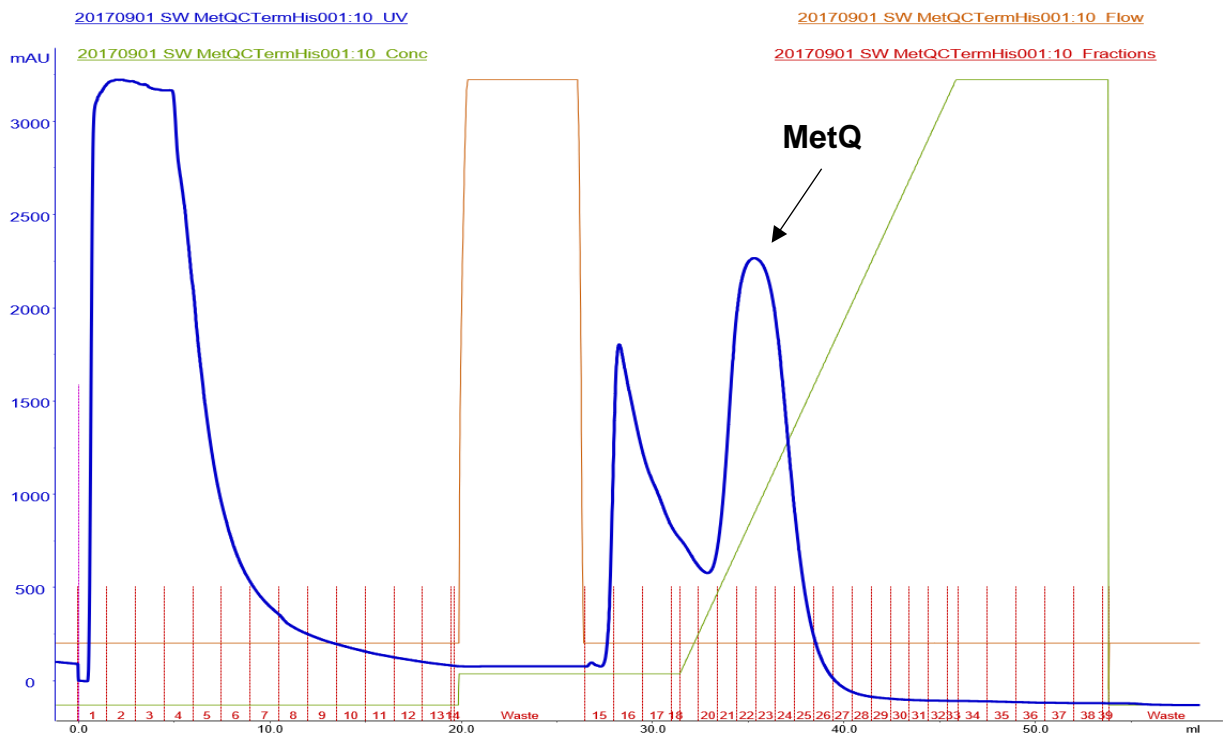
als Doppelbande auftreten. Hierbei handelt es sich um eine Degradation, welche während der Dialyse gegen 1x PBS auftrat und eine Abhängigkeit von der Imidazolkonzentration des Puffers aufwies.

Die Lipidierung der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie des Kooperationspartners Dr. Dominik Schwudke des Forschungszentrums Borstel nachgewiesen (Doktorarbeit F. Voß).

Abschließend konnten nach chromatografischer Reinigung und Dialyse gegen 1x PBS die in Tab. 24 aufgeführten Protein-Konzentrationen gewonnen werden.

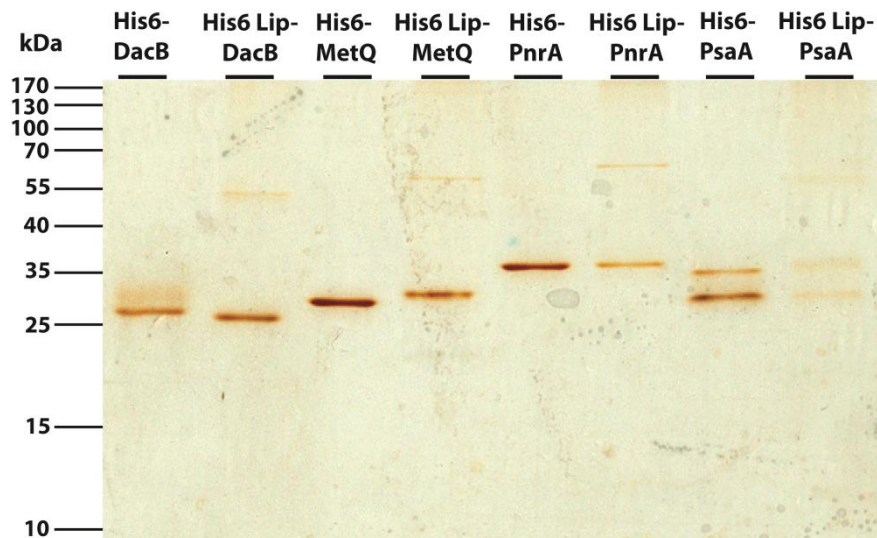
**Tabelle 24 : Proteinkonzentrationen nach Reinigung und Dialyse**

<b>Protein</b>	MetQ	Lip-MetQ	DacB	Lip-DacB	PnrA	Lip-PnrA	PsaA	Lip-PsaA
<b>Konz. mg/ml</b>	2,30	0,64	0,62	0,27	2,13	0,31	2,56	0,18

**A****B**

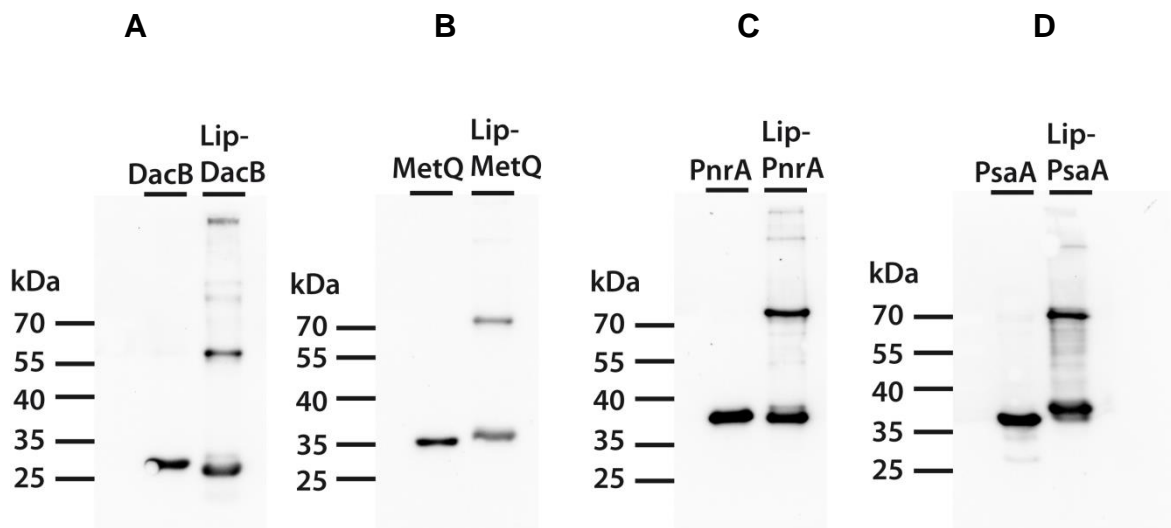
**Abbildung 4: Chromatogramme der Protein-Reinigung**

Reinigung von Lip-MetQ (A) und MetQ (B) mit dem ÄKTapurifier System und HisTrap™ Säule; Blau dargestellt, die Absorption bei 280nm, der jeweils zweite Anstieg entspricht dem Proteingehalt im Eluat; Grün ist der Imidazol-Gradient dargestellt.



**Abbildung 5: Silberfärbung der lipidierten und nicht-lipidierten Pneumokokken Protein nach SDS-PAGE**

Die heterolog exprimierten, gereinigten und in PBS dialysierten lipidierten und nicht-lipidierten Proteine DacB, MetQ, PnrA und PsaA jeweils mit His<sub>6</sub>-Tag. Färbung mittels Silbernitrat zur Kontrolle der Reinheit. Als Marker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder mit aufgetragen



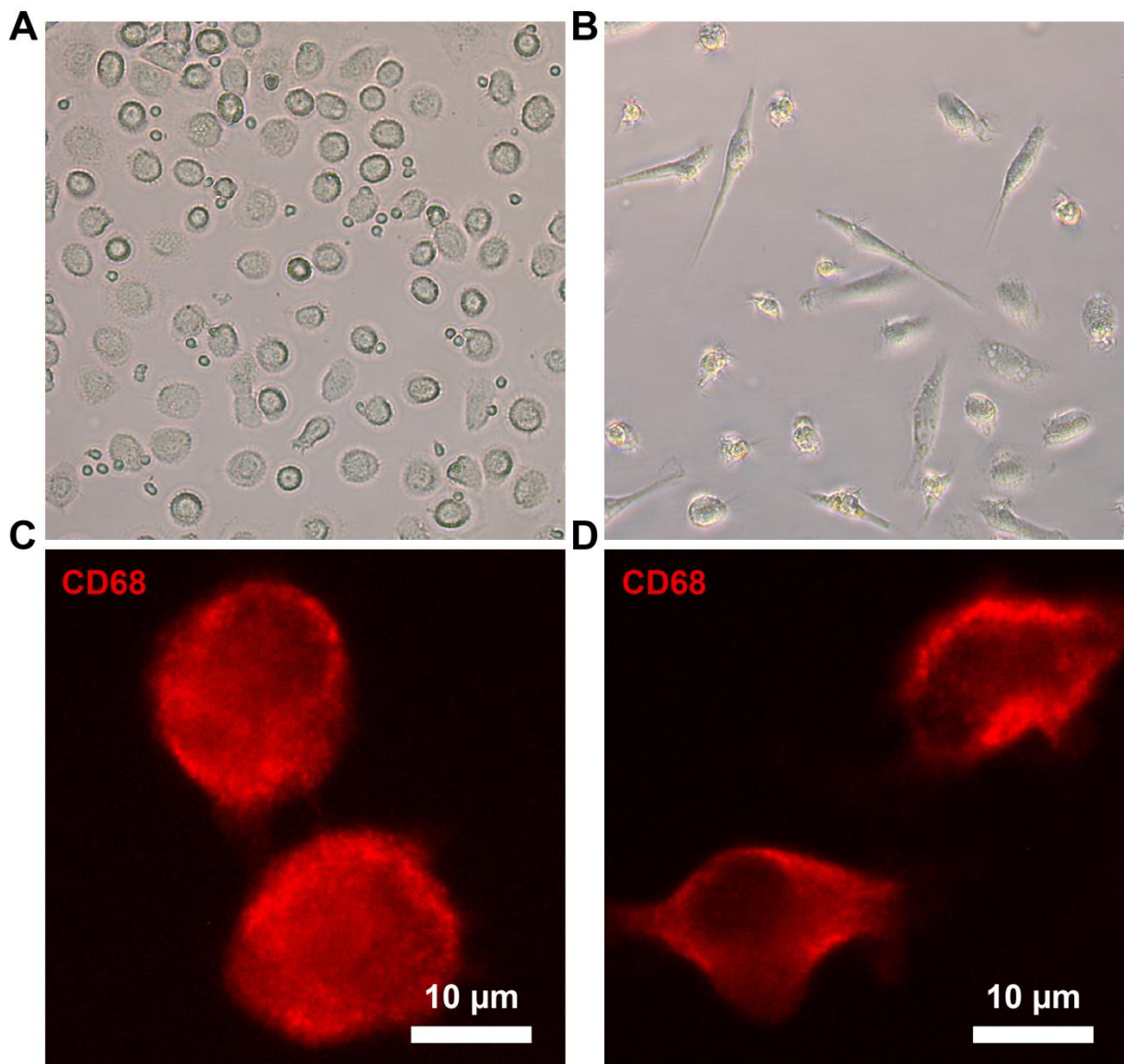
**Abbildung 6: Western Blot-Analyse heterolog exprimierter Proteine**

Die heterolog exprimierten lipidierten und nicht-lipidierten Proteine, nachgewiesen mittels proteinspezifischer Maus IgG Antikörper. **A:** DacB (25,09 kDa), Lip-DacB (25,9 kDa); **B:** MetQ (29,7 kDa), Lip-MetQ (30,5 kDa); **C:** PnrA (35,3 kDa), Lip-PnrA (36,2 kDa); **D:** PsaA (33,1 kDa), Lip-PsaA (33,9 kDa). Als Marker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder mit aufgetragen

## 4.2 Differenzierung von humanen Blut-Monozyten zu M1- Makrophagen und M2a-Makrophagen

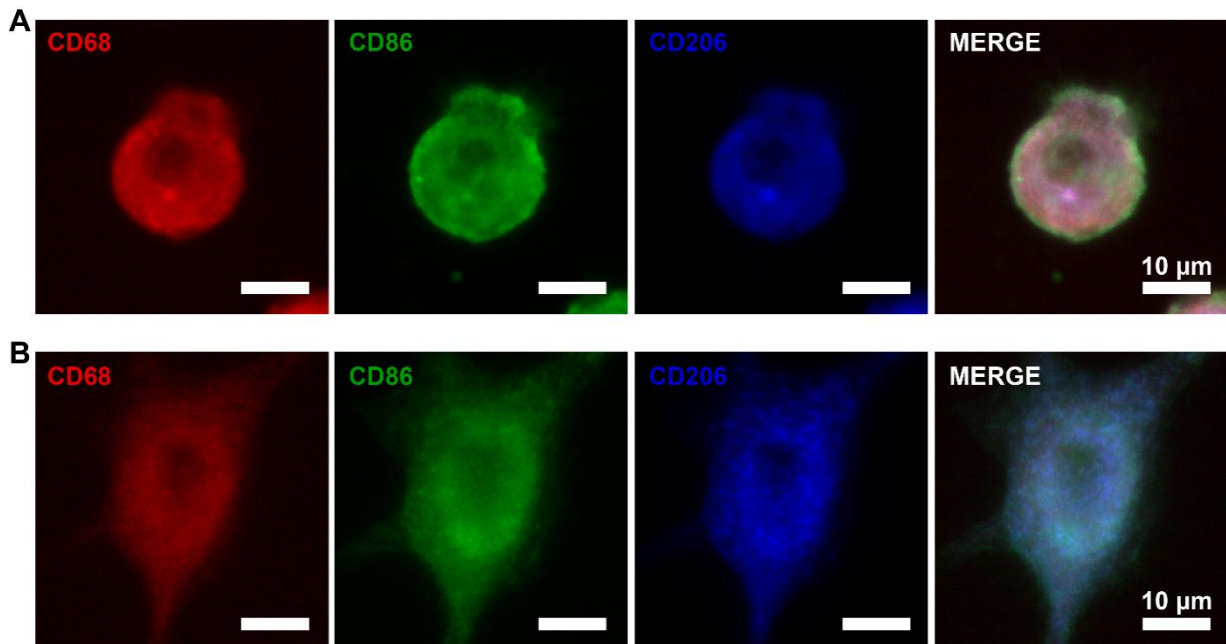
Nach Isolation und Stimulation wiesen die pro-inflammatorischen M1 Makrophagen ( $M\Phi$ ) phänotypisch eine Vergrößerung und eine „Spiegelei“ Form auf, während sich die anti-inflammatorischen M2a Makrophagen durch eine spindelförmige Fibroblasten-ähnliche Morphologie auszeichneten, im Gegensatz zu den wesentlich kleineren runden unpolarisierten Monozyten (Abbildung 7). Die phänotypischen Merkmale sind jedoch aufgrund der oben beschriebenen Plastizität der Makrophagen und ihrer phänotypischen Dynamik als Nachweis der Differenzierung nicht ausreichend. Die Differenzierung wurde aus diesem Grund mittels spezifischer Antikörper und Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Anhand erhöhter CD86 Oberflächen-Expression kann auf M1 Differenzierung geschlossen werden, während eine erhöhte CD206 Oberflächen-Expression auf M2a Differenzierung hinweist (Mantovani et al. 2004; Porcheray et al. 2005). Das intrazelluläre CD68 dient als allgemeiner Marker zum Nachweis von Makrophagenpopulationen (Barros et al. 2013). Es wurden entsprechende fluoreszenz-markierte Antikörper gegen die genannten Marker eingesetzt (siehe Tab. 13) (Abbildung 7). Anhand der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich die unterschiedlich hohe Expression der Oberflächenmarker der verschiedenen polarisierten  $M\Phi$  erkennen. Die Zellen zeichnen sich dabei durch Expression beider Marker, mit einer erhöhten Expression des der Polarisation entsprechenden Markers aus. Im Vergleich beider Differenzierungswege weist die M1 Population eine erhöhte Expression von CD86 (grün) auf während die M2a Population eine vermehrte Expression von CD206 (blau) zeigt, was auf eine erfolgreiche Differenzierung der humanen Monozyten zu sowohl M1 als auch zu M2a  $M\Phi$  schließen lässt (Abbildung 8). Der Nachweis wurde mittels Fluoreszenz-Intensitätsmessung durchgeführt (Masterarbeit Stephan M. Schneiders<sup>2</sup>).

<sup>2</sup> Masterarbeit Stephan M. Schneiders, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung für molekulare Genetik und Infektionsbiologie; Prof. Hammerschmidt



### Abbildung 7: Differenzierte Makrophagenpopulationen

Aus PBMC differenzierte humane pro-inflammatorische (M1) Makrophagen (A), stimuliert mittels GM-CSF und LPS und anti-inflammatorische (M2a) Makrophagen (B), stimuliert mittels M-CSF und IL-4, im Lichtmikroskop bei 20x Vergrößerung. Erkennbar sind die phänotypischen Unterschiede der beiden Polarisationen. Mittels CD68 spezifischer Fluoreszenz markierter Antikörper wurden die Zellen beider Polarisationen (M1 C) als Makrophagen bei 40x Vergrößerung nachgewiesen (M2a D).



**Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopie polarisierter Makrophagen**

Nachweis des intrazellulären Makrophagenmarkers CD68 (rot) sowie der Oberflächenmarker CD86 (grün M1) und CD206 (blau M2a) mit Fluoreszenz markierter Antikörper. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 40x Vergrößerung von (A) pro-inflammatorischen und (B) anti-inflammatorischen Makrophagen.

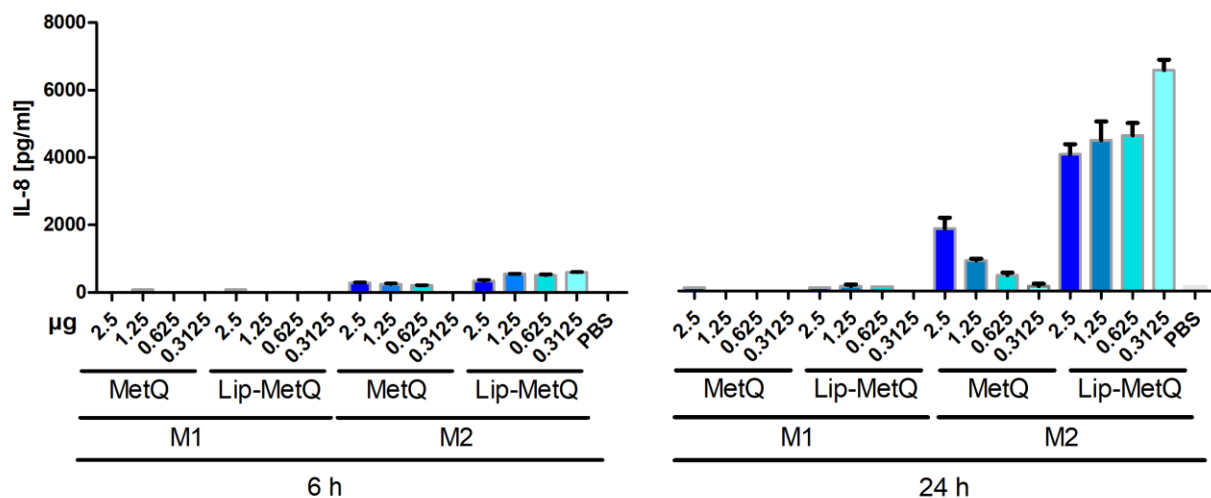
#### 4.3 Von M1 und M2a Makrophagen vermittelte Immunantwort gegen lipidierte und nicht-lipidierten Pneumokokken-Proteine

Zur Beurteilung der durch lipidierte und nicht-lipidierte Proteine hervorgerufenen Immunantwort wurden differenzierte humane Makrophagen wie in 3.3.6 beschrieben mit Proteinen stimuliert.

Um die geeigneten Konzentrationen an Protein für die Inkubation sowie den Zeitpunkt der Analysen festzulegen, wurde ein Vorversuch mit Makrophagen von einem Spender durchgeführt. Hierbei wurden die Makrophagen mit je 0,3125 bis 2,5 µg/ml MetQ in lipidiertem und nicht-lipidiertem Zustand inkubiert. Die Überstände wurden nach 6 h und 24 h abgenommen und nach Zentrifugation bei -20°C bis zur Analyse mittels ELISA gelagert. In dieser Versuchsanordnung wurde die IL-8 Produktion gemessen. Es zeigte sich eine mit der Zeit ansteigende Cytokinproduktion sowie eine intensivere Immunantwort der Zellen auf das lipidierte Lip-MetQ im Gegensatz zu dem nicht-lipidiertem MetQ.



Die M1-Makrophagen reagierten auf den Proteinstimulus mit kaum messbarer Cytokinproduktion während die M2a-Makrophagen deutlich messbare Cytokinlevel freisetzen. Anhand der Ergebnisse des Vorversuches (Abbildung 9) wurde für die Stimulation im größeren Maßstab die einzusetzende Proteinkonzentration von lipidierten sowie nicht-lipidierten Proteinen auf 1,25 µg/ml und der Ablesezeitpunkt auf 24 h festgelegt.



### Abbildung 9: IL-8 Produktion nach Inkubation mit MetQ/Lip-MetQ

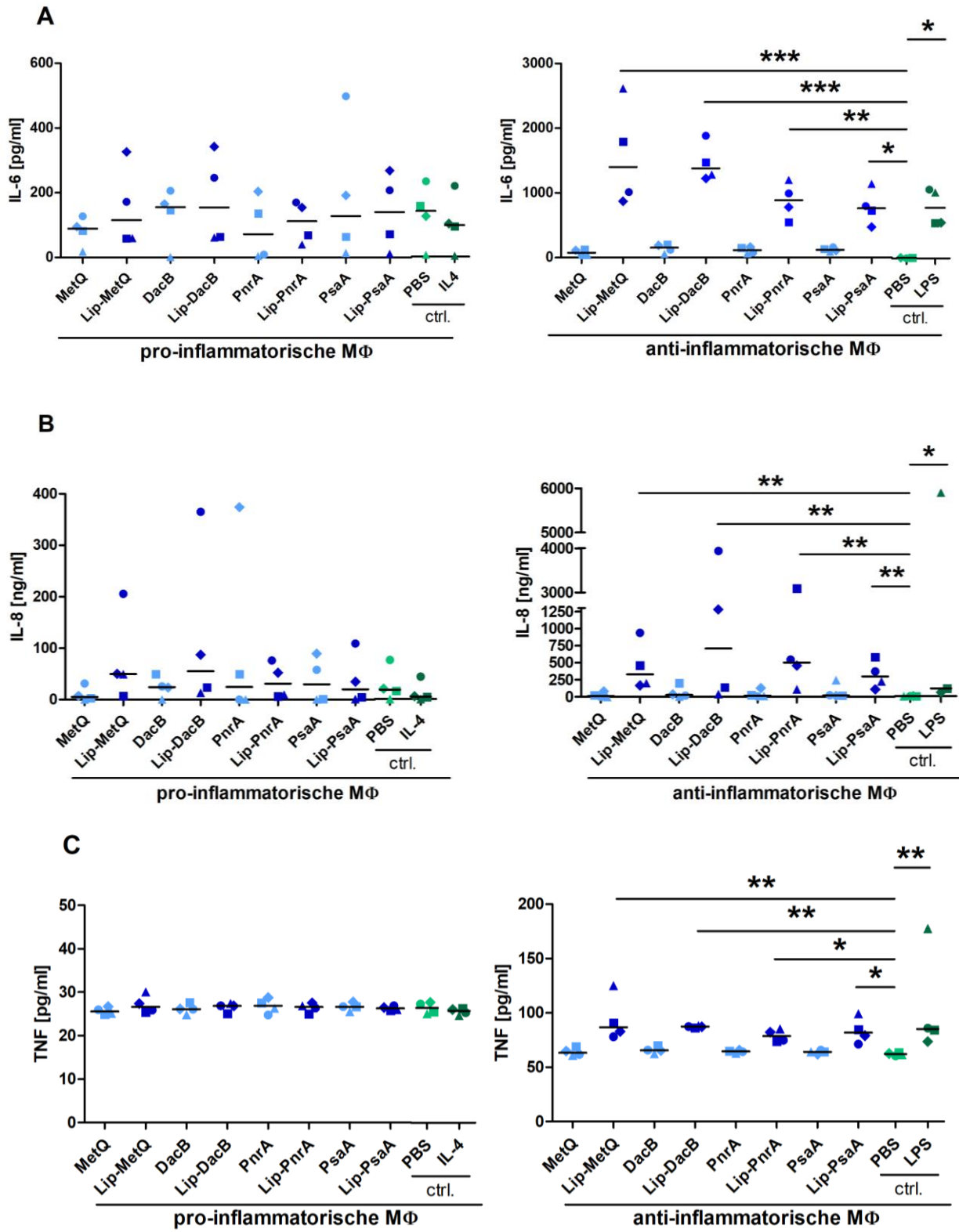
Titration zum Ermitteln der optimalen Proteinkonzentration als Stimulus mit nicht-lipidiertem MetQ (MetQ) und lipidiertem MetQ (Lip-MetQ). Eingesetzt wurden Konzentrationen von 0,3125 bis 2,5 µg in 1 ml Medium. Gemessen wurde die IL-8 Produktion von M1 und M2a (M2) Makrophagen von einem Spender nach 6 und 24 h in pg/ml. PBS dient als Negativkontrolle.

Der Hauptversuch wurde mit polarisierten Makrophagen von vier Spendern durchgeführt. Nach der Stimulation durch lipidierte und nicht-lipidierte Proteine für 24 h wurden die gesammelten Überstände bei -20°C gelagert. Die Untersuchung von IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 (CXCL8) und TNFα-Produktion wurde mittels Multiplexverfahren durch den AYOXXA Lunarix™ Reader und dem LUNARIS™ Human 5-Plex Cytokine Kit durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass sowohl IL-1β als auch IL-2 in nicht messbaren Konzentrationen exprimiert wurden. Diese Cytokine sind deshalb hier nicht graphisch abgebildet. Die Produktion von IL-6, IL-8 sowie TNF andererseits durch M1 und M2a Makrophagen konnte in den Überständen nachgewiesen und ausgewertet werden. Hierbei fallen, wie auch im Vorversuch bereits beschrieben, starke Unter-

schiede in der Reaktion der M1 und der M2a Makrophagen auf den Stimulus mit lipidierten Proteinen auf. Ebenfalls reproduzierbar war die allgemein kaum messbare Cytokinexpression der M1 Makrophagen auf den Stimulus sowohl mittels lipidierten als auch nicht-lipidierten Proteine. Die anti-inflammatorischen Makrophagen zeichneten sich durch eine signifikante IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  Produktion nach Stimulation mit lipidierten Proteinen im Gegensatz zu den nicht-lipidierten Proteinen in Relation zur Negativkontrolle PBS aus ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 10). Die gemessenen IL-8 Konzentrationen waren deutlich höher als die ermittelten IL-6 und TNF $\alpha$  Konzentrationen und befanden sich im hohen ng/ml Bereich (Abbildung 10 B).



- ◆ Donor 1
- Donor 2
- Donor 3
- ▲ Donor 4



### **Abbildung 10 Cytokin Produktion**

Cytokin Produktion **A:** IL-6 Produktion in pg/ml; **B:** IL-8 Produktion in **ng/ml** **C:** TNF $\alpha$  Produktion in pg/ml von M2a und M1 Makrophagen (M $\Phi$ ) auf Proteinstimulus mit Lipidierung (Lip) und ohne Lipidierung ( $\emptyset$ ) nach 24 h. Die Punktauftragungen zeigen den Median sowie die Einzelwerte der vier Spender. PBS dient als Negativ-Kontrolle, LPS als positiv-Kontrolle bei M2a M $\Phi$ , IL-4 als positiv-Kontrolle bei M1 M $\Phi$  (ctrl.). Proteinkonzentration jeweils 1,25  $\mu$ g/ml; Statistik: Graphpad Prism<sup>®</sup>; Kruskal-Wallis Test + Dunn Verfahren; \*p<0,05

## **6. Diskussion**

Die Suche nach Serotyp-unabhängigen Impfstoffen gegen *S. pneumoniae* Infektionen hat gezeigt, dass Vakzine, welche auf Oberflächenproteinen, besonders den Lipoproteinen des Bakteriums basieren, eine Serotyp-unabhängige Immunität in Mäusen generieren können. Das Lipoprotein PsaA stellte sich in Untersuchungen an Mäusen bereits als vielversprechender Kandidat für proteinbasierte Impfstoffe dar (Briles et al. 2000; Ogunniyi et al. 2000; Whaley et al. 2010; Moffitt et al. 2014).

Um die Lipoproteine MetQ, DacB, PnrA und PsaA auf ihre Eignung als Vakzinkandidaten im Menschen zu überprüfen, wurde die Immunogenität der Proteine gegenüber Zellen des angeborenen menschlichen Immunsystems untersucht. In diesem ex vivo Ansatz stellen entsprechende Reaktionen von Makrophagen die Korrelate der Protektion dar. Dazu gehört die Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine sowie eine verstärkte Expression von sowohl MHC Molekülen, als auch weiterer co-stimulierender Faktoren wie CD40, CD80, CD86, die an der Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems beteiligt sind (Akira und Takeda 2004; Hoebe et al. 2004).

Das Augenmerk dieser Untersuchung lag auf der Cytokinproduktion von Makrophagen. Zu diesen Zweck wurden humane Monozyten in pro-inflammatorische (M1) und anti-inflammatorische (M2a) Makrophagen polarisiert, da diese Zellen früh mit Antigenen in Kontakt kommen und eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellen (Hoebe et al. 2004). Pneumokokken treffen dabei sowohl im oberen als auch im unteren respiratorischen Trakt auf ortsständige Makrophagen und andere professionelle Phagozyten. Diese Zellen setzen wiederum Chemokine wie CCL2 frei und rekrutieren somit weitere Monozyten (Davis et al. 2011; Miyaji et al. 2013). M1 und M2a Makrophagen besitzen unterschiedliche physiologische Funktionen, von der Entzündungsförderung mit antimikrobiellen Eigenschaften bis zur Gewebsregeneration und Homöostase (Porcheray et al. 2005). Makrophagen spielen für den Aufbau einer suffizienten Immunantwort bei Vakzinierung als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle. Als Teil des angeborenen Immunsystems kommen sie frühzeitig mit dem Agens in Kontakt. Die Zellen präsentieren nach Phagozytose und anschließender Prozessierung, die in diesem Fall bakteriellen Bestandteile, in Kombination mit freigesetzten Cytokinen mittels MHC II Molekülen naiven CD4 Lymphozyten (Clem 2011; Korn et al. 2009).

Durch Stimulation verschieden polarisierter Makrophagen mit Pneumokokken-Lipoproteinen in lipidiertem (Lip) und nicht-lipidiertem ( $\emptyset$ ) Zustand, lassen sich Erkenntnisse über die Immunreaktion gegenüber den beiden Proteinvarianten in verschiedenen Gewebeszuständen gewinnen. Die Intensität der Immunantwort lässt sich aus der Produktion verschiedener Cytokine und Chemokine der Makrophagen ableiten. Evaluiert wurde hierbei die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$ .

IL-6 stellt einen bedeutenden Botenstoff der pro-inflammatorischen Achse des Immunsystems dar. Es wird unter anderem von Makrophagen am Ort des Antigenkontaktes gebildet und erreicht über das Blut beispielsweise Leber und Knochenmark, wo es seine vielfältigen Effekte auslöst. So regt IL-6 die Leberzellen zur Bildung Akuter-Phase-Proteine, wie C-Reaktives Protein (CRP), Serum Amyloid A oder auch Fibrinogen an (Heinrich et al. 1990; Kishimoto 1989). Des Weiteren ist IL-6 dazu in der Lage B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen zu differenzieren (Kishimoto 1985) sowie naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Kombination mit TGF zu Th17 Zellen zu differenzieren. Auf diese Weise stellt IL-6 ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar (Korn et al. 2009).

Die durch anti-inflammatorische M $\Phi$  produzierten IL-6 Konzentrationen (pg/ml) (Abb. 10A) lassen deutlich die stärkere Immunogenität der lipidierten Proteine im Gegensatz zu den nicht-lipidierten Proteinen erkennen. Alle Proteine, MetQ, DacB, PnrA und PsaA induzierten in lipidiertem Zustand eine signifikant höhere IL-6 Produktion, verglichen mit PBS ( $p < 0,05$ ). Hierbei entsprechen die Mediane der IL-6 Konzentrationen von Lip-PnrA und Lip-PsaA ca. den Werten der positiv Kontrolle LPS während sowohl Lip-MetQ als auch Lip-DacB eine erkennbar stärkere Cytokinexpression als das LPS stimulieren. Die nicht lipidierten Proteine induzierten hierbei keine statistisch relevant gesteigerte Cytokinproduktion gegenüber PBS.

Die IL-6 Freisetzung durch pro-inflammatorische M $\Phi$  weist ein unspektakuläreres Bild auf (Abb. 10A). Es lassen sich keine relevanten Unterschiede in der Cytokinproduktion zwischen Lip-Proteinen und  $\emptyset$ -Proteinen erkennen. Des Weiteren liegt die Mehrzahl der IL-6 Level im Bereich der negativ Kontrolle PBS bzw. knapp darüber, was auf einen schwachen Stimulanzeffekt der Proteine schließen lässt.

In Abbildung 10B ist die Produktion von IL-8 durch sowohl anti-inflammatorische- als auch pro-inflammatorische Makrophagen nach Stimulation mit lipidierten sowie nicht-

lipidierten Proteinen dargestellt. IL-8, auch CXCL-8 genannt, ist ein chemotaktischer Botenstoff, der u.a. von Makrophagen produziert wird. Als Teil der frühen Immunantwort des angeborenen Immunsystems ist IL-8 maßgeblich an der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie deren Aktivierung beteiligt (Baggiolini und Clark-Lewis 1992) und eignet sich daher gut zur Erfassung von Immunreaktionen.

Es konnte eine signifikant stärkere IL-8 Freisetzung durch anti-inflammatorische M $\Phi$  (Abb. 10B) nach Stimulation mit allen vier lipidierten Proteinen gegenüber der negativ Kontrolle PBS nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Zu beachten ist hierbei, dass IL-8 in besonders hohen Konzentrationen (ng/ml) freigesetzt wurde. Andererseits erfuhr auch hier die durch die vier nicht lipidierten Proteine induzierte Cytokinproduktion keine statistisch relevante Steigerung gegenüber PBS.

Die in Abbildung 10B dargestellte Produktion von IL-8 durch pro-inflammatorische M $\Phi$  zeigt, dass hier die Intensität der Cytokinproduktion nur teilweise mit der Lipidierung der Proteine zusammenhängt. Die freigesetzten IL-8 Level durch nicht-lipidiertes MetQ bzw. DacB, aber auch von Lip-PnrA und sowohl von nicht-lipidierten PsaA als auch Lip-PsaA liegen im Bereich der negativ Kontrolle PBS. Lip-MetQ und Lip-DacB zeigen leicht höhere IL-8 Produktionen als ihre nicht-lipidierten Pendants. Die Mediane liegen jedoch um ca. eine Zehnerpotenz unter der durch anti-inflammatorische M $\Phi$  produzierten Konzentrationen an IL-8.

Die TNF $\alpha$ -Produktion der M1- und M2a-M $\Phi$ , stimuliert durch lipidierte und nicht-lipidierte-Proteine veranschaulicht Abbildung 10C. TNF (Tumor Nekrose Faktor) stellt einen wichtigen Aktivator entzündlicher Prozesse des Immunsystems dar und wird vorwiegend von aktivierten Makrophagen sowie T-Lymphozyten freigesetzt (Black et al. 1997). Die Großzahl der pro-inflammatorischen Eigenschaften von TNF lassen sich durch seinen Einfluss auf das Endothel des Gefäßsystems erklären. So präsentieren die Endothelzellen nach Stimulation mit TNF eine Reihe an Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche, welche für die Migration von Leukozyten in das Zielgewebe notwendig sind (Messadi et al. 1987; Pober et al. 1986; Munro et al. 1989). Weiterhin setzen die Zellen Chemokine wie IL-8 selbst frei, was zu einer gesteigerten Rekrutierung von Leukozyten führt. Die typischen lokalen Entzündungszeichen wie Rubor (Rötung) und Calor (Wärme) lassen sich auf gefäßdilatatorische Effekte von TNF, wie die endotheliale Produktion von PGI<sub>2</sub>, zurückführen, welche zu einem erhöhten

Blutfluss im lokalen Stromgebiet führen. Tumor (Schwellung) kann durch eine TNF bedingt gesteigerte Permeabilität der Endothelzellen hervorgerufen werden, wobei es zu einer erhöhten transendothelialen Flüssigkeitspassage in das Gewebe mit Ödem-bildung kommt (Bradley 2008).

Die TNF-Freisetzung durch anti-inflammatorische M $\Phi$  (Abb. 10C) wies deutliche Un-terschiede zwischen den lipidierten und nicht-lipidierten Proteinen auf. Auch hier in-duzierten alle vier lipidierten Proteine eine signifikant gesteigerte Cytokinproduktion gegenüber PBS ( $p < 0,05$ ) während die induzierten Cytokinlevel durch nicht-lipidierte Proteine auf PBS Level lagen. Erkennbar ist hierbei im Vergleich zu IL-8 und IL-6 die recht homogene Verteilung der Datenpunkte der vier einzelnen Spender. Die durch pro-inflammatorische M $\Phi$  produzierten TNF-Konzentrationen liegen für alle Proteine auf PBS Niveau und daher konnte keine erkennbar ausgelöste Immunreaktion durch die Proteine nachgewiesen werden.

Da IL-1 $\beta$  und IL-2 nicht in messbaren Konzentrationen von den Makrophagen auf den Stimulus hin freigesetzt wurden, lassen diese Interleukine keine Rückschlüsse auf eine suffiziente Immunreaktion zu.

Es konnte gezeigt werden, dass Oberflächenproteine der Pneumokokken in lipidier-tem Zustand eine durchweg signifikant stärkere Immunreaktion auslösen und M2a polarisierte M $\Phi$  eine deutlich stärkere Reaktion auf die Stimulation zeigen als M1 M $\Phi$ .

Die unerwartet starke Reaktion der M2a-M $\Phi$  auf den Stimulus mit lipidierten Protei-nen wurde bereits in anderen Untersuchungen beobachtet (Quero et al. 2017). Die Stimulation anti-inflammatorischer Makrophagen sowohl mit einem TLR4- als auch mit TLR2-Agonisten, wie ihn lipidierte Proteine darstellen, führen zu einer Reihe von Änderungen in den Expressionsmustern der Zellen. Zum einen wird die Expression M2-typischer Gen-Marker wie *SLC40A1* und *HMOX1* herunterreguliert (Quero et al. 2017). Zum anderen wird vermehrt TLR2 in die Zellmembran integriert, was einen sich selbst verstärkenden Effekt nach sich zieht. Zusätzlich wird das freigesetzte Cy-tokinmuster in pro-inflammatorische Richtung moduliert, was die hohen Level an pro-duziertem IL-6 und IL-8 erklärt. Ausgelöst wird dieser Effekt durch gesteigerte Ex-pression und Aktivität von MAP-Kinase p38. Das Enzym ist Teil einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade und an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit-tels Phosphorylierung beteiligt, womit es eine entscheidende Rolle an der TLR2 ver-mittelten Cytokinexpression spielt. Diese Modifikationen der Zellfunktion bringt die

Makrophagen in einen M1-ähnlichen Zustand (Quero et al. 2017). Die Plastizität der Differenzierung von Makrophagen ermöglicht den beobachteten schnellen Wechsel der Polarisation (Stout et al. 2005; Sica und Mantovani 2012). Dies erklärt die starke Reaktion der ursprünglichen M2a-MΦ. Im Gegensatz dazu werden die M1-MΦ bereits während der Differenzierung mit LPS als TLR4-Agonist stimuliert und zeigen daher keine grundlegenden Änderungen der Expressionsmuster durch Stimulation mit lipidierten Proteinen (Quero et al. 2017).

Die stärkere Cytokinfreisetzung der M2a-MΦ nach Stimulation mit lipidierten Proteinen, verglichen mit den nicht-lipidierten Proteinen, lässt sich auf die TLR2 vermittelte intrazelluläre Kaskade zurückführen. TLR2 ist ein Rezeptor zur Erkennung Pathogen spezifischer Oberflächenstrukturen und ist in die Membran von Immunzellen integriert (Iwasaki und Medzhitov 2004). TLR2 ist an der Detektion bakterieller Oberflächenproteine, speziell von Lipopeptiden beteiligt. Zu diesem Zweck bildet er Heterodimere, um in Kombination mit TLR1 triacylierte und mit TLR6 diacylierte Lipoproteine erkennen zu können (Takeuchi et al. 2002). Nach Detektion der Antigene durch die Rezeptordimere wird intrazellulär das Adapterprotein TIRAP aktiviert. Dies ermöglicht anschließend die MyD88 abhängige Induktion von NF-κB als entscheidendes Bindeglied zur Transkription pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine (Yamamoto et al. 2002; Horng et al. 2002). Die TLR2 vermittelte Immunreaktion auf lipidierte Pneumokokken-Proteine wurde bereits im Makrophagen-Mausmodell untersucht. Es wurde gezeigt, dass lipidierte Proteine eine stärkere Immunreaktion hervorrufen als ihre nicht-lipidierten Varianten (Moffitt et al. 2014). Weiterhin ist bekannt, dass Pneumokokken Lipoproteine, TLR2 vermittelt, eine entscheidende Rolle an dem Auslösen von NF-κB modulierten Immunreaktionen in Makrophagen spielen (Tomlinson et al. 2014).

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Beseitigung von Pneumokokken aus den oberen Atemwegen antikörperunabhängig durch spezielle, erst kürzlich entdeckte, CD4<sup>+</sup> Zellen vermittelt wird (McCool und Weiser 2004). Diese Antigen-spezifischen T-Zellen vermitteln eine wirkungsvolle Immunität gegenüber einer Kolonisation durch Pneumokokken (Trzciński et al. 2008). Diese Zellen setzen u.a. IL-17 frei und wurden demnach Th17 Zellen genannt. Th17 Zellen differenzieren aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf bestimmte, von Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzte, Cytokine. Die Schlüsselkomponenten für die Differenzierung in Th17 Lymphozyten, die Autostimulation der Zellen, und auch für die Bildung eines Th17 Effek-

tor Memory stellt IL-6 in Kombination mit TGF- $\beta$ , IL-23 und IL-1 $\beta$  dar (Korn et al. 2009). Diese Zellen produzieren das Cytokin IL-17A, das für die Regulation und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten verantwortlich ist (Miyamoto et al. 2003; Kolls und Lindén 2004; Sergejeva et al. 2005). Die so zum Ort der Infektion migrierenden professionellen Phagozyten sind kritisch für die effektive Beseitigung von *S. pneumoniae* aus den oberen Atemwegen (Basset et al. 2007). Die Entwicklung eines Th17 Gedächtniseffektes („Memory Effekt“) führt dazu, dass bei erneutem Kontakt mit Pneumokokken frühzeitig IL-17 freigesetzt und Makrophagen sowie Eosinophile rekrutiert werden können. Dies wiederum führt zu einer schnellen und effizienten Elimination von Pneumokokken und ist somit kritisch für die Immunitätsbildung gegen *S. pneumoniae* (Zhang et al. 2009). Es lässt sich daher die Schlussfolgerung ziehen, dass die im Mausmodell generierte Th17 abhängige Reaktion zu einer adaptiven Immunantwort führt, welche unabhängig von Antikörpern zu einer IL-17 vermittelte Bereinigung von Pneumokokken und zu gleichzeitig eine Memory-Zell vermittelten Immunität führt. Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Es konnten jedoch in dieser Arbeit bereits signifikant erhöhte IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  Level als Immunantwort von humanen M $\Phi$  auf die vier lipidierten Pneumokokken-Proteine MetQ, DacB, PnrA und PsaA im Gegensatz zu den nicht-lipidierten Proteinvarianten festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass lipidierte Proteine grundlegend an der durch Pneumokokken ausgelösten Immunreaktion beteiligt sind und in isoliertem lipidiertem Zustand einen wirksamen Stimulus des Immunsystems darstellen. In wie weit daraus eine Eignung als Vakzinkandidat im Menschen über eine Th17 Immunität besteht, muss auch hinsichtlich der mangelnden IL-1 $\beta$  Produktion weiter in *ex vivo* sowie *in vivo* Modellen untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lipidierung von Oberflächenproteinen der Pneumokokken eine entscheidende Rolle an der Generierung einer wahrscheinlich TLR2 vermittelten Immunantwort durch Zellen des humanen Immunsystems spielt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass anti-inflammatorische Makrophagen dazu in der Lage sind, auf die Stimulation mit lipidierten Proteinen mit starken Immunreaktionen durch Polarisationswechsel zu reagieren. Diese Erkenntnisse stellen eine gute Basis für weitere Untersuchungen von Immunreaktionen gegenüber Pneumokokken-Oberflächenproteinen im menschlichen Organismus dar.

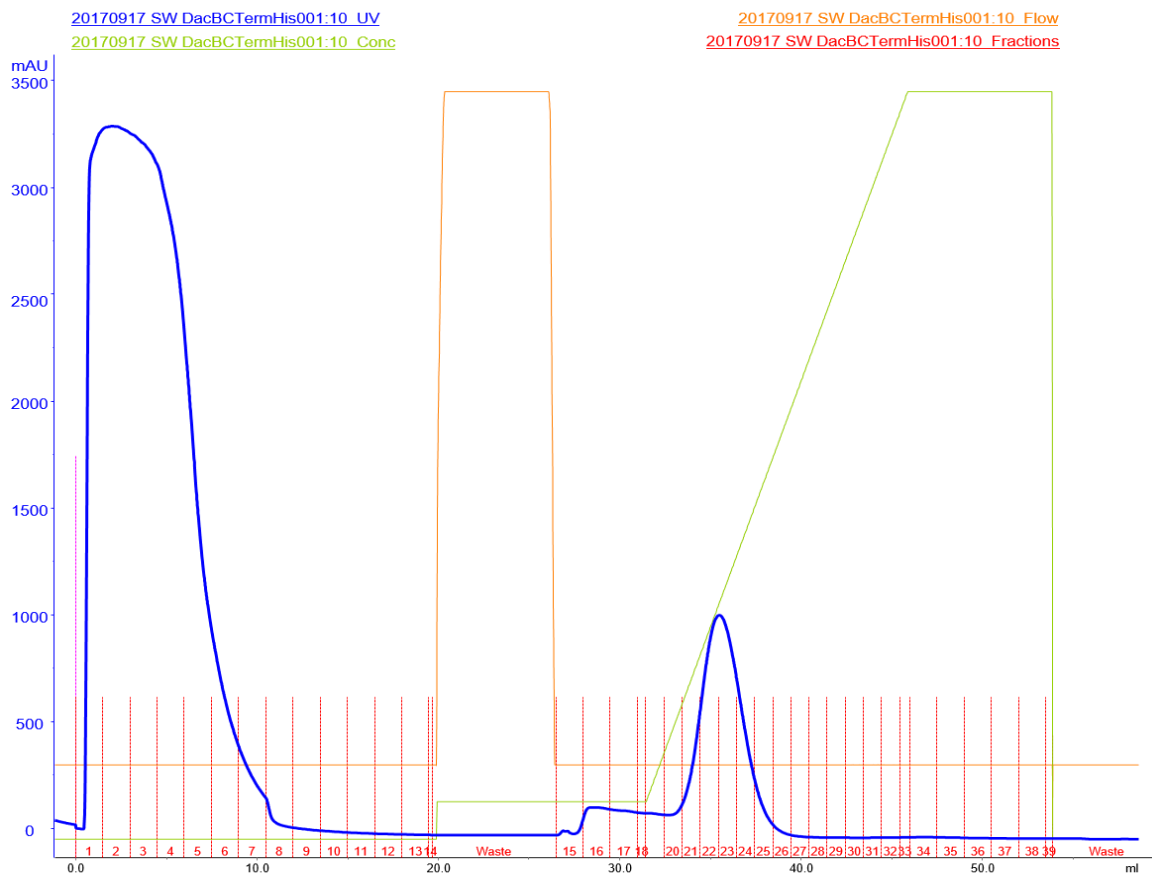


## **7.Anhang**

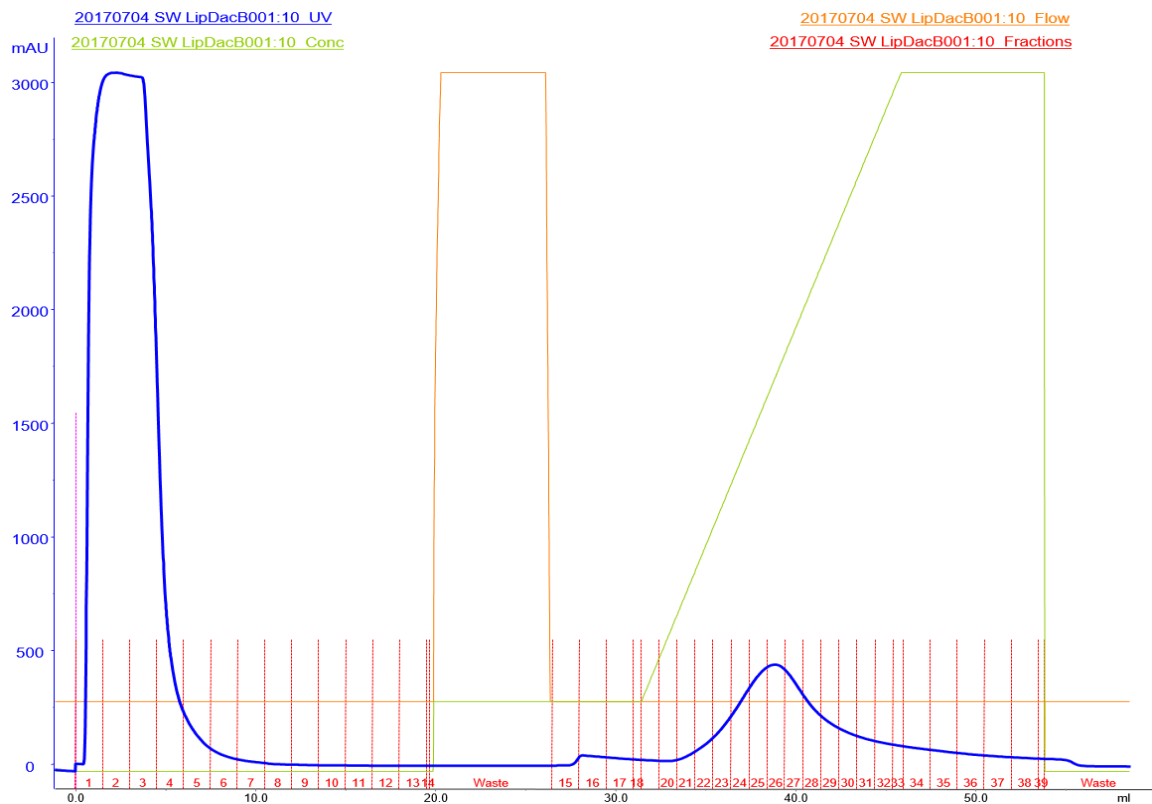
## 1. Proteinreinigung/Chromatogramme

Übersicht der Chromatogramme der Proteinreinigung mittels des ÄKTApurifier Systems. Abbildung 1-3 zeigen die Chromatogramme jeweils von DacB/Lip-DacB, PnrA/Lip-PnrA, PsaA/Lip-PsaA unter Nutzung einer *HisTrap*<sup>™</sup> FF crude 1ml Säule.

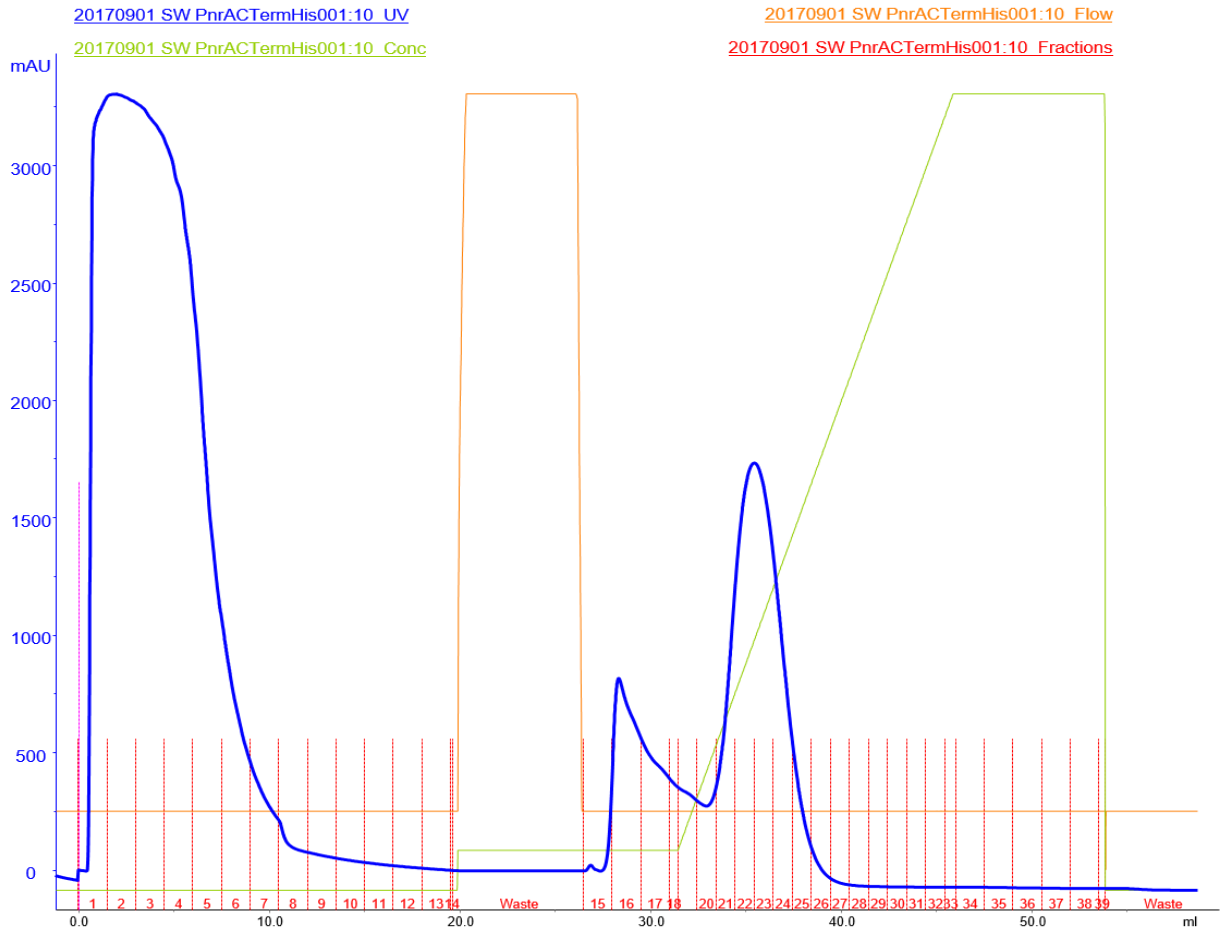
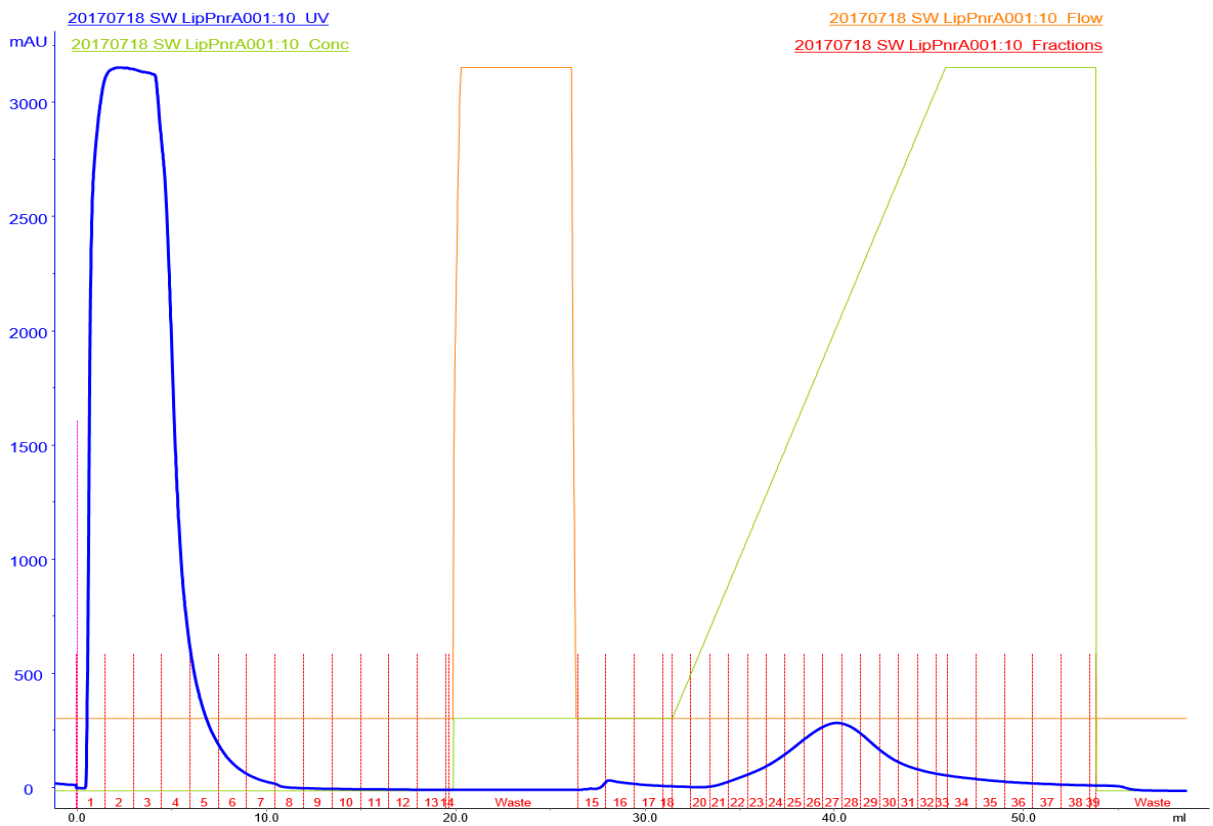
**A**



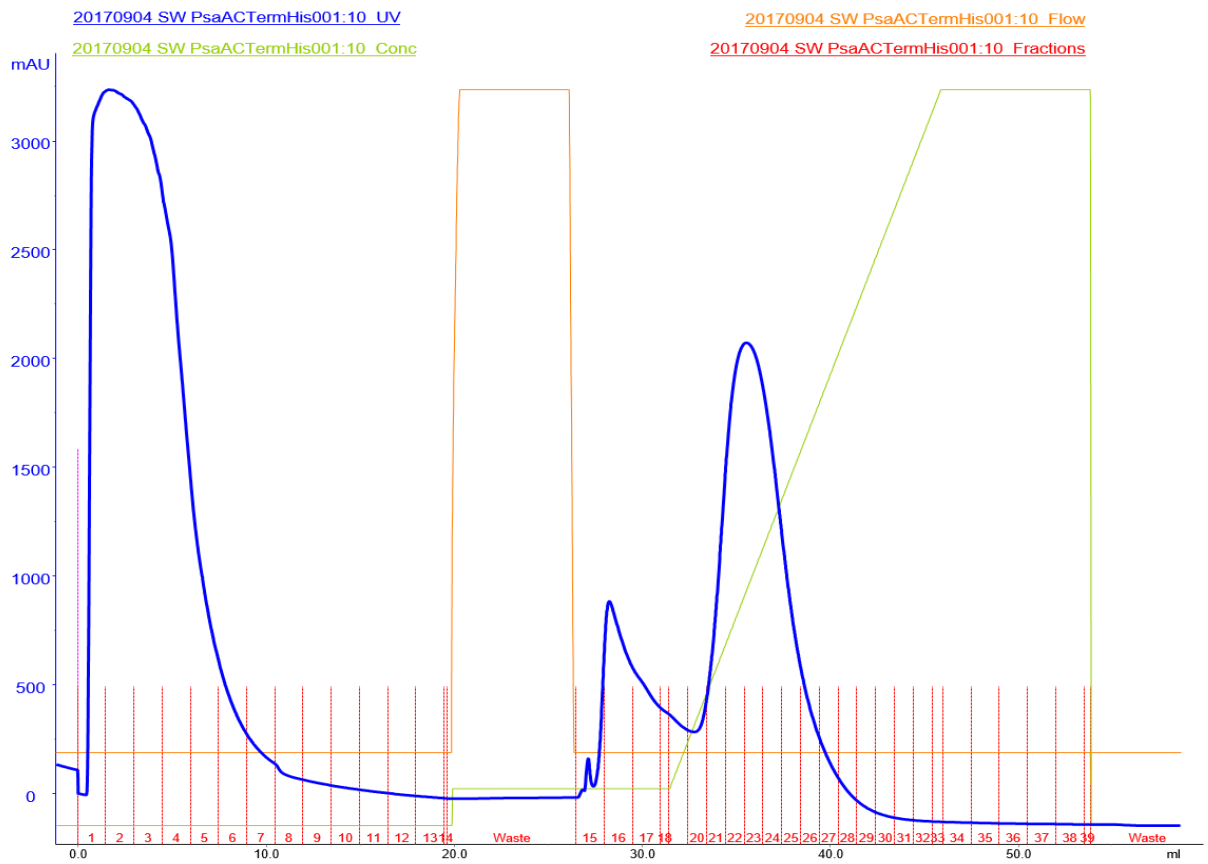
**B**



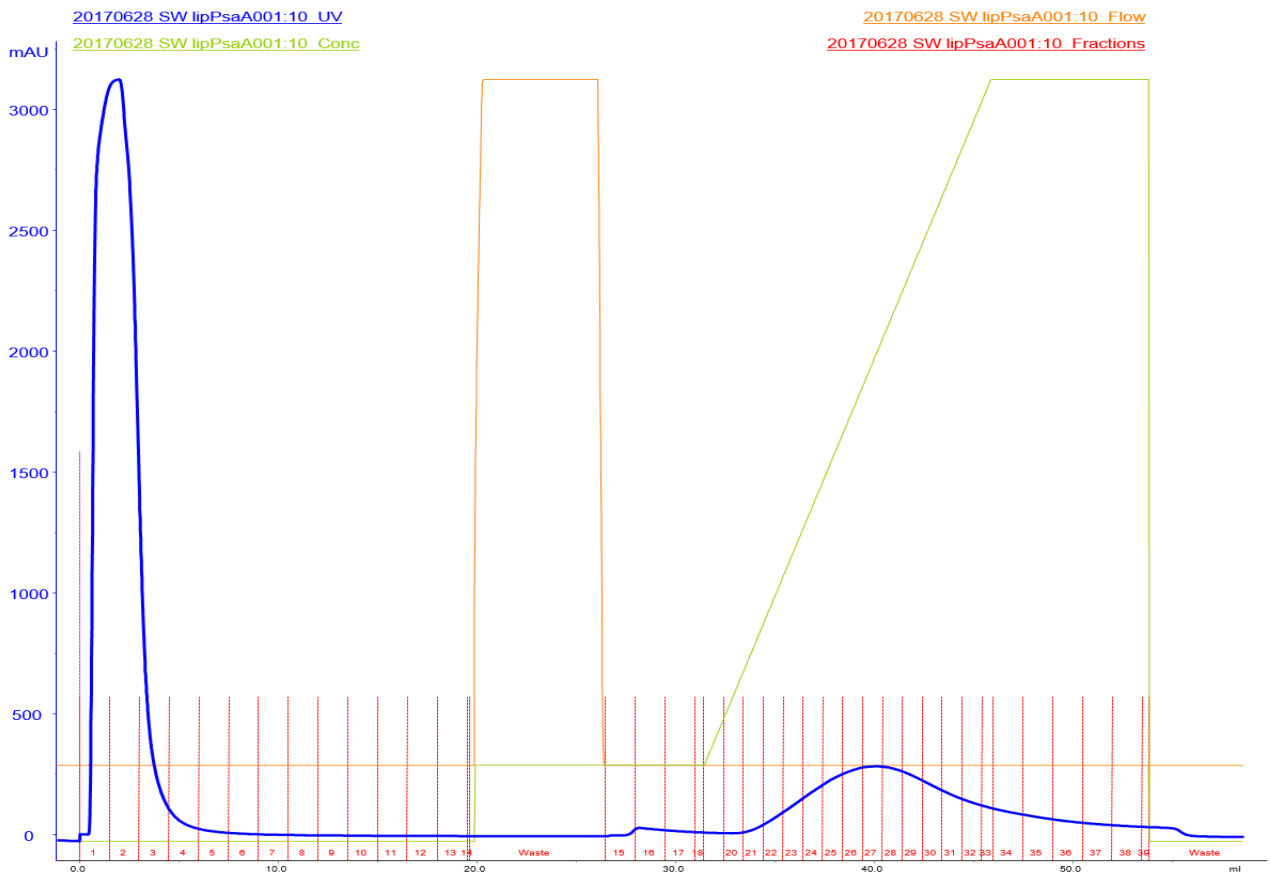
**Abbildung 1: Chromatogramme Proteinreinigung A: DacB; B: Lip-DacB**

**A****B****Abbildung 2: Chromatogramme Proteinreinigung A: PnrA; B: Lip-PnrA**

**A**



**B**



**Abbildung 3: Chromatogramme Proteinreinigung A: PsaA; B: Lip-PsaA**



### 3. Sequenzierungsergebnisse

#### 3.1 Sequenzierungsergebnis pET28TEV (pTP1) *dacB*

*dacB* in *S. pneumoniae* TIGR4 (*sp\_0629*)

```
ATGAAGAAAAGATACCTAGTCTTGACAGCTTTGCTAGCCTTGAGTCTAGCAGCTTGTTCA  
AGAAAAAACAAAAATGAAGATGGAGAACTAAGACAGAACAGACAGCCAAAGCTGATGGAA  
CAGTCGGTAGTAAGTCTCAAGGAGCTGCCAGAAAGAAAGCAGAAGTGGTCAATAAAGGTGAT  
TACTACAGCATTCAAGGGAAATACGATGAAATCATCGTAGCCAACAAACACTATCCATTGTC  
TAAAGACTATAATCCAGGGGAAAATCCAACAGCCAAGGCAGAGTTGGTCAAACATCAAAG  
CGATGCAAGAGGCAGGTTTCCCTATTAGTGATCATTACAGTGGTTTTAGAAATTATGAACT  
CAGACCAAGCTCTATCAAGATTATGTCAACCAAGATGGAAAGGCAGCAGCTGACCGTTACTC  
TGCCCGTCTGGCTATAGCGAACACCAGACAGGCTTGGCCTTTGATGTGATTGGGACTGATG  
GTGATTTGGTGACAGAAGAAAAGCAGCCCAATGGCTCTTGGATCATGCAGCTGATTATGGC  
TTTGTTGTCCGTTATCTCAAAGGCAAGGAAAAGGAAACAGGCTATATGGCTGAAGAATGGCA  
CCTGCGTTATGTAGGAAAAGAAGCTAAAGAAATTGCTGCAAGTGGTCTCAGTTTGAAGAAT  
ACTATGGCTTTGAAGGCGGAGACTACGTCGATTAA
```

DacB in *S. pneumoniae* TIGR4

```
MKKRYLVLTALLALSLAACSQEKTKNEDGETKTEQTAKADGTVGSKSQGAAQKKAEVVNKGD  
YYSIQGKYDEIIVANKHYPLSKDYNPGENPTAKAELVKLIKAMQEAGFPISDHYSGFRSYET  
QTKLYQDYVNQDGKAAADRY SARPGYSEHQ TGLAFDVI GTDGD LVTEEKAAQWLLDHAADYG  
FVVRYLKGKEKETGYMAEEWHLRYVVGKEAKEIAASGLSLEEYYGFEGGDYVD
```

His<sub>6</sub>-DacB

```
GSSHHHHHHMSGENLYFQGASQEKTKNEDGETKTEQTAKADGTVGSKSQGAAQKKAEVVNK-  
GDYYSIQGKYDEIIVANKHYPLSKDYNPGENPTAKAELVKLIKAMQEAGFPISDHYSGFR-  
SYETQTKLYQDYVNQDGKAAADRY SARPGYSEHQ TGLAFDVI GTDGD LVTEEKAAQWLLD-  
HAADYGFVVRYLKGKEKETGYMAEEWHLRYVVGKEAKEIAASGLSLEEYYGFEGGDYVD
```

### 3.2 Sequenzierungsergebnis pETlip3 metQ

metQ in *S. pneumoniae* TIGR4 (sp\_0149)

ATGAAAATCAAAAATGGCTTGGTCTAGCAGCCCTTGCTACAGTCGCAGGTTTGGCTCTTGC  
AGCTTGC GGAAACTCAGAAAAGAAAGCAGACAATGCAACAACATCAAAAATCGCAACTGTTA  
ACCGTAGCGGTTCTGAAGAAAACGTTGGGACAAAATCCAAGAATTGGTTAAAAAAGACGGA  
ATTACCTTGAATTTACAGAGTTCACAGACTACTCACAACCAAACAAAGCAACTGCTGATGG  
CGAAGTAGATTTGAACGCTTTCCAACACTATAACTTCTTGAACAACCTGGAACAAAGAAAACG  
GAAAAGACCTTGTAGCGATTGCAGATACTTACATCTCTCCAATCCGCCTTTACTCAGGTTTG  
AATGGAAGTGCCAACAAGTACACTAAAGTAGAAGACATCCCAGCAAACGGAGAAATCGCTGT  
ACCGAATGACGCTACAAACGAAAGCCGTGCGCTTTATTTGCTTCAATCAGCTGGCTTGATTA  
AATTGGATGTTTCTGGAAGTCTCTTGAACAGTTGCCAACATCAAAGAAAATCCAAAGAAC  
TTGAAAATCACTGAATTGGACGCTAGCCAAACAGCTCGTTCATTGTCATCAGTTGACGCTGC  
CGTTGTAAACAATACCTTCGTTACAGAAGCAAATTTGGACTACAAGAAATCACTTTTCAAAG  
AACAAAGCTGATGAAAACCAAAACAATGGTACAACATCATTGTTGCAAAAAAAGATTGGGAA  
ACATCACCTAAGGCTGATGCTATCAAGAAAGTAATCGCAGCTTACCACACAGATGACGTGAA  
AAAAGTTATCGAAGAATCATCAGATGGTTTGGATCAACCAGTTTGGTAA

MetQ in *S. pneumoniae* TIGR4

MKIKKWLGLAALATVAGLALAACGNSEKKADNATTIKIATVNRSGSEEKRWDKIQELVKKDG  
ITLFEFTFDYSQPNKATADGEVDLNAFQHYNFLNNWNKENGKDLVAIADTYISPIRLYSGL  
NGSANKYTKVEDIPANGEI AVPN DATNESRALYLLQSAGLIKLDVSGTALATVANIKENPKN  
LKITELDASQTARSLSSVDAAVVNNTFVTEAKLDYKKS LFK EQADENSKQWYNI IVAKKDWE  
TSPKADAIKKVIAAYHTDDVKKVIEESSDGLDQPVW

Lip-MetQ-His<sub>6</sub>

CKQNVSSHMGNSEKKADNATTIKIATVNRSGSEEKRWDKIQELVKKDGITLFEFTFDYSQPN  
KATADGEVDLNAFQHYNFLNNWNKENGKDLVAIADTYISPIRLYSGLNGSANKYTKVEDIP  
ANGEI AVPN DATNESRALYLLQSAGLIKLDVSGTALATVANIKENPKNLKITELDASQTARS  
LSSVDAAVVNNTFVTEAKLDYKKS LFK EQADENSKQWYNI IVAKKDWETS PKADAIKKVIAA  
YHTDDVKKVIEESSDGLDQPVW **HHHHHH**

Blau dargestellt ist die bei der Klonierung entfernte Sequenz **Signalpeptid** der Protei-  
ne. Die Aminosäure Sequenz der **His<sub>6</sub>**-Markierung wurde rot markiert, unterstrichen  
wurde die zusätzlich zum Protein hinzugefügten Aminosäuren. Grün hervorgehoben  
wurde das aus der OspA Sequenz konservierte und mittels pETLip3 Vektor inserierte  
**Cystein der Lipobox** (Doktorarbeit F. Voß)



#### 4. Berechnete Cytokinkonzentrationen

##### anti-inflammatorische Makrophagen

IL-6    pg/ml

									<b>Kontrolle</b>	
	<b>MetQ</b>	<b>Lip-MetQ</b>	<b>DacB</b>	<b>Lip-DacB</b>	<b>PnrA</b>	<b>Lip-PnrA</b>	<b>PsaA</b>	<b>Lip-PsaA</b>	<b>PBS</b>	<b>LPS</b>
<b>Donor 1</b>	113,8	871,4	191,5	1223,3	166,1	781,5	108,5	472,9	8,5	459,4
<b>Donor 2</b>	36,8	1013,3	122,2	1884	80	993,2	161,3	796,9	2,6	885,6
<b>Donor 3</b>	128,1	1790,2	204,2	1474,3	151,6	548,5	132,9	729,5	10,4	454,3
<b>Donor 4</b>	40	2614,5	59,6	1283,3	67,9	1201,4	90,8	1140,6	15,2	848,3

##### pro-inflammatorische Makrophagen

									<b>Kontrolle</b>	
	<b>MetQ</b>	<b>Lip-MetQ</b>	<b>DacB</b>	<b>Lip-DacB</b>	<b>PnrA</b>	<b>Lip-PnrA</b>	<b>PsaA</b>	<b>Lip-PsaA</b>	<b>PBS</b>	<b>IL-4</b>
<b>Donor 1</b>	95	326,3	165,8	342	203,7	154,9	191,8	268,1	104,2	85,1
<b>Donor 2</b>	127,1	172	206,3	246,2	9	170,2	498,3	207,8	194,3	182,1
<b>Donor 3</b>	82,6	59,1	145,8	63,5	135,7	69,3	64,3	72,4	131,3	78,1
<b>Donor 4</b>	17,9	59,9	1,6	61,8	4,8	39,7	14	11,7	4,6	2,4

**anti-inflammatorische Makrophagen**

**IL-8**      **ng/ml**

**Kontrolle**

	<b>MetQ</b>	<b>Lip-MetQ</b>	<b>DacB</b>	<b>Lip-DacB</b>	<b>PnrA</b>	<b>Lip-PnrA</b>	<b>PsaA</b>	<b>Lip-PsaA</b>	<b>PBS</b>	<b>LPS</b>
<b>Donor 1</b>	81,12431	167,2375	38,14763	1281,221	129,231	458,6873	15,23208	109,8083	0,063552	57,74637
<b>Donor 2</b>	0,5647302	938,8966	18,34296	3937,859	5,264904	546,795	23,98754	373,2516	0,0292847	52471,08
<b>Donor 3</b>	25,15804	459,6181	201,5289	139,8165	25,73409	3093,739	20,38235	582,4598	0,0510205	112,3226
<b>Donor 4</b>	1,523983	201,7333	6,160661	40,59465	10,58557	109,9197	246,8226	224,3895	0,0640912	5884,925

**pro-inflammatorische Makrophagen**

**Kontrolle**

	<b>MetQ</b>	<b>Lip-MetQ</b>	<b>DacB</b>	<b>Lip-DacB</b>	<b>PnrA</b>	<b>Lip-PnrA</b>	<b>PsaA</b>	<b>Lip-PsaA</b>	<b>PBS</b>	<b>IL-4</b>
<b>Donor 1</b>	7,648551	50,31379	23,40495	87,27355	374,2918	52,41351	89,66487	34,9893	19,82024	5,333366
<b>Donor 2</b>	31,61634	205,9509	25,74483	365,049	0,0361248	76,03445	58,28025	109,0406	75,21674	43,17289
<b>Donor 3</b>	3,205203	7,024239	49,99181	23,73145	49,38738	6,501214	1,624612	5,116249	15,91197	4,287495
<b>Donor 4</b>	0,3124474	49,42077	0,0390838	13,52964	0,0843316	9,847932	0,428533	1,272915	0,0572171	0,0278679

**anti-inflammatorische Makrophagen**

	<u>TNF</u>								<b>Kontrolle</b>	
	<u>pg/ml</u>									
	<b>MetQ</b>	<b>Lip-MetQ</b>	<b>DacB</b>	<b>Lip-DacB</b>	<b>PnrA</b>	<b>Lip-PnrA</b>	<b>PsaA</b>	<b>Lip-PsaA</b>	<b>PBS</b>	<b>LPS</b>
<b>Donor 1</b>	64,89931	82,95179	65,40693	87,26089	65,7262	82,30801	62,05603	79,16327	62,41971	73,44392
<b>Donor 2</b>	61,69447	78,01522	65,7262	87,43102	64,20776	74,81559	65,7262	71,19036	60,3279	85,82806
<b>Donor 3</b>	69,00594	90,63898	70,08965	86,33105	64,83614	73,87434	64,02045	84,50102	63,33826	84,09055
<b>Donor 4</b>	60,97766	125,1164	62,66335	88,28667	62,90793	85,24493	64,14526	99,23164	61,27531	177,3102

**pro-inflammatorische Makrophagen**

									<b>Kontrolle</b>	
	<b>MetQ</b>	<b>Lip-MetQ</b>	<b>DacB</b>	<b>Lip-DacB</b>	<b>PnrA</b>	<b>Lip-PnrA</b>	<b>PsaA</b>	<b>Lip-PsaA</b>	<b>PBS</b>	<b>IL-4</b>
<b>Donor 1</b>	26,67737	27,41484	26,16277	26,83371	28,78285	27,54867	27,76414	26,49612	27,73712	26,06105
<b>Donor 2</b>	25,95973	25,88399	26,08644	26,88603	24,77411	26,34174	26,70336	26,88603	27,30826	25,35999
<b>Donor 3</b>	24,94358	25,40944	27,60238	25,08976	27,52185	25,01656	26,62545	25,80848	25,53347	26,26489
<b>Donor 4</b>	25,13868	30,0138	24,82241	27,38816	26,26489	26,83371	25,53347	26,01034	25,08976	24,62977

## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro	LPS	Lipopolysaccharid
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)	Lsp	Lipoprotein-Signal-Peptidase
APS	Ammoniumpersulfat	M	Molar
AS	Aminosäure	MΦ	Makrophagen
BP	Basen-Paare	M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
°C	Grad Celsius	min	Minute
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat	OD	Optische Dichte
Da/kDa	Dalton/ kilo-Dalton	PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
DNS	Desoxyribunukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PPSV23	23-valenter Pneumokokken Polysaccharid Impfstoff
dNTP	Desoxyribunukleosid-Triphosphat	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	s	Sekunde
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	SDS	Natriumdodecylsulfat
FCS	fetales Kälber Serum	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
FD	fast digest (schnell verdauend)	V	Volt
g	Gramm	ÜN	Über Nacht
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor		
xg	x fache Erdbeschleunigung		
INF	Interferon		
IL	Interleukin		
IPD	Invasive Pneumokokken Erkrankung		
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid		
l	Liter		
LB	lysogeny broth		
Lip/lip	lipidiert		
Lgt	Lipoprotein-Diacylglycerol-Transferase		

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Biosynthese und Modifikation von Lipoproteinen	4
Abbildung 2: Schema Dichtezentrifugation von PBMC	38
Abbildung 3: Heterologe Expression lipidierter Proteine	42
Abbildung 4: Chromatogramme der Protein-Reinigung	44
Abbildung 5: Silberfärbung nach SDS-PAGE	45
Abbildung 6: Western Blot-Analyse heterolog exprimierter Proteine	45
Abbildung 7: Differenzierte Makrophagenpopulationen	47
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopie polarisierter Makrophagen	48
Abbildung 9: IL-8 Produktion nach Inkubation mit MetQ/Lip-MetQ	49
Abbildung 10: Cytokin-Produktion	51

## **Anhang**

Abbildung 1: Chromatogramme Proteinreinigung von DacB / Lip-DacB	62
Abbildung 2: Chromatogramme Proteinreinigung von PnrA / Lip-PnrA	63
Abbildung 3: Chromatogramme Proteinreinigung von PsaA / Lip- PsaA	64

## Zusammenfassung

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) stellt vor allem bei der sehr jungen und älteren sowie immungeschwächten Bevölkerung einen immer mehr an Bedeutung gewinnenden Krankheitserreger dar. Krankheitsbilder wie die Pneumokokken-Meningitis, -Pneumonie und -Sepsis, um nur einige zu nennen, können z.T. schwere Verläufe nehmen. Neue Serotyp-unabhängige Impfstoffe sollen flächendeckenden Schutz vor Infektionen mit *S. pneumoniae* bieten. Das Hauptaugenmerk der Impfstoffforschung liegt unter anderem auf der Untersuchung von Pneumokokken Protein-basierten Impfstoffen als Bestandteil eines Konjugat- bzw. Multikomponenten Impfstoffes. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die Immunantwort humaner Immunzellen gegenüber den vier Pneumokokken Oberflächen-Lipoproteinen MetQ, DacB, PnrA und PsaA untersucht. Diese Lipoproteine wurden sowohl in lipidiertes als auch in nicht-lipidiertes Form als heterologe Proteine generiert, um den Einfluss der Lipidierung auf die Immunreaktion beurteilen zu können. Zur Untersuchung der Reaktion des menschlichen Immunsystems wurden humane Blut-Monozyten (hPBMCs) isoliert und zu pro-inflammatorischen Makrophagen (M1) einerseits und anti-inflammatorischen Makrophagen (M2a) andererseits differenziert. Die Zellen wurden mit den lipidierten bzw. nicht-lipidierten Proteinen stimuliert. In den Überständen wurden zur Beurteilung der abgelaufenen Immunreaktion die Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF bestimmt. Eine Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-2 durch die Makrophagen konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. M1 Makrophagen zeichneten sich durch eine kaum messbare Cytokin-Produktion auf beide Proteinstimuli aus. Anti-inflammatorische Makrophagen zeigten eine signifikant verstärkte IL-6, IL-8 und TNF Produktion ( $p < 0,05$ ) nach Stimulation mit allen vier lipidierten Proteinen im Gegensatz zur Stimulation mit nicht-lipidierten Proteinen. Das stärkere Stimulationspotenzial der lipidierten Proteine konnte auf deren Agonismus am TLR2 zurückgeführt werden. Weiterhin konnte die starke Reaktion der M2a Makrophagen mit deren Plastizität sowie mit dem Potenzial von Lipoproteinen zur Umpolarisation von Makrophagen aufgrund des TLR2 Agonismus erklärt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die eingesetzten lipidierten Proteine einen suffizienten und signifikant potenteren Immunstimulus im menschlichen Organismus darstellen, als die gleichen Proteine in nicht-lipidiertes Form. Somit könnten diese lipidierten Proteine geeignete Vakzinkandidaten gegen *S. pneumoniae* darstellen.

## Literaturverzeichnis

Abdullah, Mohammed R.; Gutiérrez-Fernández, Javier; Pribyl, Thomas; Gisch, Nicolas; Saleh, Malek; Rohde, Manfred et al. (2014): Structure of the pneumococcal L,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. In: *Molecular microbiology* 93 (6), S. 1183–1206. DOI: 10.1111/mmi.12729.

Aderem, A.; Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. In: *Annual review of immunology* 17, S. 593–623. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.593.

Akira, Shizuo; Takeda, Kiyoshi (2004): Toll-like receptor signalling. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (7), S. 499–511. DOI: 10.1038/nri1391.

Aliberti, S.; Mantero, M.; Mirsaiedi, M.; Blasi, F. (2014): The role of vaccination in preventing pneumococcal disease in adults. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 5, S. 52–58. DOI: 10.1111/1469-0691.12518.

Anderton, Julie M.; Rajam, Gowrisankar; Romero-Steiner, Sandra; Summer, Susan; Kowalczyk, Andrew P.; Carlone, George M. et al. (2007): E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Microbial pathogenesis* 42 (5-6), S. 225–236. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.02.003.

Babu, M. Madan; Priya, M. Leena; Selvan, A. Tamil; Madera, Martin; Gough, Julian; Aravind, L.; Sankaran, K. (2006): A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. In: *Journal of bacteriology* 188 (8), S. 2761–2773. DOI: 10.1128/JB.188.8.2761-2773.2006.

Baggiolini, Marco; Clark-Lewis, Ian (1992): Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. In: *FEBS Lett* 307 (1), S. 97–101. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80909-Z.

Barendt, Skye M.; Sham, Lok-To; Winkler, Malcolm E. (2011): Characterization of mutants deficient in the L,D-carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) regulon, involved in peptidoglycan maturation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. In: *Journal of bacteriology* 193 (9), S. 2290–2300. DOI: 10.1128/JB.01555-10.

Barros, Mário Henrique M.; Hauck, Franziska; Dreyer, Johannes H.; Kempkes, Bettina; Niedobitek, Gerald (2013): Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. In: *PloS one* 8 (11), e80908. DOI: 10.1371/journal.pone.0080908.

Basavanna, Shilpa; Chimalapati, Suneeta; Maqbool, Abbas; Rubbo, Bruna; Yuste, Jose; Wilson, Robert J. et al. (2013): The effects of methionine acquisition and synthesis on *Streptococcus pneumoniae* growth and virulence. In: *PloS one* 8 (1), e49638. DOI: 10.1371/journal.pone.0049638.

- Basset, Alan; Thompson, Claudette M.; Hollingshead, Susan K.; Briles, David E.; Ades, Edwin W.; Lipsitch, Marc; Malley, Richard (2007): Antibody-independent, CD4+ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. In: *Infection and immunity* 75 (11), S. 5460–5464. DOI: 10.1128/IAI.00773-07.
- Becker-Dreps, Sylvia; Blette, Bryan; Briceño, Rafaela; Alemán, Jorge; Hudgens, Michael G.; Moreno, Gilberto et al. (2017): Changes in the incidence of pneumonia, bacterial meningitis, and infant mortality 5 years following introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in a "3+0" schedule. In: *PloS one* 12 (8), e0183348. DOI: 10.1371/journal.pone.0183348.
- Benoit, M.; Desnues, B.; Mege, J.-L. (2008): Macrophage Polarization in Bacterial Infections. In: *The Journal of Immunology* 181 (6), S. 3733–3739. DOI: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.
- Bhushan, Jaya; Vyas, Rajan; Sharma, Tripti; Sehgal, Devinder; Biswal, Bichitra Kumar (2011): Cloning, overexpression, purification, crystallization, and preliminary X-ray studies of SP\_0149, the substrate binding protein of an ABC transporter from *Streptococcus pneumoniae*. In: *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 67 (Pt 7), S. 797–799. DOI: 10.1107/S1744309111018422.
- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F. et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. In: *Nature* 385 (6618), S. 729–733. DOI: 10.1038/385729a0.
- Bradley, J. R. (2008): TNF-mediated inflammatory disease. In: *The Journal of pathology* 214 (2), S. 149–160. DOI: 10.1002/path.2287.
- Briles, D. E.; Ades, E.; Paton, J. C.; Sampson, J. S.; Carlone, G. M.; Huebner, R. C. et al. (2000): Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Infection and immunity* 68 (2), S. 796–800.
- Clem, Angela S. (2011): Fundamentals of vaccine immunology. In: *Journal of global infectious diseases* 3 (1), S. 73–78. DOI: 10.4103/0974-777X.77299.
- Daniels, Calvin C.; Rogers, P. David; Shelton, Chasity M. (2016): A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. In: *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG* 21 (1), S. 27–35. DOI: 10.5863/1551-6776-21.1.27.
- Davis, Kimberly M.; Nakamura, Shigeki; Weiser, Jeffrey N. (2011): Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (9), S. 3666–3676. DOI: 10.1172/JCI57761.
- Drijkoningen, J. J. C.; Rohde, G. G. U. (2014): Pneumococcal infection in adults: burden of disease. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 5, S. 45–51. DOI: 10.1111/1469-0691.12461.



- Epelman, Slava; Lavine, Kory J.; Randolph, Gwendalyn J. (2014): Origin and functions of tissue macrophages. In: *Immunity* 41 (1), S. 21–35. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.013.
- Feldman, Charles; Anderson, Ronald (2016): Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. In: *F1000Research* 5, S. 2320. DOI: 10.12688/f1000research.9283.1.
- Foey, Andrew D. (2014): Macrophages — Masters of Immune Activation, Suppression and Deviation. In: Guy Huynh Thien Duc (Hg.): *Immune Response Activation: InTech*.
- Garcia-Bustos, J. F.; Chait, B. T.; Tomasz, A. (1987): Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. In: *J. Biol. Chem.* 262 (32), S. 15400–15405.
- Gordon, Siamon (2003): Alternative activation of macrophages. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (1), S. 23–35. DOI: 10.1038/nri978.
- Gordon, Siamon; Martinez, Fernando O. (2010): Alternative activation of macrophages. Mechanism and functions. In: *Immunity* 32 (5), S. 593–604. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- Gupta, S. D.; Gan, K.; Schmid, M. B.; Wu, H. C. (1993): Characterization of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in apolipoprotein N-acyltransferase. In: *J. Biol. Chem.* 268 (22), S. 16551–16556. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/268/22/16551.full.pdf>.
- Heijenoort, J. v. (2001): Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. In: *Glycobiology* 11 (3), 25R-36R. DOI: 10.1093/glycob/11.3.25R.
- Heinrich, P. C.; Castell, J. V.; Andus, T. (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. In: *The Biochemical journal* 265 (3), S. 621–636.
- Henriques-Normark, Birgitta; Tuomanen, Elaine I. (2013): The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a010215.
- Hoebe, Kasper; Janssen, Edith; Beutler, Bruce (2004): The interface between innate and adaptive immunity. In: *Nature immunology* 5 (10), S. 971–974. DOI: 10.1038/ni1004-971.
- Hornig, Tiffany; Barton, Gregory M.; Flavell, Richard A.; Medzhitov, Ruslan (2002): The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. In: *Nature* 420 (6913), S. 329–333. DOI: 10.1038/nature01180.
- Iwasaki, Akiko; Medzhitov, Ruslan (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. In: *Nature immunology* 5 (10), S. 987–995. DOI: 10.1038/ni1112.
- Jomaa, Maha; Terry, Stephen; Hale, Chris; Jones, Christopher; Dougan, Gordon; Brown, Jeremy (2006): Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. In: *Vaccine* 24 (24), S. 5133–5139. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.012.
- Kawai, T.; Akira, S. (2006): TLR signaling. In: *Cell death and differentiation* 13 (5), S. 816–825. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401850.

- Khan, M. Nadeem; Pichichero, Michael E. (2014): The host immune dynamics of pneumococcal colonization: implications for novel vaccine development. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 10 (12), S. 3688–3699. DOI: 10.4161/21645515.2014.979631.
- Kishimoto, T. (1985): Factors affecting B-cell growth and differentiation. In: *Annual review of immunology* 3, S. 133–157. DOI: 10.1146/annurev.iy.03.040185.001025.
- Kishimoto, T. (1989): The biology of interleukin-6. In: *Blood* 74 (1), S. 1–10.
- Kohler, Sylvia; Voß, Franziska; Gómez Mejia, Alejandro; Brown, Jeremy S.; Hammerschmidt, Sven (2016): Pneumococcal lipoproteins involved in bacterial fitness, virulence, and immune evasion. In: *FEBS Lett* 590 (21), S. 3820–3839. DOI: 10.1002/1873-3468.12352.
- Kolls, Jay K.; Lindén, Anders (2004): Interleukin-17 family members and inflammation. In: *Immunity* 21 (4), S. 467–476. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- Korn, Thomas; Bettelli, Estelle; Oukka, Mohamed; Kuchroo, Vijay K. (2009): IL-17 and Th17 Cells. In: *Annual review of immunology* 27, S. 485–517. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- Kovacs-Simon, A.; Titball, R. W.; Michell, S. L. (2011): Lipoproteins of bacterial pathogens. In: *Infection and immunity* 79 (2), S. 548–561. DOI: 10.1128/IAI.00682-10.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lu, Chun-Yi; Huang, Li-Min (2016): Is Pneumococcal Serotype Replacement Impending? In: *Pediatrics and neonatology* 57 (5), S. 363–364. DOI: 10.1016/j.pedneo.2015.08.012.
- Lu, Chun-Yi; Ting, Yung-Tien; Huang, Li-Min (2015a): Severe *Streptococcus pneumoniae* 19A pneumonia with empyema in children vaccinated with pneumococcal conjugate vaccines. In: *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 114 (8), S. 783–784. DOI: 10.1016/j.jfma.2014.02.007.
- Lu, Jingcai; Sun, Tianxu; Wang, Dandan; Dong, Yunliang; Xu, Man; Hou, Hongjia et al. (2015b): Protective Immune Responses Elicited by Fusion Protein Containing PsaA and PspA Fragments. In: *Immunological Investigations* 44 (5), S. 482–496. DOI: 10.3109/08820139.2015.1037956.
- Mackaness, G. B. (1964): THE IMMUNOLOGICAL BASIS OF ACQUIRED CELLULAR RESISTANCE. In: *Journal of Experimental Medicine* 120 (1), S. 105–120. DOI: 10.1084/jem.120.1.105.
- Mantovani, Alberto; Sica, Antonio; Sozzani, Silvano; Allavena, Paola; Vecchi, Annunziata; Locati, Massimo (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. In: *Trends in immunology* 25 (12), S. 677–686. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.
- Martinez, Fernando Oneissi (2008): Macrophage activation and polarization. In: *Front Biosci* 13 (13), S. 453. DOI: 10.2741/2692.

- McAllister, Lauren J.; Tseng, Hsing-Ju; Ogunniyi, A. David; Jennings, Michael P.; McEwan, Alastair G.; Paton, James C. (2004): Molecular analysis of the psa permease complex of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Molecular microbiology* 53 (3), S. 889–901. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04164.x.
- McCool, Tera L.; Weiser, Jeffrey N. (2004): Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. In: *Infection and immunity* 72 (10), S. 5807–5813. DOI: 10.1128/IAI.72.10.5807-5813.2004.
- Messadi, D. V.; Pober, J. S.; Fiers, W.; Gimbrone, M. A.; Murphy, G. F. (1987): Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. In: *The Journal of Immunology* 139 (5), S. 1557–1562.
- Miyaji, Eliane Namie; Oliveira, Maria Leonor Sarno; Carvalho, Eneas; Ho, Paulo Lee (2013): Serotype-independent pneumococcal vaccines. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (18), S. 3303–3326. DOI: 10.1007/s00018-012-1234-8.
- Miyamoto, Masahide; Prause, Olof; Sjöstrand, Margareta; Laan, Martti; Lötval, Jan; Lindén, Anders (2003): Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (9), S. 4665–4672.
- Moffitt, Kristin; Skoberne, Mojca; Howard, Angela; Gavrilescu, L. Cristina; Gierahn, Todd; Munzer, Scott et al. (2014): Toll-like receptor 2-dependent protection against pneumococcal carriage by immunization with lipidated pneumococcal proteins. In: *Infection and immunity* 82 (5), S. 2079–2086. DOI: 10.1128/IAI.01632-13.
- Moffitt, Kristin L.; Malley, Richard (2011): Next generation pneumococcal vaccines. In: *Current opinion in immunology* 23 (3), S. 407–413. DOI: 10.1016/j.coi.2011.04.002.
- Mukherjee, Suprabhat; Karmakar, Subhajit; Babu, Santi Prasad Sinha (2016): TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. In: *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 20 (2), S. 193–204. DOI: 10.1016/j.bjid.2015.10.011.
- Muley, Vrishali Avinash; Ghadage, Dnyaneshwari Purushottam; Yadav, Gauri Eknath; Bhore, Arvind Vamanrao (2017): Study of Invasive Pneumococcal Infection in Adults with Reference to Penicillin Resistance. In: *Journal of Laboratory Physicians* 9 (1), S. 31–35. DOI: 10.4103/0974-2727.187918.
- Munro, J. M.; Pober, J. S.; Cotran, R. S. (1989): Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. In: *The American journal of pathology* 135 (1), S. 121–133.
- Nau, Gerard J.; Richmond, Joan F. L.; Schlesinger, Ann; Jennings, Ezra G.; Lander, Eric S.; Young, Richard A. (2002): Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3), S. 1503–1508. DOI: 10.1073/pnas.022649799.

Oeckinghaus, Andrea; Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2011): Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. In: *Nature immunology* 12 (8), S. 695–708. DOI: 10.1038/ni.2065.

Ogunniyi, A. D.; Folland, R. L.; Briles, D. E.; Hollingshead, S. K.; Paton, J. C. (2000): Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. In: *Infection and immunity* 68 (5), S. 3028–3033.

Ohradanova-Repic, Anna; Machacek, Christian; Fischer, Michael B.; Stockinger, Hannes (2016): Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. In: *Clinical & translational immunology* 5 (1), e55. DOI: 10.1038/cti.2015.39.

Örtqvist, Åke; Hedlund, Jonas; Kalin, Mats (2005): *Streptococcus pneumoniae*. Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Features. In: *Semin Respir Crit Care Med* 26 (06), S. 563–574. DOI: 10.1055/s-2005-925523.

Ozinsky, A.; Underhill, D. M.; Fontenot, J. D.; Hajjar, A. M.; Smith, K. D.; Wilson, C. B. et al. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25), S. 13766–13771. DOI: 10.1073/pnas.250476497.

Peiser, Leanne; Gordon, Siamon (2001): The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. In: *Microbes and Infection* 3 (2), S. 149–159. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01362-9.

Petit, Chantal M.; Brown, James R.; Ingraham, Karen; Bryant, Alex P.; Holmes, David J. (2001): Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth in vitro but essential for virulence in *Streptococcus pneumoniae*. In: *FEMS Microbiology Letters* 200 (2), S. 229–233. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10720.x.

Pober, J. S.; Bevilacqua, M. P.; Mendrick, D. L.; Lapierre, L. A.; Fiers, W.; Gimbrone, M. A. (1986): Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. In: *The Journal of Immunology* 136 (5), S. 1680–1687.

Porcheray, F.; Viaud, S.; Rimaniol, A-C; Léone, C.; Samah, B.; Dereuddre-Bosquet, N. et al. (2005): Macrophage activation switching. An asset for the resolution of inflammation. In: *Clinical and experimental immunology* 142 (3), S. 481–489. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.

Pribyl, Thomas; Moche, Martin; Dreisbach, Annette; Bijlsma, Jetta J. E.; Saleh, Malek; Abdullah, Mohammed R. et al. (2014): Influence of impaired lipoprotein biogenesis on surface and exoproteome of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Journal of proteome research* 13 (2), S. 650–667. DOI: 10.1021/pr400768v.

Quero, Lilian; Hanser, Edveena; Manigold, Tobias; Taden, André N.; Kyburz, Diego (2017): TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. In: *Arthritis research & therapy* 19 (1), S. 245. DOI: 10.1186/s13075-017-1447-1.

- Saleh, Malek; Abdullah, Mohammed R.; Schulz, Christian; Kohler, Thomas; Pribyl, Thomas; Jensch, Inga; Hammerschmidt, Sven (2014): Following in real time the impact of pneumococcal virulence factors in an acute mouse pneumonia model using bioluminescent bacteria. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (84), e51174. DOI: 10.3791/51174.
- Sankaran, K.; Wu, H. C. (1994): Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (31), S. 19701–19706.
- Saxena, Sneha; Khan, Naeem; Dehinwal, Ruchika; Kumar, Ajay; Sehgal, Devinder (2015): Conserved surface accessible nucleoside ABC transporter component SP0845 is essential for pneumococcal virulence and confers protection in vivo. In: *PloS one* 10 (2), e0118154. DOI: 10.1371/journal.pone.0118154.
- Schulz, Christian; Gierok, Philipp; Petruschka, Lothar; Lalk, Michael; Mäder, Ulrike; Hammerschmidt, Sven (2014): Regulation of the arginine deiminase system by ArgR2 interferes with arginine metabolism and fitness of *Streptococcus pneumoniae*. In: *mBio* 5 (6). DOI: 10.1128/mBio.01858-14.
- Schulz, Christian; Hammerschmidt, Sven (2013): Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates. In: *Expert review of vaccines* 12 (9), S. 1061–1075. DOI: 10.1586/14760584.2013.824708.
- Sergejeva, Svetlana; Ivanov, Stefan; Lötval, Jan; Lindén, Anders (2005): Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33 (3), S. 248–253. DOI: 10.1165/rcmb.2004-0213OC.
- Severin, A.; Tomasz, A. (1996): Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Journal of bacteriology* 178 (1), S. 168–174.
- Sica, Antonio; Mantovani, Alberto (2012): Macrophage plasticity and polarization. In vivo veritas. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (3), S. 787–795. DOI: 10.1172/JCI59643.
- Sieweke, Michael H.; Allen, Judith E. (2013): Beyond stem cells. Self-renewal of differentiated macrophages. In: *Science (New York, N.Y.)* 342 (6161), S. 1242974. DOI: 10.1126/science.1242974.
- Song, Joon Young; Nahm, Moon H.; Moseley, M. Allen (2013): Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. In: *Journal of Korean medical science* 28 (1), S. 4–15. DOI: 10.3346/jkms.2013.28.1.4.
- Stout, R. D.; Jiang, C.; Matta, B.; Tietzel, I.; Watkins, S. K.; Suttles, J. (2005): Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. In: *The Journal of Immunology* 175 (1), S. 342–349. DOI: 10.4049/jimmunol.175.1.342.
- Tai, Stanley S. (2006): *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates. Properties, activities and animal studies. In: *Critical reviews in microbiology* 32 (3), S. 139–153. DOI: 10.1080/10408410600822942.

- Takeuchi, O.; Sato, S.; Horiuchi, T.; Hoshino, K.; Takeda, K.; Dong, Z. et al. (2002): Cutting Edge. Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. In: *The Journal of Immunology* 169 (1), S. 10–14. DOI: 10.4049/jimmunol.169.1.10.
- Tokunaga, M.; Tokunaga, H.; Wu, H. C. (1982): Post-translational modification and processing of Escherichia coli prolipoprotein in vitro. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (7), S. 2255–2259.
- Tomlinson, Gillian; Chimalapati, Suneeta; Pollard, Tracey; Lapp, Thabo; Cohen, Jonathan; Camberlein, Emilie et al. (2014): TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (7), S. 3736–3745. DOI: 10.4049/jimmunol.1401413.
- Trzciński, Krzysztof; Thompson, Claudette M.; Srivastava, Amit; Basset, Alan; Malley, Richard; Lipsitch, Marc (2008): Protection against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* is mediated by antigen-specific CD4+ T cells. In: *Infection and immunity* 76 (6), S. 2678–2684. DOI: 10.1128/IAI.00141-08.
- Unanue, E. R.; Beller, D. I.; Calderon, J.; Kiely, J. M.; Stadecker, M. J. (1976): Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. In: *The American journal of pathology* 85 (2), S. 465–478.
- van Furth, R.; Cohn, Z. A.; Hirsch, J. G.; Humphrey, J. H.; Spector, W. G.; Langevoort, H. L. (1972): The mononuclear phagocyte system. A new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. In: *Bulletin of the World Health Organization* 46 (6), S. 845–852.
- van Ginderachter, Jo A.; Movahedi, Kiavash; Hassanzadeh Ghassabeh, Gholamreza; Meerschaut, Sofie; Beschin, Alain; Raes, Geert; Baetselier, Patrick de (2006): Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes. Picking the best of both worlds for tumor promotion. In: *Immunobiology* 211 (6-8), S. 487–501. DOI: 10.1016/j.imbio.2006.06.002.
- Veckman, V. (2003): Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. In: *Journal of Leukocyte Biology* 74 (3), S. 395–402. DOI: 10.1189/jlb.0402212.
- Voß, Franziska; Kohler, Thomas P.; Meyer, Tanja; Abdullah, Mohammed R.; van Opzeeland, Fred J.; Saleh, Malek et al. (2018): Intranasal Vaccination With Lipoproteins Confers Protection Against Pneumococcal Colonisation. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2405. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02405.
- Watters, Tanya M.; Kenny, Elaine F.; O'Neill, Luke A. J. (2007): Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. In: *Immunology and cell biology* 85 (6), S. 411–419. DOI: 10.1038/sj.icb.7100095.
- Whaley, Melissa J.; Sampson, Jacquelyn S.; Johnson, Scott E.; Rajam, Gowrisankar; Stinson-Parks, Annie; Holder, Patricia et al. (2010): Concomitant administration of recombinant PsaA and PCV7 reduces *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A colonization in a murine model. In: *Vaccine* 28 (18), S. 3071–3075. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.02.086.

Yamamoto, Masahiro; Sato, Shintaro; Hemmi, Hiroaki; Sanjo, Hideki; Uematsu, Satoshi; Kaisho, Tsuneyasu et al. (2002): Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. In: *Nature* 420 (6913), S. 324–329. DOI: 10.1038/nature01182.

Zhang, Zhe; Clarke, Thomas B.; Weiser, Jeffrey N. (2009): Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (7), S. 1899–1909. DOI: 10.1172/JCI36731.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den .....

.....

Sidney Werner

---



## Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt am Interfakultären Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung in der Abteilung für Molekulare Genetik und Infektionsbiologie durchgeführt.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt für die Möglichkeit bedanken, ein solch spannendes Projekt unter sehr guten Arbeitsbedingungen und mit modernster Ausstattung bearbeiten zu können. Weiterhin möchte ich meinen Dank für das angenehme Arbeitsklima, die stetigen Ratschläge zur Förderung des Projektes und die Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen sowie zahlreicher Workshops und Kolloquien im Rahmen des GRK1870 ausdrücken.

Großer Dank geht an Franziska Voß als Mentor dieses Projektes, für die Betreuung aller Laborarbeiten und die stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und auf sämtlichen steinigsten Passagen des Projektes.

Besonderer Dank geht an Dr. Sylvia Kohler für die Organisation aller Formalitäten, auch das GRK1870 betreffend und die große Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Problemen. Außerdem möchte ich Dr. Thomas Kohler danken, der immer ein offenes Ohr hatte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich mich außerdem ausdrücklich bei Dr. Nikolai Siemens für die großartige Unterstützung, auch an Wochenenden, die zahlreichen Ratschläge und die gute Stimmung während der Arbeit bedanken.

Allen übrigen Mitarbeitern der AG Hammerschmidt und NWG Siemens danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, Offenheit und die Möglichkeit immer ein kleines Schwätzchen halten zu können.

Vielen Dank geht an Stephan Schneiders für die langen, lustigen und lehrreichen Stunden in der Zellkultur.

Danke an euch Ramón und Toni, dass ihr trotz der Entfernung immer in der Nähe seid und immer einen passenden Spruch parat habt. Danke auch an euch André, Kevin und Schlüter für die brillanten Zeiten und den Zusammenhalt, wenn es mal nicht rund läuft.

Riesen Dank geht natürlich an meine Eltern und meinen Bruder. Danke, dass ihr mich immer unterstützt und immer für mich da seid.

---