

**Immunmodulatorische Eigenschaften der
Cholin-bindenden Proteine von
*Streptococcus pneumoniae***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Johanna Elisabeth Kölpin

aus Bonn

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.08.2018

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie

Direktor: Prof. Dr. Achim Hörauf

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	10
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
1.2 Zellmembran der Pneumokokken	11
1.2.1 Lipoproteinprozessierung und ihre immunologische Wirkung	11
1.2.2 Bedeutung von Toll-like Rezeptoren bei der Immunantwort gegen <i>S. pneumoniae</i>	13
1.2.3 Cholinmetabolismus	14
1.3 Zellwandsynthese	16
1.4 Cholin-bindende Proteine als Virulenzfaktoren	17
1.5 Kapselsynthese und Immunevasion	20
1.6 Impfung	24
1.7 Zielsetzung	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Molekularbiologisch verwendete Enzyme und Reagenzien	28
2.1.3 Puffer	29
2.1.4 Nährmedien	30
2.1.5 Bakterienstämme	31
2.1.6 Gebrauchsfertige Kits und Stimulatoren	32
2.1.7 Farbstoffe und Antikörper	32
2.1.8 Gebrauchsgegenstände	33
2.1.9 Geräte	34
2.1.10 Programme	35

2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Mikrobiologie	36
2.2.2	Zellbiologie	41
2.2.3	Molekularbiologie.....	43
2.2.4	Biochemie.....	45
2.2.5	Durchflusszytometrie	48
2.2.6	Statistische Auswertung	49
3.	Ergebnisse.....	50
3.1	Genmutationsnachweis der <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	50
3.2	Nachweis von Phosphocholin und dessen Auswirkung auf die Zellteilung	50
3.3	Monozytäre Zytokinproduktion auf Pneumokokkenstimulation	53
3.4	Ergebnisse der PBMC Stimulation mit <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten.....	55
3.5	Unterschiede zwischen den beiden Cholinmutanten D39 <i>cho⁻licA64</i> und D39 <i>chip^{T700}licB31</i>	57
3.6	Kapselnachweis der <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	58
3.7	Immunstimulatorisches Verhalten der in Flüssigkultur mit Zusatz von Cholinchlorid gewachsenen <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten.....	62
3.8	Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Immunantwort gegen <i>S. pneumoniae</i> D39	63
3.9	Bedeutung des TLR2 bei der Immunantwort auf <i>S. pneumoniae</i> D39 und deren Cholinmutanten.....	65
3.10	Einfluss einer LPS Vorstimulation auf die Immunantwort gegen <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten.....	68
3.11	Wirkung von TNF auf IL-1 β - und IgM-Produktion.....	70
4.	Diskussion.....	72
4.1	Unterschiede in der Zytokinproduktion der Monozyten zwischen IL-1 β und TNF auf D39 <i>cho⁻licA64</i> Stimulation im Vergleich zu D39 Δ <i>cps</i>	72
4.1.1	Immunerkenkung der Pneumokokken über TLR2	73
4.1.2	Die Rolle des Korezeptors CD36 bei der LPS Prästimulation	74
4.1.3	Gegenseitige Beeinflussung von TNF, IL-1 β und IL-10.....	75
4.1.4	Unterschiedliche monozytäre Zytokinproduktion auf Stimulation mit <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten Δ <i>cps</i> und <i>cho⁻licA64</i>	76

4.2	Gründe für die signifikant höhere TNF-Produktion der Monozyten auf <i>S. pneumoniae</i> D39 <i>cho⁻licA64</i> Stimulation im Vergleich zu D39 Δ <i>cps</i>	77
4.2.1	Mangelnde Verankerung als möglicher Grund für das Fehlen der Kapsel	79
4.2.2	Die Auswirkung der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf das immunstimulatorische Verhalten der Pneumokokken.....	83
4.2.3	Einfluss von CBP der Pneumokokken auf das Immunsystem	87
5.	Zusammenfassung	90
6.	Anhang	92
6.1	Abbildungsverzeichnis	92
6.2	Tabellenverzeichnis	92
7.	Literaturverzeichnis	93
8.	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

1. Einheiten

Länge: m, mm, μm , pm

Gewicht: g, mg, μg , pg

Zeit: d, h, min, sec

Volumen: l, ml, μl

Temperatur: $^{\circ}\text{C}$

mM

Bp

kDa

Zentrifugeneinheiten: rpm, g

Meter, Milli-, Mikro-, Pikometer

Gramm, Milli-, Mikro-, Pikogramm

Tage, Stunden, Minuten, Sekunden

Liter, Milli-, Mikroliter

Grad Celsius

Millimolar

Basenpaare

Kilodalton

Runden pro Minute, Zentrifugalkraft

2. Abkürzungen

Abb.

ABC-Transporter

AK

ATP

BSA

CBP

Cbp

CbpA, D

CcpA

CD

CFU

CMP, CDP

CpG

CPS

cps2

Cre

CRP

Abbildung

ATP-bindende Kasette-Transporter

Antikörper

Adenosintriphosphat

Bovine Serum Albumin

Cholin-bindende Proteine

Cholin-bindendes Protein

Cholin-bindendes Protein A, D

Catabolic control protein A

Cluster of differentiation

Colony forming unit

Cytidin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-diphosphat

Cytosin – Phosphat – Guanin

Kapselpolysaccharid

Gene für den Kapselserotyp 2

Katabolitempfindlicher Bereich

C-reaktives Protein

DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
ECL-Substrat	Erhöhtes Chemilumineszenz-Substrat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>ermB</i>	Erythromycin
FCS	Fetales Kälberserum
FH	Humaner Faktor H
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Glc-	Glucosyl
h...	Human...
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen
h_i	Intensität
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF α	Interferon- α
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LCP	LytR, CpsA, Psr
Lgt	Lipoprotein Diacylglyceryl Transferase
Lps	Lipoprotein Signal Peptidase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäuren
Mn ²⁺	Mangan
MOI	Multiplicity of infection
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	Nuklearer Faktor 'kappa-leichte Ketten-Enhancer' von aktivierten B-Zellen
NLR	Nod-like-Rezeptor

NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NptA	Na ⁺ /P _i -Kotransporter A
OD	Optische Dichte
Orf	Open-reading frame
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
Pam3 CSK ₄	Synthetisches Triacyliertes Lipoprotein
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PBMC	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pce	Phosphocholinesterase
P-Cholin	Phosphocholin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCV	Pneumokokken-Konjugatimpfstoff
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PiaA	Pneumococcal iron acquisition
PiuA	Pneumococcal iron uptake
Ply	Pneumolysin
PP	Diphosphat
PPAR γ -RXR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren γ -Retinoid-X-Rezeptor
PPSV	Pneumokokken-Polysaccharidimpfstoff
PRR	Pattern recognition receptors
PsaA	Pneumococcal surface adhesion/antigen A
PspA	Pneumococcal surface protein A
PspC	Pneumococcal surface protein C
Pst1 und 2	Phosphattransporter 1 und 2
R848	Resiquimod
RGB	Rot, Grün, Blau
RIPA-Lysepuffer	Radioimmunoprecipitation-Lysepuffer
R-M-System	Restriktion-Modifikations-System

RT	Raumtemperatur
sCD	Freies CD
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
slgA	Sekretorische Komponente von IgA
SpsA	<i>S. pneumoniae</i> IgA-bindendes Protein
SSI	Statens Serum Institut
TA	Teichonsäuren
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween
TDP	Thymidindiphosphat
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSB	Tryptic-Soya-Bouillon
UDP	Uridindiphosphat
Und-P	Lipid Undecaprenyl-Phosphat
WB	Westernblot
WCV	Whole cell vaccine
WTA	Zellwandteichonsäuren
α ...	Anti ...

3. Bakterienstämme

S.	<i>Streptococcus</i>
<i>S. pneumoniae</i> D39 (SpnD39, D39)	Kapselserotyp 2 (Grundlage für die in der Arbeit verwendeten Mutanten)
<i>S. pneumoniae</i> R6 (Spr, R6)	Kapselloser Stamm aus D39 entstanden
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	Kapselserotyp 4

Bemerkung zur Nomenklatur: Gene sowie Bakteriennamen sind kursiv geschrieben.

1. Einleitung

Streptococcus pneumoniae, auch Pneumokokkus genannt, besiedelt als Kommensale den Nasopharyngealtrakt gesunder Menschen, kann aber auch zu lebensbedrohlichen Infektionen führen (Tostes et al., 2017). Der Weltgesundheitsorganisation zufolge ist *S. pneumoniae* der weltweit führende Erreger für ambulant erworbene Pneumonien. Diese stellen die häufigste Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren dar. Des Weiteren ist *S. pneumoniae* für selbstlimitierende Krankheiten wie die akute Otitis media oder invasive Krankheiten wie Meningitis oder Sepsis verantwortlich. Unter den bakteriell verursachten Meningitiden, ist die durch *S. pneumoniae* induzierte Meningitis, die mit der höchsten Sterblichkeitsrate und hinterlässt bei den Überlebenden häufig schwere Schädigungen (World Health Organization, 2014). Am häufigsten infizieren sich Erwachsene über 60 Jahren und Kinder unter 2 Jahren mit Pneumokokken (Robert Koch-Institut, 2014).

Pneumokokken können in Deutschland bisher noch sehr gut mit Penicillin behandelt werden, da sie eine geringe Penicillinresistenz aufweisen. In anderen europäischen Ländern, wie Frankreich oder Spanien, sind bereits Penicillinresistenzen von bis zu 50 % zu verzeichnen (Reinert, 2005). Zur Behandlung von penicillinresistenten Pneumokokken müssen andere Antibiotika eingesetzt werden, die die Resistenzentwicklung der Pneumokokken weiter fördern würden. Um dieser Spirale zu entkommen, kann einer Infektion mit Pneumokokken durch Impfung vorgebeugt werden. Gegenwärtig werden Impfstoffe gegen die Pneumokokkenkapsel verwendet unter denen bereits ein Rückgang von durch Pneumokokken hervorgerufenen Krankheiten sowie ein Rückgang der Antibiotikaresistenz zu verzeichnen ist (Callaway, 2014; Klugman, 2004). Das Problem der Kapselimpfstoffe ist, dass nur gegen einige Pneumokokkenserotypen geimpft werden kann und somit ein Selektionsdruck der Pneumokokken hin zu den nicht im Impfstoff enthaltenen Pneumokokkenstämmen existiert (siehe Kapitel 1.6). Auf Grund dieses Problems ist das Ziel der Impfstoffforschung, einen Serotypen-unabhängigen Impfstoff zu entwickeln. Hierzu dienen Proteinantigene wie Cholin-bindende Proteine (CBP), Pneumolysin oder Lipoproteine.

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Mikrobiologisch gesehen sind Pneumokokken grampositive (Abb 1a), α -hämolytische und katalasenegative Diplokokken, die am besten bei 5 % CO₂ wachsen (Tumanen, 2015). Sie können anhand ihrer Kapsel in mehr als 90 Serotypen unterteilt werden (Geno et al., 2015). Unter der Kapsel befindet sich die Zellwand mit Phosphocholin, an das die sogenannten Cholin-bindenden Proteine (CBP) gebunden sind. Die Bestandteile der Zellwand können in der darunter befindlichen Zellmembran verankert sein (McCullers und Tuomanen, 2001) (Abb. 1b).

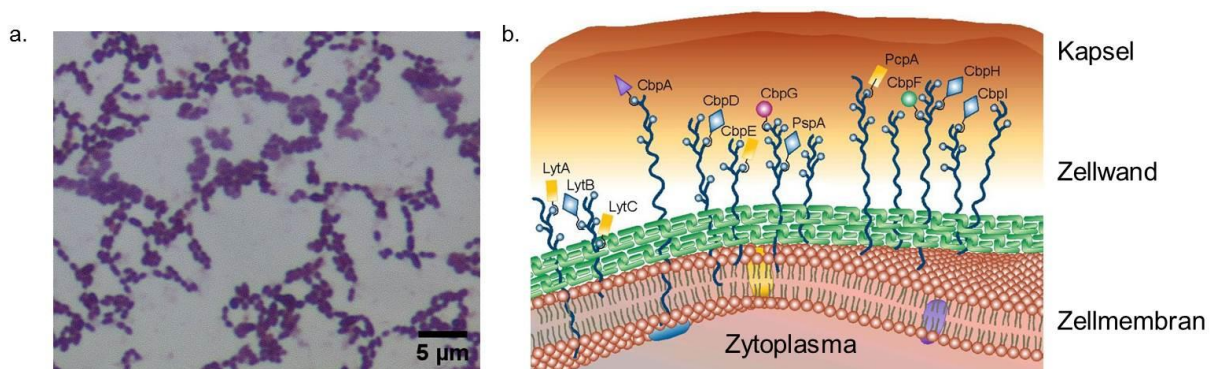


Abb. 1 Aufbau der Pneumokokken. **a.** Gramfärbung von *S. pneumoniae* D39, Maßstabsbalken $\cong 5 \mu\text{m}$. **b.** Schematische Übersicht der Pneumokokken Zellwand. Unter der Kapsel (braun) befindet sich die Zellwand, die sich aus Peptidoglykan (grün) und Teichon-/ Lipoteichonsäuren (dunkelblaue Strukturen) zusammensetzt. Die Teichonsäuren sind an Peptidoglykanen und die Lipoteichonsäuren in der Zellmembran verankert. An die Teichonsäuren bindet Phosphocholin (hellblaue Kreise) und an das Phosphocholin die Cholin-bindenden Proteine (bunte Strukturen mit unterschiedlichen Abkürzungen). Adaptiert nach McCullers und Tuomanen, 2001.

Zum Verständnis der Immunogenität der Pneumokokken ist es wichtig, ihren Aufbau sowie einige Proteine zu kennen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.2 Zellmembran der Pneumokokken

1.2.1 Lipoproteinprozessierung und ihre immunologische Wirkung

Die Lipoproteinprozessierung ist bei allen Bakterienspezies ein konservierter Prozess. Zunächst werden Pre-Pro-Lipoproteine, die aus dem Lipoprotein und einem N-terminal angehängten 20 Aminosäure großen Signalpeptid bestehen, aufgrund des Signalpeptids an

die extrazelluläre Seite der Zellmembran transportiert. Dort diacyliert die Lipoprotein Diacylglyceryl Transferase (Lgt) das Pre-Pro-Lipoprotein am Cystein der Lipobox, die sich am C-terminalen Ende des Signalpeptids befindet. Die Diacylierung führt zu einer Verankerung des entstandenen Pro-Lipoprotein in der Zellmembran auf der extrazellulären Seite. Nach der Lipidierung erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids durch die Lipoprotein Signal Peptidase (Lsp) und das fertige diacylierte Lipoprotein mit dem Cystein als neues N-terminales Ende ist entstanden. Die meisten fertigen Lipoproteine bei Pneumokokken sind diacylierte Lipoproteine (Chimalapati et al., 2012; Kovacs-Simon et al., 2011).

Die Mehrzahl der bakteriellen Lipoproteine sind Substrat-bindende Proteine für ABC-Transporter und somit am Transport vielzähliger Substrate wie Kationen, Zucker, Aminosäuren und Mineralien beteiligt. Fehlt den Pneumokokken die Lgt, so können sie kaum noch Substrate aufnehmen und die Pneumokokken sind im Mausmodell deutlich avirulenter als ihr Wildtyp. Im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien sind grampositive Bakterien trotz der Mutation im *lgt*-Gen lebensfähig (Chimalapati et al., 2012).

Einige dieser ABC-Transporter stellen Virulenzfaktoren der Pneumokokken dar. Dazu zählen unter anderem PsaA (Pneumococcal surface adhesion/antigen A), ein Bestandteil des ABC-Magnesiumtransporters, sowie die Eisentransporter PiaA (Pneumococcal iron acquisition) und PiuA (Pneumococcal iron uptake) (Kovacs-Simon et al., 2011).

PsaA ist ein hoch konserviertes Lipoprotein, das von allen bekannten Pneumokokkenserotypen exprimiert wird und essentiell für die Kolonisierung, Adhäsion und Krankheitsentwicklung der Pneumokokken ist. Als Teil des ABC-Mn²⁺-Transporters ist es für den Import des essentiellen Spurenelementes Mangan verantwortlich. Mangan ist unter anderem Kofaktor für die Superoxiddismutase und damit an der Verringerung des oxidativen Stresses beteiligt. Das Fehlen von PsaA stört das Wachstum der Pneumokokken und führt zu einer verminderten *in vivo*-Virulenz der Pneumokokken im Mausmodell. Diese Eigenschaften machen PsaA zu einem interessanten Angriffspunkt für die Therapie von durch Pneumokokken ausgelösten Krankheiten (Bajaj et al., 2015; Kovacs-Simon et al., 2011). Bisher konnte, sowohl durch aktive als auch durch passive Immunisierung mit PsaA, nur ein Schutz vor Kolonisation mit Pneumokokken, nicht aber vor einer systemischen Infektion erreicht werden (Kohler et al., 2016).

PiaA und PiuA als Teil zweier unterschiedlicher ABC-Eisenaufnahmetransporter haben ein gutes immunogenes Potential, da Patienten, die mit Pneumokokken infiziert waren, gegen PiaA und PiuA Antikörper gebildet haben. Eine aktive Immunisierung mit PiuA und PiaA führt ebenfalls zu einer starken Antikörperbildung und schützt vor einer invasiven Pneumokokkenerkrankung. Die gebildeten Antikörper sind außerdem Serotypen-unabhängig. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, inwieweit die Antikörper zur Opsonierung dienen können, da sich die Lipoproteine unter der Kapsel und der Zellwand befinden (Jomaa et al., 2005).

1.2.2 Bedeutung von Toll-like Rezeptoren bei der Immunantwort gegen *S. pneumoniae*

Ein möglicher Weg über den eine Immunantwort gegen die diacylierten Lipoproteine erfolgen könnte, wäre die Erkennung über den Toll-like Rezeptor 2 (Gisch et al., 2013). Die Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Rezeptoren auf Zellen des angeborenen Immunsystems, die durch charakteristische Bestandteile von Bakterien, Pilzen und Viren, den Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs), stimuliert werden (Lu et al., 2008). Bisher sind drei TLR bekannt, die bei der Erkennung von Pneumokokken eine Rolle spielen (Brown et al., 2015). Hierbei handelt es sich um die auf der Zelloberfläche befindlichen TLR2 und TLR4 sowie den sich im Endosom befindlichen TLR9 (Pandey et al., 2015). Der TLR4 erkennt das cholesterol-abhängige Zytolysin Pneumolysin (Marshall et al., 2015) und der TLR9 unmethylierte CpG Dinukleotide, die in prokaryotischer DNA vorhanden sind (Brown et al., 2015).

Pneumolysin, ein sich im Zytoplasma befindender Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*, führt in hoher Konzentration zur Zellyse durch Bildung von Poren in der Zellmembran. In geringeren Mengen kann es durch die Bildung von kleineren Poren zum Calciuminflux kommen, der zur Zytoskelettveränderung führt. Außerdem induziert Pneumolysin eine starke inflammatorische Zytokinbildung durch Interaktion mit TLR4 und durch Inflammasomen. In Abhängigkeit von der Pneumokokken- und somit der Pneumolysin-konzentration im Nasopharynx kann es zu zwei Szenarien kommen:

1. Bei geringer Pneumokokkenkolonisation führt Pneumolysin zur TGF- β -Produktion. Die TGF- β -induzierte T-Zellantwort reguliert die proinflammatorische Immunantwort herunter und verhindert weitere Zellzerstörung (Brown et al., 2015).
2. Eine hohe Pneumokokkenkolonisation bewirkt nur eine geringe TGF- β -Produktion, sodass die durch proinflammatorische Zytokine induzierte Infektantwort kaum inhibiert wird. Diese führt über neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu einem Gewebeschaden, der es einigen Pneumokokken ermöglicht, in die Blutbahn einzudringen (Brown et al., 2015).

1.2.3 Cholinmetabolismus

Der Aminoalkohol Cholin ist ein essentieller Wachstumsfaktor für *S. pneumoniae*. Pneumokokken haben einen auxotrophen Bedarf an Cholin, welches sie aus der Umgebung bzw. über das Wachstumsmedium aufnehmen. Dieses wird ausschließlich an Zellwandteichonsäuren und Lipoteichonsäuren angelagert (Eberhardt et al., 2009).

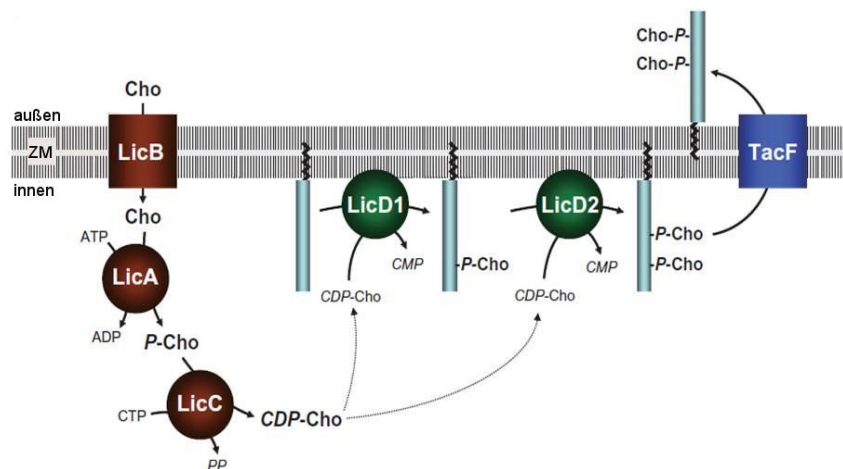


Abb. 2 Schematische Darstellung des Cholinmetabolismus. Cholin wird über LicB ins Zytoplasma importiert. Hier wird es über LicA, C und D phosphoryliert und an die Teichonsäuren gebunden. TacF befördert als Flippase die fertigen Teichonsäuren auf die Außenseite der Zellmembran. Teichonsäuren = grau/blau Stäbe, ZM= Zellmembran, Cho= Cholin, P= Phosphat, CTP, CDP, CMP= Cytidin- 5'-tri-, di-, monophosphat. Adaptiert nach Eberhardt et al., 2009.

Der Cholinmetabolismus ist ein mehrstufiger Prozess. Die einzelnen Schritte werden in Abbildung 2 dargestellt und im Folgenden anhand der Publikation von Wang et al. (2015) erläutert. Der Cholin-Transmembrantransporter LicB importiert Cholin ins Zytoplasma, wo es von der Cholin-kinase LicA phosphoryliert und anschließend durch die Phosphocholin

Cytidylyl Transferase (LicC) zu CDP-Cholin aktiviert wird. Die beiden Phosphocholin Transferasen LicD1 und LicD2 katalysieren den Transfer von CDP-Cholin auf die Vorläufer der Teichonsäuren, die u.a. durch die Cytidylyl Transferase TarI und die Alkoholdehydrogenase TarJ gebildet werden. Die fertigen Teichonsäuren werden durch die Teichonsäure Flippase TacF auf die Außenseite der Zellmembran befördert (Wang et al., 2015). Über einen Lipidanker sind die Teichonsäuren in der Zellmembran verankert und diffundieren in die Zellmitte, um in die Zellwand eingebaut zu werden (Eberhardt et al., 2009).

Obwohl Cholin ein essentieller Wachstumsfaktor für das Pneumokokkenwachstum ist (Eberhardt et al., 2009), konnten einige Mutanten generiert werden, die kein Cholin benötigen (Damjanovic et al., 2007; Kharat und Tomasz, 2006; Kharat et al., 2008). Zu diesen Mutanten gehören u.a. *S. pneumoniae* D39 *cho*⁻, *chip*^{T700}, *cho*⁻*licA64* und *chip*^{T700}*licB31*. Ihr Entstehungsmechanismus kann anhand von Abb. 15 (Kapitel 3.6) verfolgt werden.

S. pneumoniae D39 *cho*⁻ ist eine heterologe genetische Kreuzung mit *S. oralis* (Kharat und Tomasz, 2006). *S. oralis* hat kein auxotrophes Verlangen nach Cholin (Kharat und Tomasz, 2006) und die Flippase exportiert Teichonsäuren im Gegensatz zu *S. pneumoniae* sowohl mit als auch ohne P-Cholin auf die Außenseite, sodass ein Wachstum auch im cholinfreien Medium möglich ist (Kharat et al., 2008). D39 *chip*^{T700} hat eine Punktmutation im *tacF*-Gen, sodass TacF auch Teichonsäuren ohne Phosphocholin auf die Außenseite transportieren kann (Kharat et al., 2008). Im cholinfreien Medium wachsen beide Mutanten in langen Ketten, da ihnen Cholin in der Zellwand fehlt, und autolytische Proteine nicht binden können. Durch die Zugabe von Cholin ins Wachstumsmedium können sie wieder zu ihrer kurzkettigen Erscheinungsform wechseln (Bergmann und Hammerschmidt, 2006; Damjanovic et al., 2007; Kharat et al., 2008; Rico-Lastres et al., 2015).

Die Doppelmutanten D39 *cho*⁻*licA64* und D39 *chip*^{T700}*licB31* zeigen ein cholinunabhängiges Wachstum auch in cholinhaltigem Medium und können entweder kein Cholin importieren (*chip*^{T700}*licB31*) oder Cholin nicht phosphorylieren (*cho*⁻*licA64*) (Damjanovic et al., 2007; Eberhardt et al., 2009). Mit Hilfe dieser beiden Doppelmutanten kann der Einfluss von Phosphocholin auf das Immunsystem getestet werden.

1.3 Zellwandsynthese

Pneumokokken haben eine dicke und hochkomplexe Zellwand, die es ihnen ermöglicht dem inneren Druck standzuhalten und ihre Form zu behalten. Die Zellwand besteht aus Peptidoglykan, an das kovalent anionische Polymere gebunden sind, sowie Teichonsäuren (Denapaite et al., 2012). Die Teichonsäuren sind entweder als Lipoteichonsäuren (LTA) über einen diacylglycerol (DAG)-enthaltenden Lipidanker in der Zellmembran verankert oder als Wandteichonsäuren (WTA) kovalent an die Peptidoglykanschicht gebunden (Gisch et al., 2013).

Die Teichonsäuren der Pneumokokken sind im Gegensatz zu anderen grampositiven Bakterien komplex aufgebaut. Ihr Aufbau wurde an dem kapsellosen Laborstamm *S. pneumoniae* R6 erforscht. Sie bestehen aus dem seltenen Aminozucker 2-Acetamido-4-Amino-2,4,6-Tri Deoxy Galaktose, Glukose, Ribose-Phosphat und zwei N-Acetyl-galaktosamin Resten, an die jeweils ein Phosphocholin gebunden ist (Denapaite et al., 2012). Die einzelnen Teichonsäure-Einheiten werden zu fünf bis acht sich wiederholenden Einheiten zusammengebaut (Gisch et al., 2013) und durch TacF auf die Außenseite der Membran transportiert (Denapaite et al., 2012). Diese beiden Schritte können über zwei Wege erfolgen.

Eine Möglichkeit ist, dass die sich wiederholenden Einheiten auf der zytoplasmatischen Membranseite zusammengebaut und anschließend auf die Membranaußenseite transportiert werden (Denapaite et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die einzelnen mit P-Cholin dekorierten Zucker einzeln auf die Membranaußenseite befördert und erst dort zu den sich wiederholenden Einheiten zusammengebaut werden (Denapaite et al., 2012).

Auf der Membranaußenseite werden die fertigen Teichonsäuren von dem undecaprenylierten Phosphatanker gelöst und für die LTA-Synthese durch Spr1759 an einen aus Glucosyl-diacylglycerol (Glc-DAG) bestehenden Lipidanker gebunden. Für die WTA-Synthese verbindet Spr1226 die Teichonsäuren mit dem Peptidoglycan. Spr1226 ist außerdem für die Verankerung der Kapsel an der Zellwand verantwortlich. An das Phosphocholin der fertigen LTA oder WTA können nun die Cholin-bindenden Proteine (CBP) binden (Denapaite et al., 2012; Gisch et al., 2013).

1.4 Cholin-bindende Proteine als Virulenzfaktoren

Die an das Phosphocholin der bakteriellen Zellwand gebundenen Cholin-bindenden Proteine (CBP) zählen zu den wichtigsten Virulenzfaktoren der Pneumokokken. Je nach Bakterienstamm schwankt die Anzahl der CBP zwischen 13 und 16 (Brown et al., 2015). Den größten Anteil der CBP bildet das PspA, gefolgt von dem PspC (Miyaji et al., 2015).

Der Aufbau aller CBP ist ähnlich. Sie haben einen geladenen, variablen N-Terminus auf den eine prolinreiche Region folgt. Die sich anschließende Cholin-bindende Region besteht aus bis zu 11 sich wiederholenden Einheiten von 20 hochkonservierten Aminosäuren und befindet sich am C-terminalen Ende (Brown et al., 2015).

PspA: Das Pneumokokken-Oberflächenprotein A hat zwei Hauptaufgaben: Zum einen reduziert PspA das Binden des Akute-Phase-Proteins C-Reaktives Protein (CRP) und des Komplementfaktors C3 an Phosphocholin und zum anderen inaktiviert es Apolactoferrin (Mukerji et al., 2012; Shaper et al., 2004).

Mukerji et al. (2012) haben die Rolle von PspA an der Bindung von CRP und C3 erforscht. Die CRP-Serumkonzentration nimmt bei Infektionen und Inflammation zu. CRP bindet an das Phosphocholin der Pneumokokken und kann, wie Antikörper, den klassischen Weg des Komplementsystems über C1q aktivieren (Mukerji et al., 2012). Der Komplementfaktor C3 kann auch direkt an die Pneumokokken binden und das Komplementsystem über den alternativen Weg aktivieren. Das Komplementsystem dient zur Opsonierung der Pneumokokken, um diese u.a. über Makrophagen und Neutrophile abzubauen, oder direkt über die Bildung eines Membranangriffskomplexes die Bakterien zu lysieren (Panelius und Meri, 2015). Das Phosphocholin wird durch die Bindung der CBP abgedeckt, sodass kein CRP oder C3 binden kann und die Pneumokokken nicht mehr opsoniert werden. Fehlt das PspA, reduziert sich die Überlebenszeit der Pneumokokken (Mukerji et al., 2012).

Das sich in Milch, Tränenflüssigkeit und Speichel befindliche Apolactoferrin bindet als Chelator Eisen in Flüssigkeiten und entzieht somit den Bakterien wichtige Nährstoffe (Shaper et al., 2004). Shaper et al. (2004) konnten zeigen, dass PspA Apolactoferrin bindet und dieses inhibiert. Eine Mutation im *pspA*-Gen ist für Pneumokokken letal ebenso wie die Antikörperbindung an PspA, die die Bindung von Apolactoferrin an PspA verhindert (Shaper et al., 2004).

PspC: Das Pneumokokken-Oberflächenprotein C ist u.a. auch bekannt unter dem Namen CbpA (Cholin-bindendes Protein A) und SpsA (*S. pneumoniae* IgA-bindendes Protein) (Moreno et al., 2012). Als multifunktionelles Protein kann PspC zum einem mit dem Komplementsystem durch das Binden des humanen Faktors H (FH) und C3 interagieren. Zum anderen kann es mit der sekretorischen Komponente des vom respiratorischen Epithel gebildeten humanen IgA (slgA) interagieren und die Adhäsion und Invasion der Pneumokokken ins respiratorische Epithel verbessern (Moreno et al., 2012).

Das Binden von FH führt zu einer verminderten Aktivität des Immunsystems, da FH die Aktivität des Komplementsystems durch Spaltung des C3bBb Komplexes des alternativen Weges inhibiert und FH mit Faktor B um C3b konkurriert (Dave et al., 2004). Dave et al. (2004) konnten zeigen, dass slgA und FH an unterschiedliche Stellen des PspC binden und dass beide zur Virulenz von *S. pneumoniae* beitragen. Antikörper gegen PspC verwenden zum Teil unterschiedliche Bindestellen und führen stammspezifisch nur zu einer Verminderung von slgA- und FH- Bindung (Moreno et al., 2012).

Pce: Das CBP Phosphocholinesterase Pce oder Cbp ist u.a. für die Inhibierung der Immunantwort gegen *S. pneumoniae* verantwortlich. Pce kann bis zu 30 % der Phosphocholinreste von der Zellwand der Pneumokokken spalten. Dadurch können weniger CRP oder Antikörper gebunden werden und das Immunsystem wird nicht oder weniger aktiviert (Hergott et al., 2015). Hergott et al. (2015) haben des Weiteren entdeckt, dass Pce den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) von Phosphocholin (P-Cholin) spalten kann und dabei inaktiviert. PAF dient neben einigen anderen Aufgaben als Entzündungsmediator und aktiviert Neutrophile, die zur Elimination der Pneumokokken dienen (Hergott et al., 2015).

Die Menge von P-Cholin an der Zellwand der Pneumokokken muss genau reguliert werden. Pneumokokken benötigen P-Cholin für die Invasion in Zellen durch Bindung an den PAF Rezeptor und für die Bindung von CBP. Ist jedoch zu viel freies P-Cholin vorhanden, werden sie vom Immunsystem erkannt und eliminiert (Hergott et al., 2015; Young et al., 2013).

Zellwandhydrolasen: Die Zellwandhydrolasen können als oberflächliche Enzyme spezifische kovalente Bindungen der Bakterienzellwand spalten, die zur Lyse und zum Tod der Bakterien führen (LytA und LytC) oder der Zellteilung dienen (LytB). Zellwandpeptidoglykane sind eine der bedeutendsten molekularen Strukturen von Pathogenen. Chemische Veränderungen dieser Peptidoglykane helfen den Pneumokokken die Erkennung durch das angeborene Immunsystem zu umgehen (Ramos-Sevillano et al., 2015; Sandalova et al., 2016).

LytA: Von den CBP wurde LytA als erstes entdeckt (Morales et al., 2015). Es ist das bedeutendste Autolysin sowie eines der am besten konservierten Virulenzmerkmale der Pneumokokken (Sandalova et al., 2016). LytA besteht aus zwei Proteindomänen: einer C-terminalen Cholin-bindenden Domäne, die an der Zellwand bindet und einer N-terminalen katalytischen N-acetyl-muramoyl L-Alanin Amidase. Die Amidase hydrolysiert die N-acetyl-muramoyl-L-Alanin-Bindung im Peptidoglykan und führt hierdurch zur Autolyse der Pneumokokken (Sandalova et al., 2016).

Die Autolyse ist ein bedeutender Prozess in der Pathogenese von Pneumokokken-erkrankungen. Sie dient dem Austausch kompetenter DNA, der Pneumolysinfreisetzung und der Biofilmbildung durch Freisetzung von extrazellulärer DNA sowie anderen Biofilmkomponenten (Sandalova et al., 2016). Außerdem ist LytA an der Evasion des Immunsystems beteiligt, da es eine Aktivierung des klassischen und alternativen Wegs des Komplementsystems sowie die Bindung des Akute-Phase-Proteins CRP verhindert (Ramos-Sevillano et al., 2015).

Die durch LytA induzierte Autolyse der Pneumokokken findet fast ausschließlich in der stationären Wachstumsphase statt. Während der logarithmischen Phase des Wachstums befindet sich LytA hauptsächlich intrazellulär. Beim Übergang in die stationäre Phase bindet LytA an das Phosphocholin der Zellwand und die Autolyse startet. Das LytA autolysierter Pneumokokken kann außerdem auch an das Phosphocholin anderer Pneumokokken binden (Mellroth et al., 2012). Des Weiteren können die beiden zellwandwirksamen Antibiotika Penicillin und Vancomycin LytA aktivieren und zur Autolyse führen (Mellroth et al., 2014). Zusammen mit der Glucosamidase LytB ist LytA für die typische Diplokokkenmorphologie der Pneumokokken verantwortlich (Morales et al., 2015). Fehlen diese Hydrolasen, wachsen die Pneumokokken in langen Ketten (Bai et al., 2014).

LytB und LytC: Im Gegensatz zu den anderen CBP haben LytB und LytC die Cholin-bindende Domäne am N-terminalen Ende (Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Beide Hydrolasen scheinen einen Einfluss auf die Kolonisation des Nasopharynx zu haben, u.a. durch die Vermeidung der Phagozytose und Evasion des Komplementsystems (Ramos-Sevillano et al., 2011). Des Weiteren ist LytB an der Adhäsion und Invasion in humane Lungenepithelien beteiligt (Bai et al., 2014).

Die nicht-autolytische N-Acetylglucosaminidase LytB spielt eine essentielle Rolle bei dem finalen Schritt der Zellteilung und zeigt somit, im Gegensatz zu LytA, eine vermehrte Expression während der exponentiellen Wachstumsphase. LytB befindet sich vornehmlich an den Zellpolen und dem Bakterienseptum und spaltet unreife Peptidoglykane. Außerdem zeigt es eine geringe katalytische Fähigkeit bei der Glycosyltransferase-reaktion (Bergmann und Hammerschmidt, 2006; García et al., 1999; Rico-Lastres et al., 2015). Eine Mutation im *lytB*-Gen führt zu einem Wachstum der Pneumokokken in langen Ketten (bis zu 100 Zellen) (Bai et al., 2014).

Das auf der gesamten Bakterienoberfläche befindende Autolysin LytC hydrolysiert nur nicht vernetzte Peptidoglykane. Seine maximale autolytische Aktivität zeigt LytC bei 30 °C und hat somit eine besondere Bedeutung bei der Kolonisation des oberen Respirationstrakts. Durch seine autolytischen Fähigkeiten hat LytC eine signifikante Rolle beim „Fracticide“, der Autolyse nicht kompetenter Bakterien. Außerdem ist LytC an der Sepsisentstehung beteiligt (Bai et al., 2014; Ramos-Sevillano et al., 2011).

1.5 Kapselsynthese und Immunevasion

Die Kapsel ist der bedeutendste Virulenzfaktor der Pneumokokken (Wen et al., 2016) und kann mehr als die Hälfte ihres Volumens ausmachen (Geno et al., 2015). So sind nicht bekapselte klinische Pneumokokkenisolate avirulent. Die Kapsel schützt die Bakterien vor Antibiotika und Komplementfaktoren, die mit subkapsulären Bakterienbestandteilen interagieren und Pathogene für das Immunsystem opsonieren (Nourikyan et al., 2015). Von besonderer Bedeutung scheinen hierbei die Komplementfaktoren C3b/iC3b zu sein (Yother, 2011). Die meisten Pneumokokkenkapseln haben eine anionische Ladung. Diese verhindert das Beseitigen der Pneumokokken durch den Schleim und führt zum Abstoßen der Phagozyten durch elektrostatische Wechselwirkungen (Geno et al., 2015).

Zur Zeit sind 94 genetisch unterschiedliche Kapselserotypen bekannt (Wen et al., 2015), die entweder durch den Synthase- oder den Wzy- abhängigen Weg synthetisiert werden. Die meisten Kapselserotypen verwenden den Wzy-abhängigen Weg. Lediglich die Kapselserotypen 3 und 37 werden durch den synthaseabhängigen Weg synthetisiert. Dies geschieht durch Aneinanderreihung relativ einfacher Polysaccharidelemente von ein bis zwei Zuckern (Wen et al., 2015; Yother, 2011).

Die Kapsel des für die Experimente der Arbeit verwendeten *S. pneumoniae* D39 wird über den Wzy-abhängigen Syntheseweg synthetisiert und im Folgenden nach Yothers (2011) Publikation näher beschrieben. Die Kapselgene liegen im Chromosom nahe zusammen zwischen *dexB* und *aliA*. Sie bestehen aus vier konservierten Sequenzen *cpsABCD* (*wzg*, *wzb*, *wzd*, *wze*), die für die Modulation der Kapselsynthese wichtig und für alle Serotypen identisch sind. Das nächste Gen kodiert eine Glycosyltransferase, die die Kapselsynthese initiiert. Bei 68 Kapselserotypen handelt es sich um die mit Glukose beginnende Glycosyltransferase CpsE. Die folgenden Gene sind serotypenspezifisch und kodieren u.a. Enzyme für die Synthese von NDP-Zuckern, sind Gene für die CpsH (*wzy*) Polymerase, CpsJ (*wzx*) Flippase, Glycosyltransferasen und O-Acetylasen, die Zucker modifizieren (Yother, 2011). Die O-Acetylierung ist von besonderer Bedeutung, da O-Acetylgruppen Antigene der Pneumokokken darstellen (Geno et al., 2015).

Die Kapselsynthese erfolgt in mehreren Schritten und ist in Abbildung 3a dargestellt. Zunächst transferiert CpsE ein Zucker-1-Phosphat, meistens Glukose-1-Phosphat, von einem UDP-Zucker auf C₅₅ Lipid Undecaprenyl-Phosphat (Und-P). Anschließend hängen die Glycosyltransferasen (CpsT/F/G und I) einzelne Zucker ans Zucker-1-Phosphat. Die Flippase CpsJ transportiert die sich wiederholenden Einheiten über die Plasmamembran und CpsH polymerisiert die einzelnen Einheiten (Yother, 2011). Unvollständige oder stark veränderte sich wiederholende Einheiten sind nicht kompatibel mit CpsJ/H und führen zu einem letalen Organismus (Geno et al., 2015). Eine Mutation im *cpsJ*-Gen führt zu einer Verhinderung der Kapselproduktion (Nourikyan et al., 2015). Als Letztes wird die Kapsel entweder durch CpsA am Peptidoglykan der Zellwand verankert (Nourikyan et al., 2015), bleibt an der Membran gebunden oder wird freigesetzt. Das durch die CpsH abhängige Polymerisation der Zuckereinheiten freiwerdende Und-PP wird durch eine Phosphatase zu Und-P gespalten und auf die zytoplasmatische Membranseite transportiert (Yother, 2011).

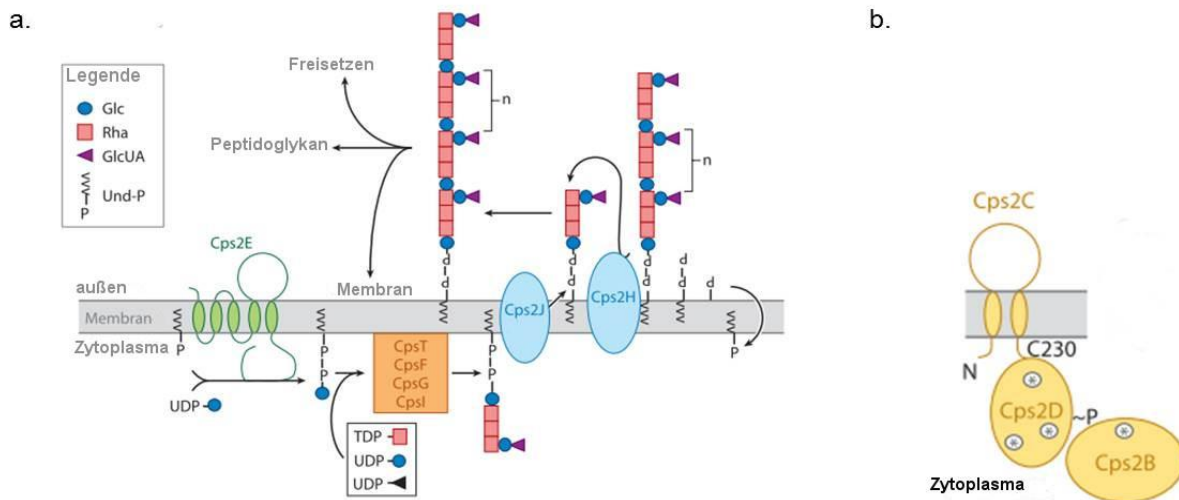


Abb. 3 a. Darstellung der Wzy-abhängigen Typ 2 Kapselsynthese von *S. pneumoniae*. Cps2J= Wzx (Flippase), Cps2H= Wzy, Glc= Glukose, Rha= Rhamnose, GlcUA= Glucuronsäure, Und-P=Undecaprenyl-Phosphat, UDP=Uridindiphosphat, TDP= Thymidindiphosphat. **b.** Cps2C/D/B als regulatorische Enzyme der Kapselsynthese. Cps2C= Wzd, Cps2D= Wze. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Adaptiert nach Yother, 2011

Die Länge der Kapselpolymere wird durch ein Tyrosinkinase-Phosphoregulations-System (CpsC und CpsD) beeinflusst (Abb. 3b) (Yother, 2011). Das Membranprotein CpsC (Wzd) wird für die initiale Phosphorylierung von CpsD (Wze), einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase, benötigt (Henriques et al., 2011; Yother, 2011). Anschließend kann das phosphorylierte CpsD durch Autophosphorylation weitere CpsDs phosphorylieren. Die Phosphatase CpsB kann CpsD dephosphorylieren sowie die initiale Phosphorylierung von CpsD blockieren (Yother, 2011).

Die CpsC-induzierte Autophosphorylierung von CpsD führt zu einer Reduktion der Kapselsynthese. Dies ermöglicht die Verankerung der Kapsel an die Zellwandpeptidoglykane. Die anschließende Dephosphorylierung führt zur erneuten Polymersynthese. Durch die ATP-Bindung an CpsD kann dieses mit CpsC interagieren und die korrekte Position am Zellteilungsseptum einnehmen. Die richtige Position am Zellteilungsseptum lässt einen Zusammenhang zwischen Kapsel- und Zellwandsynthese vermuten (Henriques et al., 2011).

Andere regulierende Faktoren für die Kapselsynthese stellen u.a. atmosphärischer Sauerstoff, Phosphoregulation, Substratkonzentrationen, Wasserstoffperoxid, Pyruvat-oxidasenaktivität und Enzymlokalisationen dar (Geno et al., 2015). Sauerstoff kann sowohl CpsB, CpsC und CpsD als auch CpsE beeinflussen. Höhere Sauerstoffkonzentrationen wie z.B. im Nasopharynx, führen zu geringeren Kapselmengen (Yother, 2011).

Bekapselte Pneumokokken benötigen im Gegensatz zu nicht bekapselten Pneumokokken höhere Phosphatmengen, die nicht über den Na^+/P_i -Kotransporter A (NptA) bereitgestellt werden können, da die Bindungsaffinität zu Phosphat zu gering ist. Hierfür werden die beiden ABC-Transporter Pst1 und Pst2 benötigt. Um eine Kapselsynthese unabhängig von den Phosphatumgebungskonzentrationen zu ermöglichen, wird Pst2 kontinuierlich exprimiert und Pst1 reguliert, da auch zu hohe Phosphatkonzentrationen schädigend für die Pneumokokken sein können (Zheng et al., 2016).

Es existieren zwei Phasenvariationen für die Pneumokokkenkapsel, die opaque und die transparente Form. Die opaque Form ist durch eine dicke Kapsel gekennzeichnet, die hauptsächlich bei invasiven Krankheiten zu finden ist und der Immunevasion dient. Die transparente Form zeichnet sich durch eine dünne Kapsel aus und besiedelt den Nasopharynxbereich. Eine dünne Kapsel ist für die Interaktion mit den Epithelzellen bei der Invasion wichtig (Lees und Gladstone, 2015).

Der zugrunde liegende Mechanismus für den Phasenwechsel beruht auf einem genetischen Rearrangement im Typ I Restriktions-Modifikations (R-M)-System (SpnD39III). Durch das Rearrangement können sechs unterschiedliche Ausprägungen mit verschiedenen Methylierungsmustern generiert werden, die ein unterschiedliches Genexpressionsmuster aufweisen. In SpnD39IIIB kommt es u.a. zu einer Herunterregulation des Kapseloperons und der *dexB*-Gene. Bei SpnD39IIIA wird der Saccharoseregulator und das Fruktoseoperon herunterreguliert sowie einige Gene u.a. *psaABC* hochreguliert. SpnD39IIIA steht im Zusammenhang mit der opaquen virulenten Form (Manso et al., 2014). Eine weitere Aufgabe des R-M-Systems ist die Zerstörung der unmethylierten Phagen-DNA im Gegensatz zur eigenen methylierten DNA (Lees und Gladstone, 2015).

1.6 Impfung

Zurzeit werden in Deutschland zwei Pneumokokkenimpfstoffarten verwendet: Ein Pneumokokken-Konjugatimpfstoff (PCV) - Prevenar oder Synflorix - gegen unterschiedliche Kapselserotypen, die kovalent mit nicht-toxischen Proteinen verbunden sind, z.B. einem genetisch inaktivierten Diphtherietoxin oder Tetanus-Toxoid, sowie ein Pneumokokken-Polysaccharidimpfstoff (PPSV23) gegen 23 unterschiedliche Kapselserotypen (EMA, 2017; Musher, 2015; PEI, 2017). Der PCV führt zu einer T-Zell-abhängigen Gedächtniszellbildung und verstärkt damit die Effektivität der Impfung (Tuomanen, 2015) besonders bei Kindern unter vier Jahren, die mit diesen Impfstoffen entsprechend dem Impfkalender der Ständigen Impfkommission geimpft werden sollen (STIKO, 2015). Der PPSV23 wird bei Kindern nicht verwendet, da Kinder unter 24 Monaten nur eine sehr geringe Antwort auf Polysaccharidantigene aufgrund ihrer geringen Th1-Immunantwort aufweisen (Marchant und Goldman, 2005) und der PPSV23-Impfstoff zu einer T-Zell-unabhängigen Antwort mit geringer Bildung eines immunologischen Gedächtnisses führt (Roux et al., 2008).

Bei den aktuell verfügbaren Impfstoffen wird nur gegen die Kapsel bestimmter Pneumokokkenstämme geimpft, sodass es entweder durch homologe Rekombination zu einem Kapselwechsel der Pneumokokken kommt (Geno et al., 2015) oder die nicht im Impfstoff enthaltenen Pneumokokkenserotypen durch Selektion an Bedeutung gewinnen (Watkins et al., 2015). Bei der homologen Rekombination sind drei Mechanismen bekannt: Es kann zu einem kompletten Austausch des Kapsellocus kommen und somit zu einem Serotypenwechsel. Oder es werden nur *dexB* und die für alle Serotypen gleichen *cpsABCD* Gene ausgetauscht. Dieses führt nur zu einer Änderung der Kapseldicke. Die dritte Möglichkeit ist, dass nur die kapselspezifischen Gene gewechselt werden, was zu einem neuen Kapseltyp führt (Wen et al., 2016).

Es ist immer noch eine technische Herausforderung, Kapselpolysaccharide für die Impfstoffherstellung zu gewinnen (Geno et al., 2015), sodass man an neueren und effektiveren Impfstoffansätzen forscht. Die Impfstoffe der nächsten Generation sollten Serotyp-unabhängig sein, somit gegen alle Pneumokokken gerichtet und alle durch Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankungen abdecken. Ein möglicher Ansatzpunkt wären synthetisch hergestellte Zucker, die Ähnlichkeiten zu den Oberflächenmolekülen der Pneumokokken haben, aber eine bessere T-Zell-Antwort als PCV oder PPSV23 hervorrufen

(Polonskaya et al., 2017; Schumann et al., 2017). Des Weiteren wären Proteinantigene, wie z.B. CBP, Pneumolysin oder Lipoproteine, die Bestandteil aller Pneumokokken sind und durch eine T-Zell-abhängige Immunantwort die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses induzieren, als Impfstoffbestandteile gut geeignet (Brown et al., 2015).

Zu Impfstrategien mit Pneumokokkenproteinen gibt es bereits einige Mausexperimente. So konnten Miyaji et al. (2015) zeigen, dass eine Immunisierung mit einer Mischung von CBP, die direkt durch Cholinchloridbehandlung eines nicht bekapselten Pneumokokkenstammes gewonnen wurden, zu einer Reduktion letaler Pneumokokkeninfektionen in Mäusen führt. Den Hauptanteil der CBP bilden PspA und PspC, die durch die Cholinchloridbehandlung als komplette Proteine gewonnen wurden. Die in Mäusen durch die Impfung mit CBP hervorgerufene Immunantwort, führt sowohl zur Bekämpfung von Pneumokokkenstämmen, aus denen die CBP gewonnen wurde, als auch zum Schutz durch Kreuzreaktivität gegen die CBP anderer Stämme, sodass die Letalität der Infektion im Mausmodell verhindert werden konnte (Miyaji et al., 2015). Für einen Impfstoff gegen mehr Pneumokokkenserotypen können CBP auch mit anderen Proteinen wie z.B. dem Pneumolysin oder der Pneumokokkenkapsel kombiniert werden. So impften Lin et al. (2015) Mäuse mit rekombinant durch *E.coli* produzierten PspA (rPspA), Cps und Cps konjugiert mit rPspA (Cps-rPspA). Hierbei konnte lediglich eine Immunität gegen die Kapsel des Bakteriums, aus dem die Gene stammen, nachgewiesen werden und eine weitere Schutzwirkung gegen zwei Pneumokokkenserotypen durch Kreuzreaktivität des rPspA. Das rPspA führte als Konjugat zu einer stärkeren Th1-Immunantwort als die Kapsel alleine (Lin et al., 2015).

Neben den beiden CBP PspA und PspC ist auch Pneumolysin für Impfungen geeignet, da diese drei Proteine den höchsten Antikörpertiter bei Pneumokokkeninfektionen induzieren (Chen et al., 2015). In ihren Experimenten konnten Chen et al. (2015) herausfinden, dass bei Mäusen eine Impfung mit allen drei Komponenten (nicht toxische Ply, PspA, PspC) am besten geeignet ist, da sie einen Schutz gegen durch unterschiedliche Pneumokokkenstämme hervorgerufene Sepsis, Pneumonie und Meningitis bietet (Chen et al., 2015).

Die immunstimulatorische Wirkung der Lipoproteine auf die Th17-vermittelte Immunantwort konnte durch eine Deletion der Lipoproteindiacylglyceryltransferase (Lgt) im Pneumokokkenstamm, der für die Impfung mit ganzen Zellen (WCV) verwendet wird,

gezeigt werden. Hierbei konnten in einem Mausmodell, bei entweder mit WCV oder WCV- Δlgt geimpften Mäusen, nach Pneumokokkeninfektion mehr Pneumokokken bei den mit WCV- Δlgt geimpften Mäusen in der Nasalspülung nachgewiesen werden (Moffitt et al., 2015).

In dieser Arbeit werden die immunmodulatorischen Eigenschaften von CBP und Phosphocholin des *S. pneumoniae* Stammes D39 auf humane Blutzellen untersucht. CBP führen in einem Mausmodell bereits zu einer guten Immunität (Miyaji et al., 2015). Die Verwendung eines humanen Zellsystems soll die Individualität der einzelnen Personen abdecken, um mögliche Impfstoffproteine an verschiedenen Personen testen zu können. Durch einen auf CBP basierenden Impfstoff könnten durch Pneumokokken hervorgerufenen tödlichen Krankheiten vorgebeugt werden und als Nebeneffekt ebenfalls die Antibiotikaresistenz der Pneumokokken gesenkt werden.

1.7 Zielsetzung

Die heute eingesetzten Impfstoffe gegen Pneumokokken basieren auf der Induktion von Immunität gegen das Kapselpolysaccharid der darin berücksichtigten Stämme. Impfstoffe, die gegen alle Pneumokokkenstämme wirksam sind, existieren bislang nicht. Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die immunmodulatorischen Eigenschaften von alternativen Pneumokokken-spezifischen Oberflächenmolekülen zu untersuchen. Dazu gehören die Cholin-bindenden Proteine, das Poren-formende Toxin Pneumolysin und TLR2-aktive Lipoproteine.

2. Material und Methoden

Für die Experimente wurde der Bakterienstamm *S. pneumoniae* D39 sowie deren Mutanten verwendet, um deren immunstimulatorisches Potential auf humane Blutzellen zu testen und Strukturen von Pneumokokken zu erforschen. Hierfür wurde eine Vielzahl an Methoden verwendet, die mehrere Chemikalien und Geräte benötigen.

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller (Standort, Land)
Bleicitrat	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Deisenhof, Deutschland)
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Epon	Sigma-Adrich (Missouri, USA)
Ethanol absolut p.A.	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
FCS low	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Glutaraldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Humanes Pancoll	PAN™ Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Humanserum	Im Labor hergestellt, durch Hitzeinaktivierung von Spenderserum
Immersionsöl (Immersionol™ 518F)	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Isopropanol	VWR (Bruchsal, Deutschland)
L-Glutamine	Life Technologies (Paisley, Schottland)
Lipofectamine® 2000	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Lysinacetat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Milchpulver	Sucofin TSI GmbH & Co. KG (Zeven, Deutschland)
Mounting Medium	Vector Laboratories (California, USA)
Mowiol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natrium Chlorid (NaCl)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Bleiswijk, Niederlande)
Pierce™ ECL-Substrat	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Ruthenium Rot	Polaron Equipment Ltd (Watford, England)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	PANREAC QUIMICA S.L.U. (Barcelona, Spanien)
SDS ultrapure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tris Base	Sigma-Aldrich (Buchs, Schweiz)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
UltraPure™ Agarose	Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Uranylacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Molekularbiologisch verwendete Enzyme und Reagenzien

Bezeichnungen der Reagenzien	Hersteller (Standort, Land)
Fast Ruler Middle, Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
6x DNA-Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
10x DreamTaq Puffer	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
dNTP Mix, je 10 mM	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Amoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Acrylamide/Bisacrylamide solution 30 %	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Aqua ad injectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

2.1.3 Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller (Standort, Land)
10 x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	80,0g NaCl, 11,6g Na ₂ HPO ₄ , 2,0g KH ₂ PO ₄ , 2,0g KCL, mit Aqua dest. auf 1l auffüllen; pH 7,0	Gibco/Life science (Darmstadt, Deutschland)
10 x TBE (Tris-Borat-Elektrophorese)	108g 89mM TRIS Base, 55g 89mM Borsäure, 7,44g 2mM EDTA-Na ₂ , mit Aqua dest. auf 1l auffüllen	Labor
Optimem		Gibco/Life science (Darmstadt, Deutschland)
RPMI 1640		Gibco/Life science (Darmstadt, Deutschland)
autoMACS [®] Running Puffer		Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Westernblot-Puffer		
RIPA-Lysepuffer	1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Na-Deoxychololat, 1 % Tween 20, 0,9g NaCl, 0,79g Tris Base, bis zu 100ml mit Aqua dest. auffüllen	Labor
2x Sammelpuffer	3 % Tris Base, 0,2 % SDS, bis zu 1l mit Aqua dest. auffüllen, pH 6,8	Labor
3x Separationspuffer	13,6 % Tris Base, 0,3 % SDS, bis zu 1l mit Aqua dest. auffüllen, pH 8,8	Labor
5x Lämmli-Puffer	1 ml 1M Tris HCl, 0,5ml Glycerol, 5ml 10 % SDS, 20µl 10 % Bromophenol Blau bis zu 10 ml mit Aqua dest. auffüllen, Aliquots von 800µl je 200µl β-mecaptoethanol hinzufügen	Labor
TBS-T (TBS + Tween 20)	2,42g Tris Base, 8g NaCl, bis auf 1l mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,6 + 2ml Tween 20	Labor
Semi-dry-Blotting-Puffer	3,025g 25mM Tris Base, 14,425g 192mM Glycin, 100ml 10% Methanol bis zu 1l mit Aqua dest. auffüllen	Labor
10x Laufpuffer	30,25g 25mM Tris Base, 144,26g 192mM Glycin, 10g 0,1 % SDS bis zu 1l mit Aqua dest. auffüllen	Labor

ELISA-Puffer		
Zytokin-ELISA (BD)		
Coating-Puffer	0,1 M Natrium Carbonate, pH 9,5, 7,13 g NaHCO ₃ , 1,59 g Na ₂ CO ₃ ; bis zu 1 l mit Aqua dest. auffüllen; pH 9,5	Labor
Assay Diluent	PBS + 10 % FCS, pH 7,0	Labor
Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween 20	Labor
Substratlösung-Tetramethylbenzidine (TMB)		BD Biosciences, Pharmingen (San Diego, USA)
Stopplösung	2 N H ₂ SO ₄	Labor
IL-18 ELISA		
Assay Puffer	5 g Bovine Serum Albumin (BSA) + 500 µl Tween 20 mit PBS auf 1 l auffüllen	Labor
Waschpuffer	500 µl Tween 20 in 1 l PBS	Labor
Blocking Puffer	5 g Bovine Serum Albumin (BSA), 500 µl Tween 20, 75 g Saccharose, mit PBS auf 500 ml auffüllen	Labor
Substratlösung-Tetramethylbenzidine (TMB)		BD Biosciences, Pharmingen (San Diego, USA)
Stopplösung	2 N H ₂ SO ₄	Labor
Immunglobulin-ELISA (Bethyl)		
Coating Puffer	0,05 M Carbonate-Bicarbonate, pH 9,6	Labor
Waschpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 8,0	Labor
Sample/Conjugate Diluent	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20	Labor
Substrat- und Stopplösung	wie Zytokin-ELISA	

2.1.4 Nährmedien

Nährmedium	Hersteller (Standort, Land)
Columbia-Blutagar mit 5% Schafblut	BD (Heidelberg, Deutschland)
Tryptone Soya Broth (TSB)	Oxoid (Wesel, Deutschland)
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hefeextrakt	Oxoid (Wesel, Deutschland)

2.1.5 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Deletiertes Gen	Resistenzgene	Zur Verfügung gestellt von	Referenzen
<i>S. pneumoniae</i> D39			Prof. Dr. S. Hammerschmidt, Greifswald	
<i>S. pneumoniae</i> D39 Δcps	Deletion des Kapselgens (<i>cps</i>)	Kanamycin	Prof. Dr. S. Hammerschmidt, Greifswald	(Ribes et al., 2010)
<i>S. pneumoniae</i> D39 $\Delta cps \Delta lgt$	Deletion des Kapselgens (<i>cps</i>), homologe Rekombination des <i>lgt</i> Gens	Kanamycin, Erythromycin	Prof. Dr. S. Hammerschmidt, Greifswald	(Pribyl et al., 2014)
<i>S. pneumoniae</i> D39 <i>cho</i> ⁻	Selektion auf Cholin-freiem Agar		Prof. Dr. A. Tomasz, New York, USA	(Kharat und Tomasz, 2006; Kharat et al., 2008)
<i>S. pneumoniae</i> D39 <i>cho</i> ⁻ <i>licA64</i>	Selektion auf Cholin-freiem Agar (s.o.) und zusätzlich Deletion des <i>licA</i> Gens	Erythromycin	Prof. Dr. A. Tomasz, New York, USA	(Damjanovic et al., 2007)
<i>S. pneumoniae</i> D39 <i>chip</i> ^{T700}	Mutation im <i>tacF</i> -Gen G700→T700; Selektion auf Cholin-freiem Agar		Prof. Dr. W. Vollmer, Newcastle, UK	(Damjanovic et al., 2007)
<i>S. pneumoniae</i> D39 <i>chip</i> ^{T700} <i>licB31</i>	Mutation im <i>tacF</i> -Gen G700→T700 (s.o.) und Deletion des <i>licB</i> Gens	Erythromycin	Prof. Dr. W. Vollmer, Newcastle, UK	(Damjanovic et al., 2007)
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4			Prof. Dr. S. Hammerschmidt, Greifswald	

2.1.6 Gebrauchsfertige Kits und Stimulatoren

Kit	Hersteller (Standort, Land)
BD Cell Viability Kit	BD (Erembodegem-Aalst, Belgien)
Pierce BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
FlowCytomix™ Multiplex Kit Th1/Th2 11plex	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)
Qiagen Maxiprep	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
ELISA-Kits	
hIgA, hIgG, hIgM	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
hIL-18	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)
hIL-8, hIL-10, hTNF- α , hIL-1 β	BD Biosciences (San Diego, USA)
Stimulator	
Pam3 CSK ₄	EMC Microcollections (Tübingen, Deutschland)
R848	Invivogen (Toulouse, Frankreich)
CpG-2006PTO 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'	MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)
Salmonellen LPS	Geschenk von U. Zaehring, Forschungszentrum Borstel, Deutschland
Remicade® (anti-TNF α)	MSD SHARP & DOHME GmbH (Haar, Deutschland)
mouse anti-human TLR2 IgG2B mAb (Cat# MAB2616)	R&D Systems™ (Minneapolis, USA)
mouse IgG2B isotype control (clone 20116; Cat# MAB004)	R&D Systems™ (Minneapolis, USA)

2.1.7 Farbstoffe und Antikörper

Farbstoff/Antikörper	Hersteller (Standort, Land)
Trypanblau	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Monoklonaler Antikörper gegen Zellwand Polysaccharide der Pneumokokken HAS (Spezifität für Phosphocholin)	Statens Serum Institut (Kopenhagen, Dänemark)
Kaninchen IgG anti-Maus IgG (F(ab') ₂)-Cy5	Dianova GmbH (Hamburg, Deutschland)
Pneumokokkenantiserum Kapselserotyp 2	Statens Serum Institut (Kopenhagen, Dänemark)
Ziege anti-Hase IgG/IgM-FITC	AbD Serotec (Oxford, UK)
Polyvalentes humanes IgG (IVIG)	Baxter (Wien, Österreich)
anti-total Human Ig	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Maus IgG HRP konjugiert	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

anti-CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany)
CD14-FITC	BD Bioscience (California, USA)
CD36-PE	BD Bioscience (California, USA)

2.1.8 Gebrauchsgegenstände

Gegenstand	Hersteller (Standort, Land)
0,1 mm Precellys [®] Glas Kit	Peqlab (Erlangen, Germany)
Serologische Pipette 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Corning [®] Costar [®] Stripette [®] serological pipettes 5 ml	Corning Inc. (Massachusetts, USA)
Cellstar [®] Serologische Pipette 10 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Falcon [®] Serologische Pipette 50 mL	Corning Inc. (Massachusetts, USA)
Greiner Zentrifugen Reaktionsgefäß 15 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Falcon [®] Zentrifugen Reaktionsgefäß 50 ml	Corning Inc. (Massachusetts, USA)
CELLSTAR [®] 96 Loch Platte	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Deckglas	Engelbrecht (Edermünde, Deutschland)
ELISA-Platte, 96 Lochplatte, halbe Fläche	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße	Nerbe plus GmbH (Winsen/Luhe, Deutschland)
Waterman Protan Nitrozellulose Transfermembran	Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Deutschland)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	STARLAB GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Schnappdeckgläser 7 ml	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Zellkulturflaschen (175 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Impfschlingen (10 µl, 1 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Abstrichstäbchen (Watte, Holz)	LP ITALIANA SPA (Mailand, Italien)
Durchflusszytometer Reaktionsgefäße	Corning Inc. (Massachusetts, USA)

2.1.9 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller (Standort, Land)
Zellseparator	autoMACS [®] Pro Separator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra Eismaschinen (Isernhagen, Deutschland)
Mikroplatten Lesegerät	SpectraMax 340PC384	Molecular Devices (Californien, USA)
Durchflusszytometer	FACS Canto I	BD Biosciences (Californien, USA)
Agarose-Gelelektrophorese	Easy Cast Electrophoresis System	Thermo scientific (Massachusetts, USA)
Energiequelle für Agarose Gelelektrophorese	Consort EV243	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
SDS-Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad (München, Deutschland)
Energiequelle für SDS-Gelelektrophorese	Power Supply "PowerPac [™] 200/2.0"	Bio-Rad (München, Deutschland)
Heizblock	VorTemp [™] 56 EVC	Labnet (New Jersey, USA)
Homogenisator	FastPrep [®] -24 Instrument	MP (California, USA)
Imager	ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech (California, USA)
	Microchemi 4.2	DNr Bio-Imaging Systems (Jerusalem, Israel)
CO ₂ - Inkubator	New Brunswick [™] Galaxy [®] 170S	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikroskope	Apotom	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
	Axio Vert. A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
	Dialux	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
	Diavert	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotom	Utracut E	Leica (Wien, Österreich)
Taumel-Wipptisch	WT 12	Analytik Jena AG (Jena, Deutschland)

Semidry- Blotter	Semi-Dry Transfer Unit TE 77 PWR	Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Thermocycler	Labcycler	SensoQuest GmbH (Göttingen, Deutschland)
Transmissionselektronenmikroskop	TEM Zeiss EM 902	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Zählkammer	Neubauerzählkammer Dicke: 0,1mm	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifugen	Heraeus Biofuge [®] Fresco	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, Deutschland)
	Heraeus Multifuge 3 SR	Thermo scientific (Massachusetts, USA)
Pipetten 0,1–2,5 µl; 2–20 µl; 20–200 µl; 100–1000 µl	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
McFarland Messgerät	Densimat	BioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
Thermorührer	RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
pH-Meter	pH522	Wissenschaftlich technische Werkstätte (Weilheim, Deutschland)
Waage	Scaltec SBA53	BeWA-tec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	HERAsafe [®] HSP18	Hereaus Instruments (Hanau, Deutschland)
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences (AG Zizers, Schweiz)

2.1.10 Programme

Programm	Hersteller (Standort, Land)
AxioVision SE64 Rel. 4.9	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
CellProfiler 2.1.1	Frei Verfügbar (http://www.cellprofiler.org/)
BD FACSDIVA™ Software	BD Biosciences (California, USA)
Flow cytomix Pro 2.2.1	Affymetrix (Ohio, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Image J	Frei Verfügbar (http://imagej.nih.gov/ij/)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmont, USA)
Primer 3 Release 2.3.6	Frei Verfügbar (http://primer3.sourceforge.net/releases.php)
siViewer	Olympus Soft Imaging Solution GmbH
Wolfram Mathematica 10.2	Wolfram (Oxfordhire, Großbritannien)

2.2 Methoden

Das immunstimulatorische Verhalten von *S. pneumoniae* D39 wurde mit Hilfe von zell- und mikrobiologischen Methoden untersucht. Die bakteriellen Eigenschaften konnten durch Mikroskopie, Molekularbiologie sowie Biochemie überprüft werden.

2.2.1 Mikrobiologie

2.2.1.1 Kultur von *S. pneumoniae*

S. pneumoniae ist auf Columbia-Blutagar (BD) für 48 h, in TSB-Flüssigkultur (Oxoid) ± 2 % Cholinchlorid (Sigma-Aldrich) für 8-12 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert worden.

2.2.1.2 Vitalitätsfärbung

Pneumokokken sind unter allen drei Wachstumsbedingungen (Columbia-Blutagar: 24 h, TSB und TSB + 2 % Cholinchlorid: 8-12 h) zu den angegebenen Zeiten kultiviert worden. Ca. 3·10⁸ CFU wurden in PBS resuspendiert und nach Herstellerangaben für das „BD Cell Viability Kit“ (BD Biosciences) für Bakterien und Hefezellen gefärbt. Hierbei färbt Thiazolorange alle Bakterien grün und Propidiumiodid die toten Bakterien rot (BD) (Fröhling und Schlüter, 2015). Anschließend wurden die gefärbten Bakterien mit 2 % PFA für 2 min fixiert und 1x mit PBS gewaschen. Es folgt das Auftragen der Bakterien auf den Objektträger und die Zugabe von Mowiol unter das Deckglas.

Die Bilder wurden mit dem Apotom von Zeiss aufgenommen und die Vitalität durch zwei Auswertungsmethoden bestimmt. Abbildung 4a stellt ein repräsentatives Bild für die Vitalitätsfärbung dar.

Die beiden hier vorgestellten Auswertungsmethoden basieren auf der unterschiedlichen 8-bit RGB-Kodierung der beiden Farbstoffe. Das Verhältnis der roten und grünen Intensitäten wird als Maß der Vitalität verwendet. Hierbei treten einige Schwierigkeiten auf, die im Folgenden beschrieben werden.

Die Bakterien füllen meist nicht das ganze Bild aus, sodass ein Hintergrund zu erkennen ist. Da dieser Hintergrund häufig rot oder grünlich gefärbt ist (Abb. 4d), reicht eine Mittelung der Intensitäten nicht aus, um die Vitalität zu bestimmen. Der Einfluss des Hintergrunds muss

daher minimiert werden. Des Weiteren führt die manuelle Justage des Mikroskops zu einem systematischen Fehler, da die relativen RGB-Intensitäten schwanken.

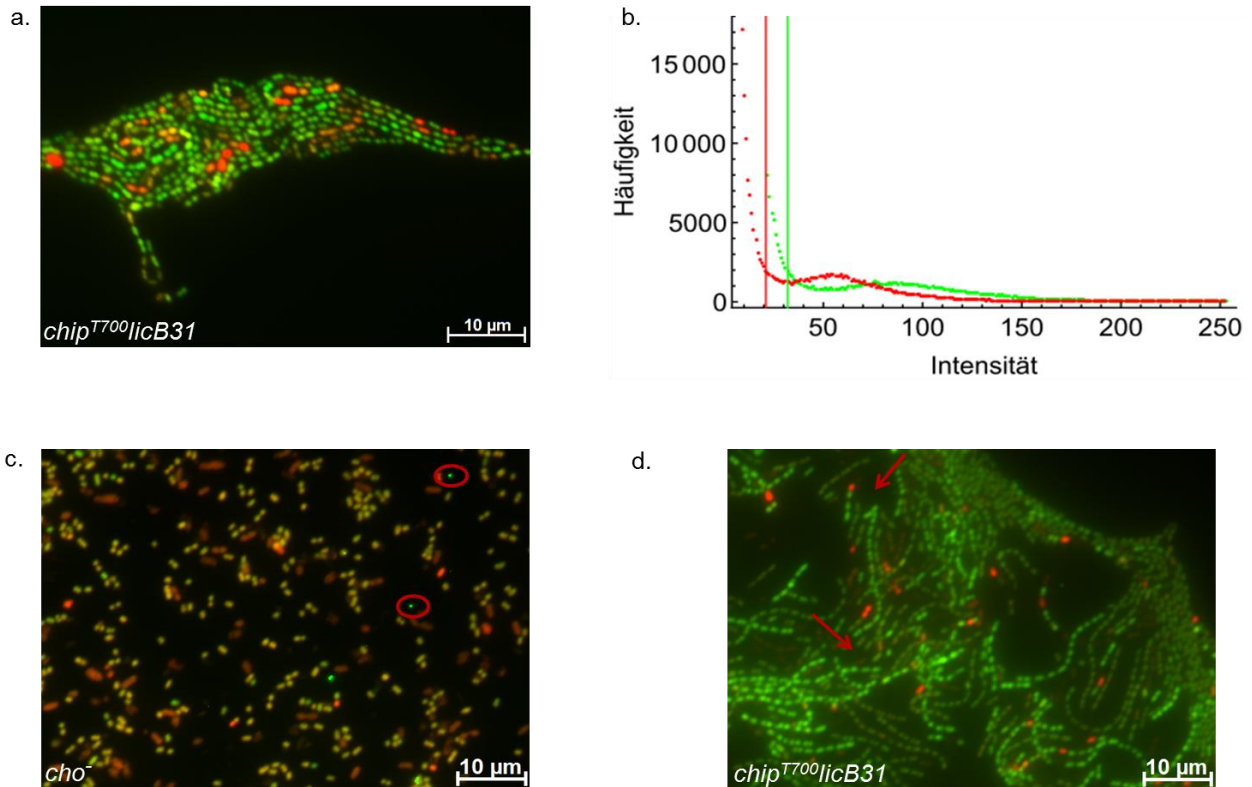


Abb. 4 Vitalitätsfärbung von *S. pneumoniae* D39 Mutanten und dem Wildtyp. Die Pneumokokken wurden alle mit Thiazolorange und Propidiumiodid gefärbt. Thiazolorange färbt alle Bakterien grün und Propidiumiodid die toten Bakterien rot. **a.** Ein repräsentatives Bild für die Vitalitätsfärbung. **b.** Histogramm der Rot- und Grün-Intensitäten von Bild a.. Der rote Strich stellt den ersten Wendepunkte der Rot-Intensität dar und der grüne Strich den für die Grün-Intensität. **c.** Darstellung von saturierten Pixeln (roter Kreis), die bei der Schwellwertmethode nicht berücksichtigt werden. **d.** Durch das Wachstum in langen Ketten können, bei zu hoch eingestellten Bakteriendurchmessern in der Clusteranalyse, Hintergründe mit zu Bakterien gerechnet werden (rote Pfeile). Außerdem ist in diesem Bild gut die Bedeutung der Hintergrundsubtraktion bei der Schwellwertmethode zu sehen, da ansonsten durch die leichte Grünfärbung des Hintergrundes, das Rot/Grün Verhältnis stark verändert wäre. Der Maßstabsbalken entspricht bei allen Bildern 10 µm.

Zur computergestützten Auswertung werden zwei Methoden vorgestellt. Zum einen eine auf Mathematica und ImageJ basierende Schwellwertanalyse. Hierbei wird manuell ein Schwellwert für die rote und grüne Intensität gesetzt. Nur jene Pixel, die über dem jeweiligen Schwellwert liegen, werden in die Analyse mit einbezogen (Abb. 4b). Die anderen werden als Hintergrund betrachtet und ignoriert. Die zweite hier vorgestellte Methode ist eine auf CellProfiler basierte Clusteranalyse. Das Programm identifiziert

einzelne Bakterien mit Hilfe eines Clustering-Algorithmus der aus mehreren Publikationen zusammengesetzt ist (Malpica et al., 1997; Meyer und Beucher, 1990; Ortiz de Solorzano et al., 1999; Wählby et al., 2004). Weitere Informationen zu dem Clustering-Algorithmus sind im CellProfiler Handbuch zu finden (Carpenter AE und Jones TR, 2014).

Schwellwertmethode

Die Schwellwertanalyse zur Bestimmung der Vitalität besteht aus mehreren Schritten. ImageJ bietet die Möglichkeit, ein Histogramm der RGB-Intensitäten separat zu erstellen. Der Hintergrund besteht aus Pixeln mit sehr geringer Intensität.

Die Verteilung der Intensitäten der Pixel, die Bakterien darstellen, ist deutlich breiter als jener des Hintergrunds (Abb. 4d). In der Gesamtverteilung ist die Grenze zwischen Bakterien und Hintergrund daher die erste Wendestelle im Histogramm (Abb. 4b). Die Wendestelle dient in der Analyse als Schwellwert und alle Pixel mit einer geringeren Intensität werden ignoriert. Es gibt außerdem saturierte Pixel, welche die Maximalintensität von 255 anzeigen (Abb. 4c). Auch diese werden ignoriert.

Die Histogramme werden danach in Mathematica eingelesen. Die Anzahl der betrachteten Pixel für Rot und Grün wird verglichen und eine Übereinstimmung von 20 % gefordert. Weichen die Gesamtpixelzahlen stärker voneinander ab, ist zu vermuten, dass die Hintergrundsubtraktion bei einer der beiden Farben nicht optimal funktioniert hat. In diesem Fall wurden die Schwellwerte manuell angepasst.

Der letzte Schritt ist die Summierung über alle übrig gebliebenen Pixel und die Berechnung des Rot zu Grün Verhältnisses.

Durch den großen systematischen Fehler dieser Methode wird auf die Berechnung eines statistischen Fehlers verzichtet.

Clusteranalyse

Auch die Clusteranalyse ist ein mehrschrittiger Prozess. Als Erstes werden ein oder mehrere Bilder in CellProfiler eingelesen. CellProfiler erstellt aus den RGB-Bildern ein Graustufenbild und extrahiert die Bilder in Rot und Grün.

Anhand des Graustufenbildes erkennt der Clustering-Algorithmus einzelne Bakterien. Hierzu muss der minimale und maximale Durchmesser der Bakterien in Pixeln angegeben

werden. Die empirisch gefundenen Werte hierfür sind 4 und 27 Pixel. Ein höherer maximaler Durchmesser führte dazu, dass großflächige Bereiche des Bildes als ein einzelnes Bakterium erkannt wurden. Ein geringerer maximaler Durchmesser ließe einige Bakterien ungeachtet (Abb. 4d).

Der Clustering-Algorithmus wird auf das Graustufenbild angewandt, da dies das höchste Signal-zu-Rausch Verhältnis hat. Außerdem können so lebende und tote Bakterien in einem Schritt erkannt werden. Eine statistische Auswertung auf Grundlage einzelner Bakterien wird dadurch ermöglicht. Dies wäre bei separater Betrachtung der Rot- und Grünbilder nicht möglich, da nicht die gleichen Bakterien erkannt werden.

CellProfiler gibt für jedes gefundene Bakterium die mittlere Intensität, den Median und die Standardabweichung der Intensität für Rot und Grün separat an. Diese Informationen werden in eine Textdatei exportiert. In der ersten Spalte wird die Bildnummer angegeben, sodass die gemeinsame Analyse von mehreren Bildern möglich ist.

Der finale Schritt findet in Mathematica statt. Hier wird die von CellProfiler ausgegebene Textdatei eingelesen und nach Bildern aufgespaltet. Für jedes Bild wird der Mittelwert der mittleren Intensität der einzelnen Bakterien h_i berechnet. Diese Analyse wurde auch mit dem Median der Mittelwerte, dem Mittelwert der Mediane und dem Median der Mediane durchgeführt. Jedoch hat sich gezeigt, dass die erste Methode zu den reproduzierbarsten Ergebnissen führte.

Prinzipiell könnte mit dieser Auswertungsmethode auch eine Entscheidung für jedes einzelne Bakterium getroffen werden. Allerdings waren die Intensitätsunterschiede zwischen lebenden und toten Bakterien zu gering um eine zuverlässige Unterscheidung zu gewährleisten.

Auch in dieser Methode wird aufgrund des hohen systematischen Fehlers auf die Berechnung eines statistischen Fehlers verzichtet.

Fehlerberechnung

Es wurden mehrere Bilder von jedem Präparat aufgenommen und beide Analysen für jedes Bild durchgeführt. Das Rot zu Grün Verhältnis des Präparats h_i wird aus dem Mittelwert der einzelnen Werte berechnet. Der Fehler hierbei wird durch den Standardfehler angegeben.

2.2.1.3 Phosphocholinnachweis durch Fluoreszenzmikroskopie

Aus der Übernachtskultur in TSB-Flüssigmedium gewachsenen Pneumokokken wurden ca. $8 \cdot 10^8$ CFU mit einem 1:200 verdünnten Antikörper gegen Phosphocholin der Pneumokokken Zellwand (SSI) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Pneumokokken 2x mit PBS gewaschen und mit einem 1:300 verdünnten Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy5 (Dianova) für 30 min inkubiert. Daraufhin ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und für 2 min mit 2 % PFA fixiert. Pneumokokken wurden auf den Objektträger gegeben und Mowiol hinzugefügt. Die Bilder (Abb. 6a) wurden mit dem Apotom von Zeiss aufgenommen.

2.2.1.4 Kapselnachweis durch Fluoreszenzmikroskopie

Aus der Übernachtskultur der Pneumokokken in TSB-Flüssigmedium + 0,5 % Hefeextrakt wurden ca. $500 \cdot 10^6$ CFU mit 1:1000 verdünnten Typ 2 Antiserum (SSI) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen und mit einem 1:200 verdünnten Sekundärantikörper Ziege gegen Hase IgG/IgM: FITC (AbD Serotec) für 30 min inkubiert. Danach wurde noch einmal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA für 2 min inkubiert. Pneumokokken wurden auf den Objektträger aufgetragen und mit Mounting Medium bedeckt. Die Bilder (Abb. 14a) wurden mit Axio Vert. A1 von Zeiss aufgenommen.

2.2.1.5 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie erfolgte in Kooperation mit Dr. Klaus Boller, Paul-Ehrlich-Institut, Langen. Für den Kapselnachweis im Transmissionselektronenmikroskop sind die Pneumokokken über Nacht in TSB-Flüssigmedium gewachsen und ein gut sichtbares Bakterienpellet wurde abzentrifugiert (8000 rpm, 2 min). Die Bakterienfixation erfolgte durch das Lysinacetat basierte Formaldehyd-Glutaraldehyd-Ruthenium Rot-Osmium Fixationsprozedere (Hammerschmidt et al., 2005). Anstelle des Cacodylat Puffers wurde PBS verwendet. Für die Agarose-Einbettung wurden die resuspendierten Bakterien abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min), das Bakterienpellet 1:1 mit 3 %-iger Agarose gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden Würfel geschnitten, die in Schnappdeckgläser mit 0,075 % Ruthenium Rot in PBS gegeben wurden. Es folgte eine weitere Fixierung mit 1 %-igem Osmium in destilliertem Wasser und 0,075 % Ruthenium Rot für 1 h auf Eis. Anschließend wurde das Präparat 3x für 5 min mit PBS und 0,075 % Ruthenium Rot gewaschen und mit Ethanol (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %) für

jeweils 30 min entwässert. Am Ende wurde es zweimal für je 15 min in reinem Ethanol entwässert und eine Ethanol/Epon Verdünnungsreihe (2+1,1+1,1+2) wurde hergestellt. Das Präparat wurde danach in jede Ethanol/Epon-Verdünnungsstufe für 30 min gelegt, anschließend 1 h in reines Epon (offen) und über Nacht ebenfalls in reinem Epon belassen. Am nächsten Tag erfolgte alle 3 bis 4 h ein Eponwechsel und anschließend eine Eponeinbettung, die für 48 h polymerisieren sollte. Nun folgten das Abwaschen der Gelatine, das Trimmen und Schneiden, sowie die Nachkontrastierung mit 5 % Uranylacetat und Bleicitrat und das anschließende Auswerten der Präparate unter dem Transmissionselektronenmikroskop TEM Zeiss EM 902 (Abb. 14b).

2.2.2 Zellbiologie

2.2.2.1 Isolation und Stimulation von Leukozytenpopulationen

Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus Buffy Coats des Blutspendedienstes der Universitätsklinik Bonn isoliert. Der Gebrauch von humanen PBMCs wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt (Genehmigt # 36/12).

Zur PBMC-Isolation aus den Buffy Coats wurde der humane Pancolgradient verwendet. Die Monozytenisolation erfolgte durch Positivselektion mit dem poscel_s AUTOMACS Programm aus PBMCs mit humanen CD14 MicroBeads (Miltenyl). Die Reinheit betrug > 95 %.

Die PBMCs wurden zur Stimulation in Zellkulturmedium (RPMI, 20 % FCS low, 2 % Penicillin/Streptomycin, 2 % L-Glutamin) resuspendiert und auf eine 96-Lochplatte übertragen, wobei 200.000 Zellen in jedes Loch gegeben wurden. Anschließend wurden sie mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten und dem Wildtyp (MOI=10) stimuliert und für 13 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Aus den Überständen wurden die Immunglobuline M, G und A durch ELISA (Bethyl) bestimmt. Die restlichen Überstände wurden bei -20 °C eingefroren. Als Positivkontrolle diente 0,5 µM CpG-2006PTO.

Für die Monozytenstimulation wurden diese in Medium resuspendiert (RPMI, 2 % Humanserum, 2 % Penicillin/Streptomycin, 2 % L-Glutamin) und je 100.000 Monozyten pro

Loch auf eine 96-Loch Flachbodenplatte gegeben. Anschließend wurden diese mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten und dem Wildtyp (MOI=20) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinkonzentrationen durch ELISA (BD) bestimmt. Die restlichen Überstände wurden bei -20 °C eingefroren. Als Positivkontrollen dienten je nach Experiment entweder R848 (1 µg/ml) oder Pam3 CSK₄ (100 ng/ml).

2.2.2.2 Vorstimulation von Monozyten mit Lipopolysaccharid

Nach der Monozytenisolierung wurden diese mit 1 ng/ml LPS in einem Medium aus RPMI, 2 % Humanserum, 2 % Penicillin/Streptomycin und 2 % L-Glutamin für 2 h bei Raumtemperatur vorstimuliert. Anschließend wurden sie einmal mit PBS gewaschen, im eben genannten Medium resuspendiert und in eine 96-Loch Flachbodenplatte ausplattiert. Darauf folgend wurden die Monozyten mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten und dem Wildtyp (MOI=20) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Überstände abgenommen und Zytokinkonzentrationen durch einen ELISA (BD) bestimmt. Die restlichen Überstände wurden bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.3 Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen

Die HEK 293-Zellen (DSMZ #ACC305) wurden in Zellkulturflaschen in HEK-Medium (RPMI + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % L-Glutamin) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 70-80 % erreicht haben. Zur Ablösung der Zellen wurde 2 mM EDTA in PBS für 2 min auf die Zellen gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt, gezählt und zur Hälfte entnommen. Die übrigen Zellen wurden zum weiteren Wachstum mit neuem HEK-Medium in die Zellkulturflasche zurückgegeben.

Für die Transfektion wurden zunächst 50.000 HEK293-Zellen in HEK-Medium resuspendiert, in je ein Loch einer 96-Loch Flachbodenplatte gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert, wobei sich die HEK293-Zellen verdoppelten. Anschließend wurde das HEK-Medium zu Optimem gewechselt, in dem die Transfektion mit dem TLR2-Plasmid stattfand. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde zunächst in einem Reaktionsgefäß ein Gemisch aus Lipofectamin (0,5 µl pro Loch) und Optimem (25 µl pro Loch) gemischt. Zur Hälfte des Lipofectamin/Optimem-Gemisches wurde TLR2-Flag cDNA

(p-Flag-CMV-1) (200 ng pro Loch) gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Für die eigentliche Transfektion wurde in die eine Hälfte der Löcher das Lipofectamin/Optimem-Gemisch mit der TLR2-Flag cDNA gegeben und die andere Hälfte der Löcher das Lipofectamin/Optimem-Gemisch als Negativkontrolle. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die HEK293-Zellen 1x mit PBS gewaschen (1300 rpm, 6 min), neues HEK-Medium wurde hinzugegeben und anschließend mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten (MOI=10) über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Als Positivkontrolle dient Pam3 CSK₄ 200 ng/ml und als Negativkontrolle HEK-Medium. Die Überstände wurden nach 24 h abgenommen und IL-8 bestimmt. Die restlichen Überstände wurden bei -20 °C eingefroren.

2.2.3 Molekularbiologie

2.2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung gewünschter DNA-Abschnitte. Für die DNA Gewinnung von *S. pneumoniae* D39 Mutanten und dem Wildtyp wurden 200 µl einer Übernacht Bakterienkultur (ca. 5·10⁷ CFU) in TSB + 0,5 % Hefeextrakt-Flüssigkultur abzentrifugiert (8000 rpm, 2 min) und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden für 7 min in einen 98 °C heißen Heißblock gestellt und anschließend bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und enthält die DNA. Für 8 Proben (7 Bakterienstämme und eine Negativkontrolle ohne bakterielle DNA) wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

Tab. 1 PCR-Ansatz für 8 Proben

Für 8 Proben	
10x DreamTaq Puffer	22 µl
10 mM dNTP-Gemisch	4,4 µl
Vorwärtsprimer (F)	2,2 µl
Rückwärtsprimer (R)	2,2 µl
Destilliertes H₂O	170,5 µl
DreamTaq Polymerase	1,1 µl
Je 22,5 µl des Gemisches (ersten 6 Substanzen) plus 2,5 µl bakterielle DNA in einem Reaktionsgefäß	
Bakterielle DNA	Je 2,5 µl
Insgesamt	25 µl pro Reaktionsgefäß

Tab. 2 Verwendete Primer

Gene	Primer	Produktgröße (bp)	Quelle
<i>cpsA</i>	F 5'-GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC-3' R 5'-GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC-3'	160	(Pai et al., 2006)
<i>ermB</i>	F 5'-GAGTGAAAAGGTACTCAACCA AAT AA-3' R 5'-TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AA-3'	280	(Hilmi et al., 2013)
<i>licA</i>	F 5'-TGAACAACCTGGGTGGAATGAC-3' R 5'-CGATTCACACCATAGTCACCA-3'	750	Diese Studie
<i>licB</i>	F 5'-ATCGGTATGCAGGCCAATCT-3' R 5'-CCAGCAATGACGACAAGTGA-3'	602	Diese Studie

Das Primerdesign erfolgte mit NCBI und Primer 3 Release 2.3.6.

Für jeden Primer wurde ein Ansatz gemischt und in den Thermozykler gestellt, der mit folgendem Programm lief:

Tab. 3 Programm des Thermozyklers für die DreamTaq Polymerase

Zyklusphase	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Anzahl der Durchläufe
Initiale Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	30	30
Anlagerung	57	60	30
Elongation	72	60	30
Finale Elongation	72	600	1

2.2.3.2 Gelelektrophorese und Bandennachweis

Die Auftrennung des PCR-Produktes der Größe nach erfolgte durch die Gelelektrophorese. Hierzu wurde zunächst ein 1 % Agarosegel in TBE gegossen. 5 µl PCR-Produkt wurden zusammen mit 1 µl 6x DNA Ladefarbstoff (Thermo Fischer Scientific) in eine Tasche aufgebracht und zur Größenbestimmung mit 3 µl Marker (Thermo Scientific Fast Ruler Middle Range DNA Ladder) im Agarosegel bei 120 Volt für 30 min laufen gelassen. Zum Bandennachweis wurde das Agarosegel für 20 min in 0,01 % Ethidiumbromid getaucht und anschließend im UV-Licht (Wellenlänge: 312 nm) mit dem ImageMaster VDS von Pharmacia Biotech fotografiert.

2.2.4 Biochemie

2.2.4.1 Herstellung von bakteriellen Proteinlysaten und Proteinquantifikationen

Die Herstellung der bakteriellen Proteinlysate erfolgte aus 20 ml einer 12 h TSB-Flüssigkultur. Ein Bakterienpellet wurde durch Zentrifugation (4000 rpm für 10 min bei 4 °C) der Flüssigkultur gewonnen. Dieses wurde einmal mit PBS gewaschen und in 500 µl inkomplettem RIPA-Lysepuffer plus 2 µl Aprotinin (1 mg/ml), 2 µl Leupeptin (1 mg/ml) und 10 µl 200 mM Na₃VO₄ resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien zu 0,1 mm Glas Kügelchen (Precellys[®] Glas Kit) in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und 3x für 30 sec bei 3500 rpm homogenisiert. Zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien 20 min auf Eis gestellt und abzentrifugiert (15 min bei 13000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Lysaten erfolgte mit Hilfe des Pierce-Assays. In den ersten beiden Reihen einer 96-Loch Flachbodenplatte wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA und PBS mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml BSA in 20 µl Flüssigkeit durchgeführt. Die Proben wurden 1:4 mit PBS verdünnt (5 µl Probe + 15 µl PBS) und in die anderen Löcher gegeben. Zum Start der Reaktion wurde 180 µl Pierce Gemisch (Substanz A: Substanz B = 50:1) zu allen Löchern gegeben und die Platte wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration durch das Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm und durch Vergleich mit den beiden Standardreihen bestimmt.

2.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese werden die Proteine der Größe nach durch die angelegte Spannung aufgetrennt. Hierzu wurde zunächst das Gel gegossen. Die Glasplatten wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und das Gel eingefüllt. Das Separationsgel wurde mit Isopropanol bedeckt und bis zur Polymerisation gewartet (30-45 min). Isopropanol wurde abgegossen und das Sammelgel sowie der Kamm (1,5 mm Kammern) hinzugefügt. Das Sammelgel benötigte ca. 15 min zur Polymerisation.

Tab. 4 Zusammensetzung für ein SDS-Gel

Für 1 SDS-Gel	Sammelgel	Separationsgel
H ₂ O	1,44 ml	3,2 ml
Acrylamid	540 µl	4,8 ml
Puffer	2 ml (2x Sammelpuffer)	4 ml (3x Separationspuffer)
10 % Amoniumpersulfat (APS)	20 µl	40 µl
TEMED	4 µl	10 µl

Das SDS-Gel wurde in eine Laufkammer gesetzt und die Laufkammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Die erste Tasche des Gels wurde mit 5 µl Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoScientific) beladen. Die anderen Taschen wurden mit 40 µl Probe beladen, die aus 10 µg Bakterienproteinen, 8 µl 5x Lämmli Puffer und RIPA-Lysepuffer besteht. Das Gel wurde zunächst bei einer Spannung von 80 V laufen gelassen. Als die Proteine das Sammelgel verlassen haben, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Laufzeit betrug ca. 75 min.

2.2.4.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld übertragen. Hierfür wurden die in Blotting Puffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran und das SDS-Gel zwischen zwei ebenfalls in Blotting Puffer angefeuchtete Blotting Papiere gelegt und in einer halbtrockenen Blotting Kammer für 60 min bei 110 mA geblottet. Das Blocken von unspezifischen Antikörperbindungsstellen kann je nach Primärantikörper durch unterschiedliche Puffer erfolgen und dauert zwischen 4 h bei Raumtemperatur und bis zu 7 Tagen bei 4 °C auf dem Schüttler.

IVIG-Westernblot

Beim IVIG (intravenöse Immunglobuline)-Blot werden menschliche Blutantikörper als Primärantikörper auf die Membran gegeben. Hierbei wird nachgewiesen, ob menschliche Antikörper an die Pneumokokkenproteine binden. Kommt es zu einer Bindung, können diese mit dem Sekundärantikörper gegen IgG, IgM und IgA nachgewiesen werden. Das primäre Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte hierbei mit TSB-T und 5 % Milchpulver. Anschließend wurde IVIG 1:2000 mit TSB-T + 5 % Milchpulver

verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Dann wurde nicht gebundenes IVIG durch 3x 5-minütiges Waschen mit TSB-T abgewaschen und der Sekundärantikörper anti-Ig (IgG, IgM, IgA)-Peroxidase gekoppelt 1:10000 in TSB-T+ 5 % Milchpulver verdünnt für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler hinzugegeben. Es folgte ein fünfmaliges Waschen mit TSB-T für jeweils 5 min. Zur Auswertung wurden 650 µl Pierce™ ECL-Substrat (325 µl Substanz A+ 325 µl Substanz B) auf den Westernblot gegeben und die Banden wurden durch das MicroChemie 4.2 DNA Bio-Imaging System aufgenommen.

Phosphocholin-Westernblot

Durch einen anti-Phosphocholin Antikörper sollte überprüft werden, ob die Bakterienlysate Phosphocholin enthalten. Die Methode ist analog zu der des IVIG-Westernblots, sodass hier nur die Unterschiede erwähnt werden. Für das Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurde TSB-T+ 5 % BSA verwendet. Der Primärantikörper (anti-Phosphocholin) wurde 1:800 in TSB-T+ 5 % BSA verdünnt, auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper anti-Maus Immunglobulin G-Peroxidase gekoppelt wurde 1:10000 mit TSB-T + 5 % Milchpulver verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.4.4 ELISA

Mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) können Zytokin- und Immunglobulinkonzentrationen bestimmt werden. Die Zytokinkonzentration in den Überständen von stimulierten Monozyten wurde nach 24 h bestimmt und die Immunglobulinkonzentration in den PBMC-Überständen nach 13 d. Hierfür wurden fertige ELISA-Kits (siehe Tab. 5) verwendet und die ELISA nach den Herstellerangaben durchgeführt. Auf jeder Platte wurden vorgegebene Zytokin- oder Immunglobulinstandards als Duplikat mitbestimmt und von jeder Probe wurden Triplikate verwendet. Die Zytokin- und Immunglobulin-Konzentrationen wurden durch das Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm durch ELISA spectra Max und den Vergleich mit der Standardreihe bestimmt.

Tab. 5 Eigenschaften der unterschiedlichen humanen ELISA-Kits

ELISA-Kit	Nachweisgrenze	Verdünnung der Proben	Hersteller
hIgM	1000 ng/ml	1:2	Bethyl Laboratories, Inc.
hIgG	1000 ng/ml	Bis zu 1:4	Bethyl Laboratories, Inc.
hIgA	500 ng/ml	Bis zu 1:4	Bethyl Laboratories, Inc.
hIL-18	5000 pg/ml	1:2	eBioscience
hIL-8	200 pg/ml	Bis zu 1:10	BD OptEIA, BD Biosciences
hIL-10	500 pg/ml	Bis zu 1:20	BD OptEIA, BD Biosciences
hIL-1 β	1000 pg/ml	Bis zu 1:20	BD OptEIA, BD Biosciences
hTNF- α	500 pg/ml	Bis zu 1:20	BD OptEIA, BD Biosciences

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Bestimmung der Zellreinheit und Oberflächenmarkerexpression

Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche CD14 und können anhand von diesem z.B. durch das Automacs-Verfahren aus PBMCs isoliert werden. Um zu überprüfen, wie viele der isolierten Zellen CD14 positiv sind und damit die Reinheit der Isolation festzustellen, wurden die Monozyten mit einem anti-human CD14 FITC-Antikörper markiert. Hierzu wurden 50 μ l Monozyten in Automacspuffer mit 1 μ l anti-human CD14 FITC-Antikörper für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Monozyten 1x mit 100 μ l PBS gewaschen (6 min bei 1300 g), mit 100 μ l PBS + 2 % PFA fixiert und 100 μ l PBS direkt vor der Messung hinzugegeben. Die Messung erfolgte mit dem FACS Canto I (BD Bioscience) und ergab eine Reinheit >95 % aller gemessenen Zellen.

Außerdem wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Konzentration des Oberflächenmarkers CD36 auf den Monozyten bestimmt. Hierzu wurden die Monozyten analog zu der CD14-Bestimmung mit anti-human CD36-PE gefärbt und der Anteil von CD36 positiven Monozyten an allen gemessenen Monozyten wurde ebenfalls mit dem FACS Canto I (BD Bioscience) bestimmt.

2.2.5.2 Zytokin multiplex Analyse

Die Zytokin multiplex Analyse dient zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Zytokine (in dieser Arbeit: IL-8, IL-22, IL-1 β , TNF, IL-6, INF- α , IL-12p70 und IL-10) in einer Probe. Hierfür wurden 24 h Überstände von mit Pneumokokken stimulierten Monozyten verwendet, bei denen die Monozyten 30 min vor der Pneumokokkenstimulation mit IgG stimuliert wurden. Nach den Herstellerangaben (eBioscience) für das FlowCytomix™ Multiplex Kit Th1/Th2 11plex wurde folgendes Protokoll verwendet. Duplikate einer Probe wurden zu einer zusammengemischt. Außerdem wurde eine Standardreihe mit den gewünschten Zytokinen pipettiert. Zunächst wurden die Beads, die mit Antikörpern für die gewünschten Zytokine bedeckt sind, hinzugegeben. Anschließend wurde für jedes Zytokin spezifische biotinylierte Antikörper zu dem Zytokin-Bead-Mix gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Proben wurden mit dem Puffer (Assay Buffer im Kit enthalten) gewaschen (1300 rpm, 5 min), die mit Streptavidin markierte Antikörper gegen Biotin hinzugefügt und für 1 h im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde einmal mit dem Puffer gewaschen, Puffer hinzugefügt und am FACS Canto I (BD) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der im Kit enthaltenen Software Flow cytomix Pro 2.2.1 (affymetix, eBioscience).

2.2.6 Statistische Auswertung

Numerische Daten sind als Mittelwerte \pm Fehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt und werden als normalverteilt angesehen. Alle Daten wurden mit einem zweiseitigen, gepaarten Studenten t-Test durch Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5 analysiert. Werte von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) werden als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Genmutationsnachweis der *S. pneumoniae* D39 Mutanten

Das Fehlen der deletierten Genabschnitte der *S. pneumoniae* D39 Mutanten wurde durch die PCR nachgewiesen. Dementsprechend zeigt das Ergebnis der *cps*-PCR (Abb. 5a), dass die beiden Kapselmutanten nicht über den Kapsellokus verfügen. In D39 *cho⁻licA64*, D39 *chip^{T700}licB31* und D39 Δ *cps* Δ *lgt* wurde zudem das Zielgen durch das *ermB* Resistenzgen ersetzt (Abb. 5b). Des Weiteren fehlt D39 *chip^{T700}licB31* das *licB* Gen und D39 *cho⁻licA64* das *licA* Gen (Abb. 5c und d).

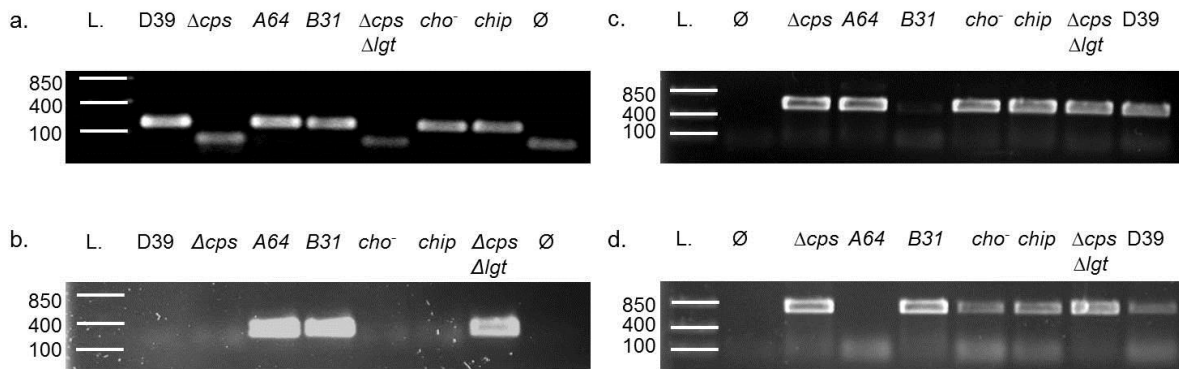


Abb. 5 PCRs zum Nachweis der *S. pneumoniae* D39 Mutationen **a.** *cps*-PCR, **b.** *ermB*-PCR, **c.** *LicB*-PCR und **d.** *LicA*-PCR; L.= Leiter, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho⁻licA64*, B31= D39 *chip^{T700}licB31*, *chip*= D39 *chip^{T700}*, Ø= Negativkontrolle, Größenangaben in Basenpaaren (bp)

3.2 Nachweis von Phosphocholin und dessen Auswirkung auf die Zellteilung

Durch den Verlust der *licB* bzw. *licA* Gene sollte D39 *chip^{T700}licB31* kein Cholin mehr importieren und D39 *cho⁻licA64* kein Cholin mehr phosphorylieren können (Eberhardt et al., 2009). Um dies zu überprüfen, wurden sowohl ein Western Blot als auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem anti-Phosphocholin-Antikörper gemacht (Abb. 6). Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bei D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* ist nur ein Hintergrundsignal wie bei der Negativkontrolle (D39 mit nur Sekundärantikörper) zu sehen. Dies weist darauf hin, dass bei diesen beiden Stämmen kein Phosphocholin in der Zellwand gebunden ist (Abb. 6a).

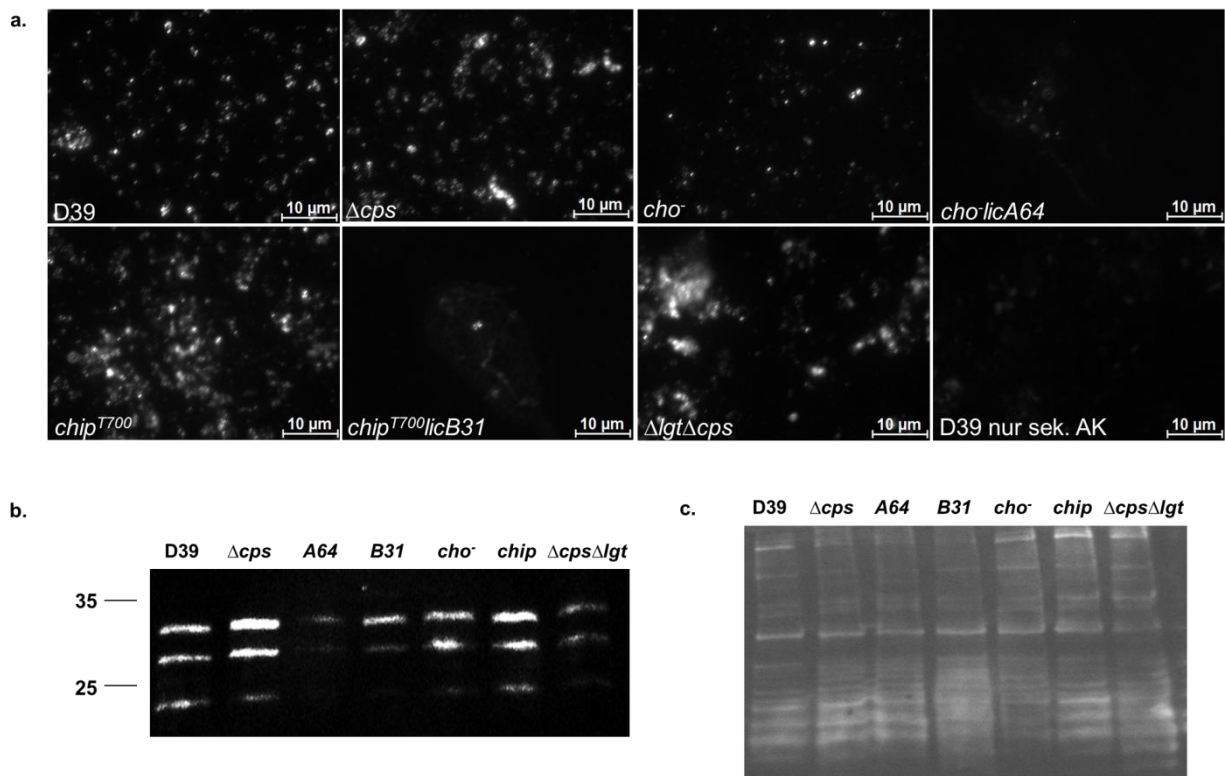
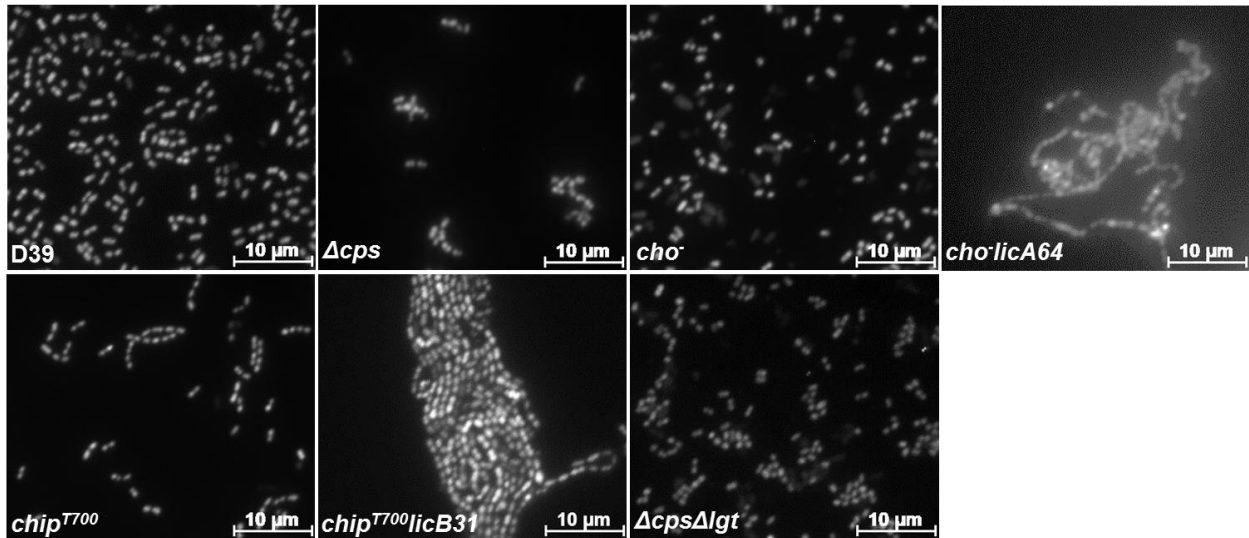


Abb. 6 Nachweis von Phosphocholin in *S. pneumoniae* D39 Mutanten. **a.** Fluoreszenzmikroskopie mit ganzen fixierten Bakterien. Der anti-Phosphocholin-Antikörper als Primärantikörper wird mit einem Cyanin-gekoppelten anti-Maus-IgG Antikörper (Sekundärantikörper) markiert. Als Negativkontrolle wurde *S. pneumoniae* D39 nur mit dem Sekundärantikörper markiert. Maßstabsbalken $\cong 10 \mu\text{m}$. **b.** Western Blot mit *S. pneumoniae* D39 Lysaten. Primärantikörper ist der anti-Phosphocholinantikörper und als Sekundärantikörper dient ein anti-Maus-IgG Antikörper. Im SDS- PAGE aufgetragen wurden $10 \mu\text{g}$ Proteinlysate/Bande. Größenangaben in kDa. **c.** Western Blot der gleichen Membran wie in b., um zu zeigen, dass bei allen Proben die gleiche Proteinkonzentration aufgetragen wurde (Primärantikörper: IVIG (gereinigtes polyklonales Spenderimmunglobulin), Sekundärantikörper: alle Immunglobuline). Sek.= sekundär, AK= Antikörper, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64 = D39 *cho-licA64*, B31= D39 *chip^{T700}licB31* und *chip*= D39 *chip^{T700}*

Beim SDS-PAGE und Westernblot wurden hingegen Proteinlysate verwendet. Hierbei ist auffällig, dass bei D39 *cho-licA64* deutlich weniger Phosphocholin detektiert werden konnte als bei den anderen Mutanten (Abb. 6b). Die Lysate von D39 *chip^{T700}licB31* scheinen ebenfalls weniger Phosphocholin zu beinhalten, da die unteren beiden Banden schlechter zu detektieren sind (Abb. 6b). Bei dem mit IVIG (intravenöses menschliches Immunglobulin) inkubierten Westernblot (Abb. 6c) handelt es sich um die gleiche PVDF-Membran wie in Abb. 6b. Sie zeigt, dass in allen Banden die gleichen Proteinkonzentrationen geladen wurden, da in allen Banden vergleichbare Bandenintensitäten durch Bindung von

Immunglobulinen gefunden wurden. Da die Mutanten D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* keine oder eine deutlich geringere Phosphocholinmenge aufweisen, könnte die oberflächliche Bindung der CBP beeinträchtigt sein.

a. TSB



b. TSB + 2 % Cholinchlorid

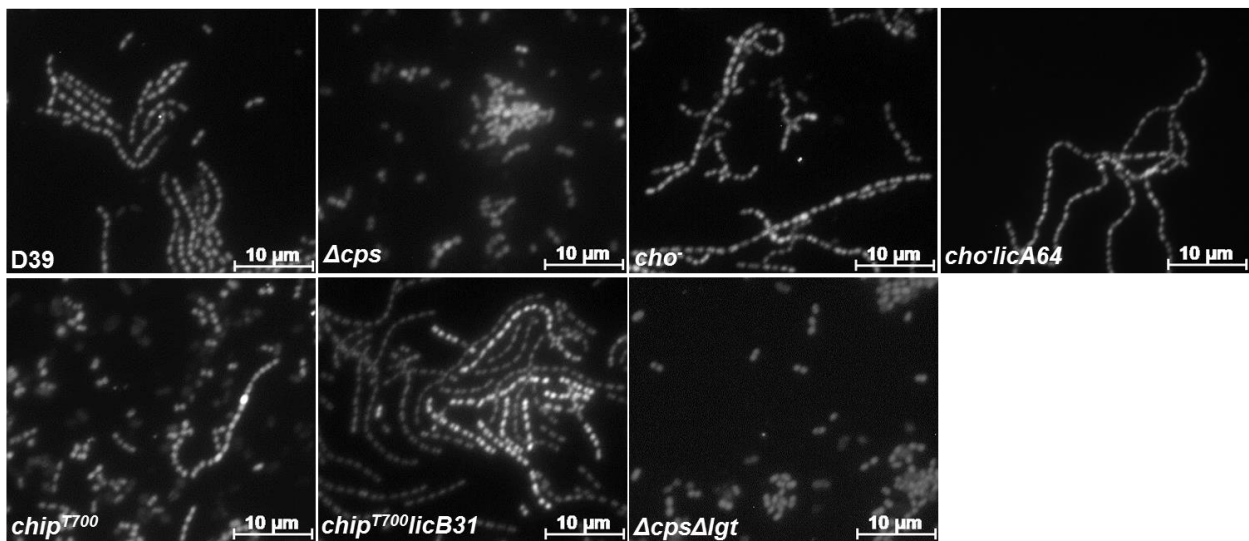


Abb. 7 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung unterschiedlicher *S. pneumoniae* D39 Mutanten. Pneumokokken sind mit Thiazolorange gefärbt. **a.** 8 h TSB-Flüssigkultur. **b.** 8 h TSB + 2 % Cholinchlorid-Flüssigkultur. Cholinchlorid inhibiert durch das Binden der CBP die Autolyse der Pneumokokken. Diese wachsen somit in längeren Ketten. TSB= Tryptic-Soja-Bouillon, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64 = D39 *cho⁻licA64*, B31= D39 *chip^{T700}licB31* und *chip*= D39 *chip^{T700}*, Maßstabsbalken $\cong 10 \mu m$

Das Wachstumsverhalten wurde anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit Thiazolorange angefärbten Pneumokokkenstämmen überprüft (Abb. 7). Thiazolorange, als

membrangängiger DNA- und RNA- Farbstoff, färbt die Nukleinsäuren und somit alle Bakterien (Grimberg et al., 2008). Wie durch das fehlende Phosphocholin zu erwarten war, wachsen D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* in langen Ketten und die anderen Mutanten sowie der Wildtyp als Diplokokken (Abb. 7a). Die Zugabe von 2 % Cholinchlorid ins TSB-Flüssigmedium soll die Bindung der CBP erhöhen (Terrasse et al., 2015). Dies hat zur Folge, dass alle Pneumokokken in langen Ketten wachsen sollten. Besonders deutlich sieht man dieses Wachstumsverhalten am D39 Wildtyp (Abb. 7b). *S. pneumoniae* D39 Δ *cps* und D39 Δ *cps* Δ *lgt* zeigen das Verhalten hingegen nicht. Auch D39 *chip^{T700}* zeigt dieses Wachstumsmuster nicht durchgängig (Abb. 7b).

Falls keine anderen Angaben im Text gemacht werden, wuchsen die Pneumokokken für die folgenden immunstimulatorischen Experimente auf Columbia-Blutagar. Von der Morphologie verhalten sich die Bakterien, die auf Columbia-Blutagar gewachsen sind, genauso wie die Bakterien, die in der TSB-Flüssigkultur gewachsen sind. Eine Ausnahme bildet D39 *cho⁻licA64*, der auf Columbia-Blutagar nur in kurzen Ketten wächst.

3.3 Monozytäre Zytokinproduktion auf Pneumokokkenstimulation

Die zur Auswertung der immunstimulatorischen Versuche geeigneten Zytokine wurden durch das Messen der Zytokine in den Überständen ausgewählt. Dafür wurde das FlowCytomix Nachweissystem von eBioscience verwendet. Hierbei zeigte sich eine reduzierte Produktion an IL-12p40, IL-22, IFN- α und IL-18 als Reaktion der Monozyten auf Pneumokokkenstimulation. IL-18 wurde mit Hilfe eines ELISA Sets ausgewertet. Die IL-8 Produktion der Monozyten war bei allen Mutanten gleich hoch (Daten nicht dargestellt). Größere und unterschiedliche Mengen an IL-6 (Daten nicht dargestellt), IL-10, TNF und IL-1 β wurden von den Monozyten auf Pneumokokkenstimulation hin gebildet (Abb. 8). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zur Auswertung der weiteren Experimente IL-1 β , TNF und IL-10 ELISA durchgeführt.

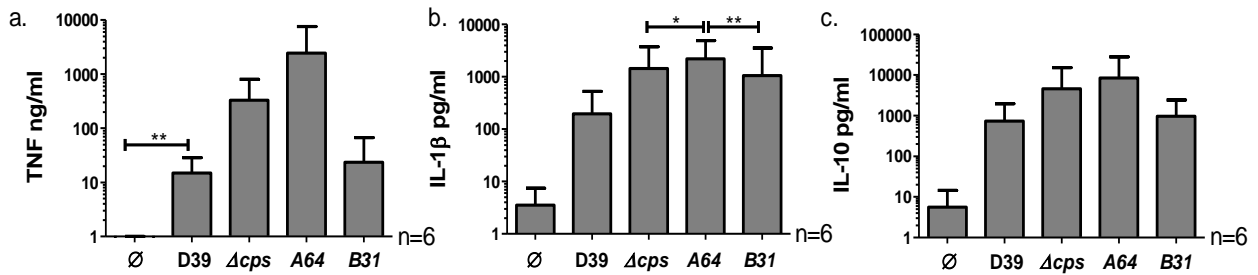


Abb. 8 FlowCytomix-Auswertung der im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Zytokine. Die Zytokinkonzentration wurde in Überständen von mit IgG und Pneumokokken kostimulierten Monozyten bestimmt. **a.** TNF-Konzentration, **b.** IL-1 β -Konzentration, **c.** IL-10-Konzentration. Ø= Negativkontrolle, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho*⁻*licA64*, B31= D39 *chip*^{T700}*licB31*, Anzahl der Spender (n)= 6, zweiseitiger gepaarter T-Test: * <0,05 u. ** <0,01, Fehlerbalken = SEM

Es ist bekannt, dass die Kapsel die Pneumokokken vor der Phagozytose schützt und somit eine Immunantwort unterdrückt (Hyams et al., 2010). Fehlt den Pneumokokken, wie bei *S. pneumoniae* D39 Δ *cps*, durch eine Mutation die Kapsel, führt dies zu einer gesteigerten Zytokinantwort der Monozyten im Vergleich zum *S. pneumoniae* D39 Wildtyp (Abb. 9).

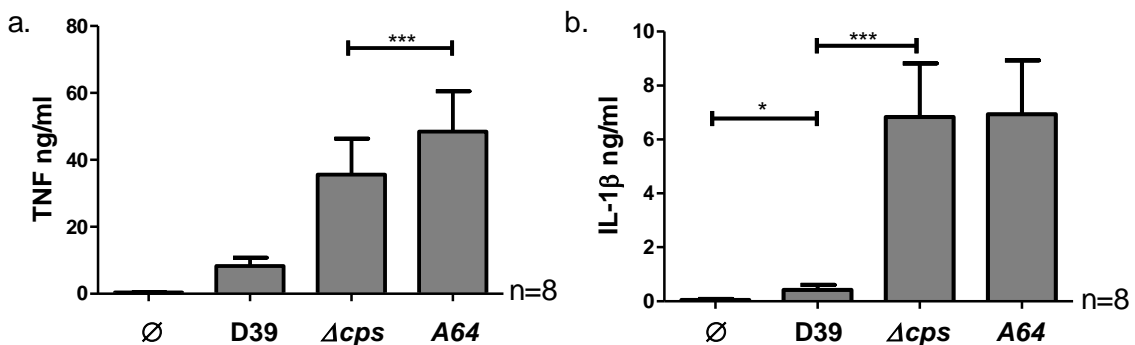


Abb. 9 CD14 positiv selektionierte Monozyten aus PBMCs stimuliert mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten. Nach 24 h Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. **a.** TNF-ELISA-Ergebnisse. **b.** IL-1 β -ELISA-Ergebnisse, Ø= Negativkontrolle, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho*⁻*licA64*, Anzahl der Spender (n)= 8, von jedem Spender wurden Triplikate erstellt, zweiseitiger gepaarter T-Test: * <0,05 u. *** <0,001, Fehlerbalken = SEM

Für die Arbeit stellt sich die zentrale Frage inwieweit CBP die Immunantwort gegen die Pneumokokken beeinflussen. Hierfür wurde die *S. pneumoniae* D39 *cho*⁻*licA64* Mutante verwendet. Durch das Fehlen des Phosphocholins in D39 *cho*⁻*licA64* können keine CBP mehr binden (Abb. 6). Abbildung 9 zeigt, dass das Fehlen der CBP zu einer stärkeren Zytokinantwort der Monozyten im Vergleich zum Wildtyp führt. D39 *cho*⁻*licA64* induziert

sogar eine signifikant höhere TNF-Produktion der Monozyten gegenüber D39 Δcps (Abb. 9a). Die IL-1 β Produktion ist bei beiden Mutanten annähernd gleich (Abb. 9b).

3.4 Ergebnisse der PBMC Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten

Um die Wirkung der CBP in einem weiteren Zellsystem zu untersuchen, wurden PBMCs mit den oben beschriebenen *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und anschließend die Immunglobuline im Überstand nach 13 Tagen quantifiziert. Die Bestimmung der Immunglobulinkonzentration erlaubt einen Rückschluss auf die B-Zell-Aktivierung und Differenzierung in einem komplexen Zellsystem.

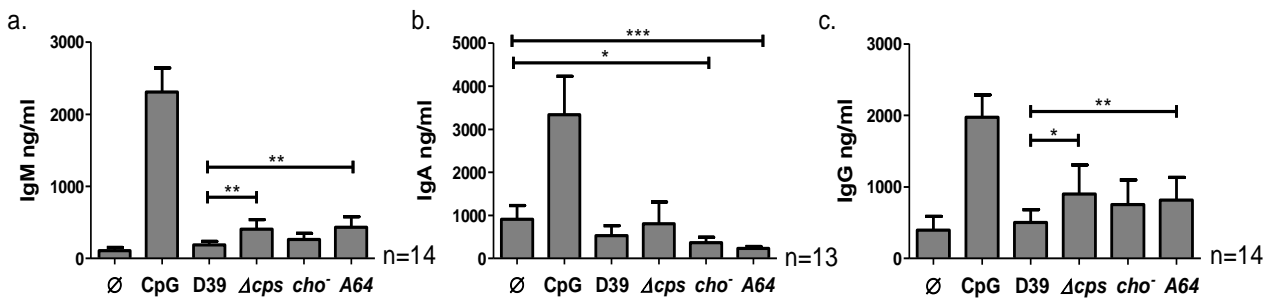


Abb. 10 PBMCs stimuliert mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten. Nach 13 d Bestimmung der Immunglobuline im Überstand. Der TLR9-Ligand CpG2006 wurde als Positivkontrolle verwendet. **a.** IgM-ELISA, **b.** IgA-ELISA, **c.** IgG-ELISA; Ø= Negativkontrolle, CpG= CpG2006, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho⁻licA64*, Anzahl der Spender (n)= 14 oder 13, von jedem Spender wurden Triplikate erstellt, zweiseitiger gepaarter T-Test: * <0,05, ** <0,01 und *** < 0,001, Fehlerbalken = SEM

Die IgM-Produktion der B-Zellen zeigt das gleiche Muster wie die Zytokinproduktion der Monozyten als Reaktion auf die Pneumokokkenstimulation. D39 Δcps und D39 *cho⁻licA64* führen zu einer stärkeren Immunantwort als der Wildtyp. Die Vorläufermutation von D39 *cho⁻licA64*, *cho⁻*, führt nur zu einer gering gesteigerten Immunantwort im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 10a). Die vermehrte immunstimulatorische Wirkung von D39 *cho⁻licA64* scheint folglich an dem fehlenden P-Cholin (Abb. 10a) und an dem fehlenden Binden der CBP zu liegen. IgM wird von naiven B-Zellen und von B-Gedächtniszellen als Antwort auf die Exposition gegenüber Pneumokokkenzellen gebildet (Kugelberg, 2015). Als Sekundärantwort der B-Zellen wird IgG nach dem Klassenwechsel gebildet (Vazquez et al., 2015).

Um zu überprüfen, ob es auch zu einer vermehrten IgA-Produktion der B-Zellen im peripheren Blut kommt, wurde in den Überständen einer 13-tägigen PBMC-Stimulation mit Pneumokokken die IgA Konzentration bestimmt (Abb. 10b). Hierbei induzieren die Pneumokokkenmutanten eine geringe Immunantwort. D39 *cho*⁻ und D39 *cho*⁻*licA64* induzieren eine signifikant geringere Immunantwort im Vergleich zu der unstimulierten Negativkontrolle und scheinen nicht an der IgA-Produktion beteiligt zu sein.

Der IgG-ELISA zeigt, dass alle Mutanten eine erhöhte IgG-Produktion im Vergleich zum Wildtyp induzieren (Abb. 10c). D39 Δ *cps* und D39 *cho*⁻*licA64* führen im Gegensatz zu D39 *cho*⁻ zu einer signifikant höheren IgG-Produktion (Abb. 10c).

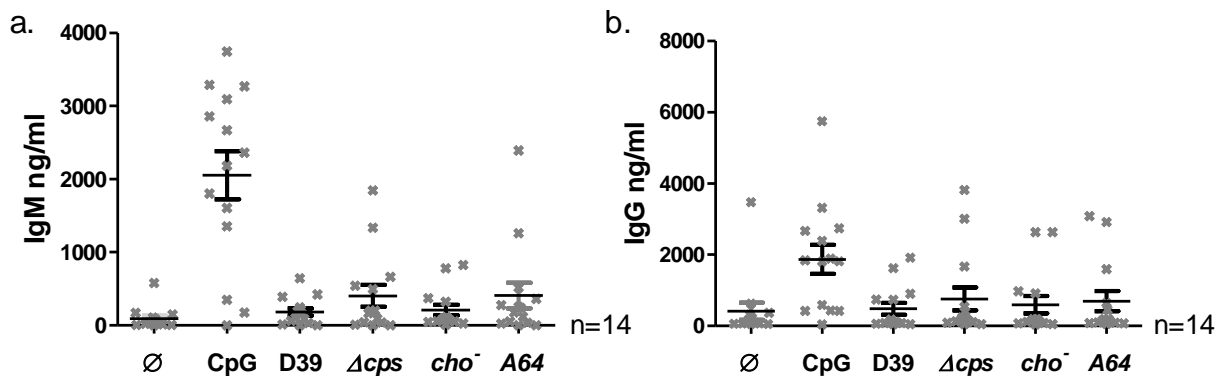


Abb. 11 PBMCs stimuliert mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten. Alternative Darstellung auf Grundlage der gleichen Daten wie in Abb. 10, zur Unterscheidung der Spender, die auf Pneumokokken reagieren und die, die keine Reaktion zeigen. CpG2006 als TLR9-Ligand wurde zur Positivkontrolle verwendet. **a.** IgM-ELISA, **b.** IgG-ELISA, Ø= Negativkontrolle, CpG= CpG2006, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho*⁻*licA64*, Anzahl der Spender (n)= 14, von jedem Spender wurden Triplikate erstellt, Fehlerbalken = SEM

Betrachtet man bei dem IgM- und IgG-ELISA die individuellen Spender, so fällt auf, dass die gleichen Spender auf die Pneumokokken reagieren. Bei der IgG-Produktion sind dieses 5 von 14 Spendern und bei der IgM-Produktion 6 von 14 Spendern (Abb. 11). Dieses lässt darauf schließen, dass die Spender, deren Zellen gegenüber Pneumokokkenzellen reaktiv waren, möglicherweise bereits Kontakt zu den Pneumokokken oder einem Impfstoff hatten und dadurch Gedächtniszellen ausbilden konnten.

3.5 Unterschiede zwischen den beiden Cholinmutanten D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31*

Anhand einer weiteren Cholinmutante D39 *chip^{T700}licB31* wurde untersucht, ob die verstärkte Immunogenität von D39 *cho⁻licA64* allein an dem Fehlen von P-Cholin und somit den CBP liegt. D39 *chip^{T700}licB31* fehlt die Fähigkeit, Cholin zu inkorporieren. Daraus resultiert eine geringere Menge an P-Cholin (Abb. 6).

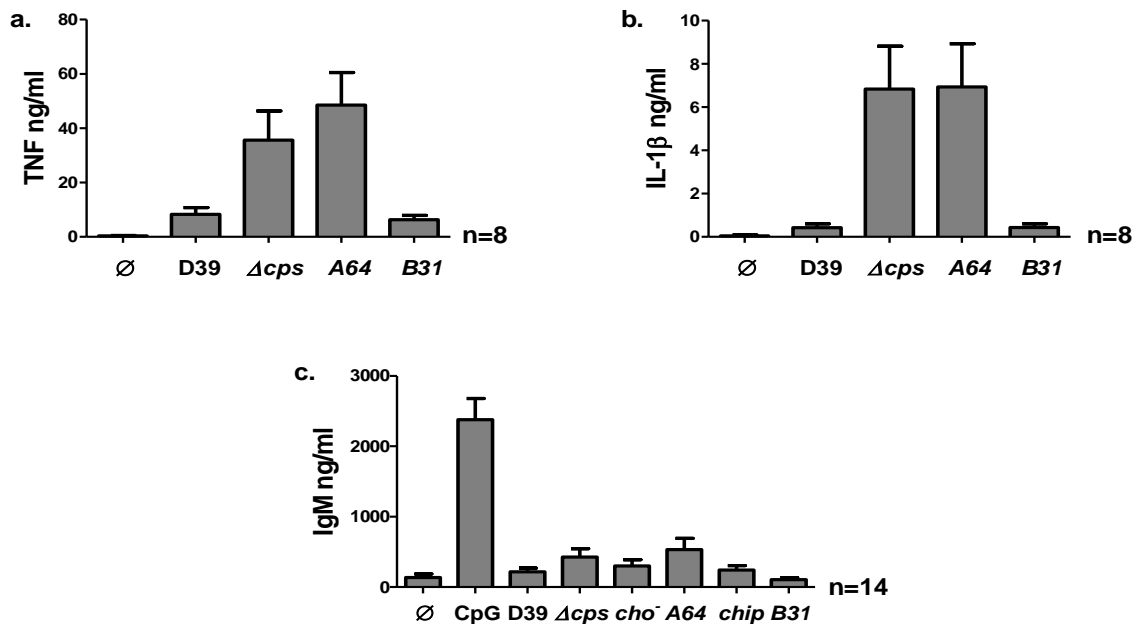


Abb. 12 Unterschiede in der Immunantwort auf D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31*. **a.** und **b.** Monozyten mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und Zytokinkonzentration im Überstand durch ELISA bestimmt. **a.** TNF-ELISA, **b.** IL-1 β -ELISA. **c.** PMBCs mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und IgM im Überstand gemessen. Als Positivkontrolle wurde der TLR9-Ligand CpG2006 verwendet. Ø= Negativkontrolle, CpG= CpG2006, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho⁻licA64*, *chip*= D39 *chip^{T700}*, B31= D39 *chip^{T700}licB31*, Anzahl der Spender n= 8 oder 14, von jedem Spender wurden Triplikate erstellt, Fehlerbalken = SEM

Bei den immunstimulatorischen Experimenten (Abb. 12) zeigte sich, dass D39 *chip^{T700}licB31* eine deutlich geringere immunstimulatorische Wirkung hat als D39 *cho⁻licA64* und D39 Δcps . D39 *chip^{T700}licB31* induziert sogar eine geringere IgM-Produktion als seine Vorläufermutation D39 *chip^{T700}*. Aufgrund der Mutationen in D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* sollten die beiden Mutanten das gleiche immunstimulatorische Potential aufweisen. Aus Abb. 12 ist zu entnehmen, dass sich die beiden Mutanten erheblich in ihrem

immunstimulatorischen Verhalten unterscheiden. D39 *cho⁻licA64* hat im Vergleich zu D39 Δ *cps* eine ähnliche (Abb. 12b) bis stärkere (Abb. 12a) immunstimulatorische Wirkung. Beim Abnehmen der Kolonien von Columbia-Blutagar wirkt D39 *chip^{T700}licB31* deutlich schleimiger als D39 *cho⁻licA64* und wächst in TSB-Flüssigkultur von allen Mutanten am besten (persönliche Beobachtungen). Aus diesen beiden Beobachtungen lässt sich vermuten, dass D39 *cho⁻licA64* im Gegensatz zu D39 *chip^{T700}licB31* keine Kapsel hat. Dieses könnte auch das bessere immunstimulatorische Potential von D39 *cho⁻licA64* erklären.

3.6 Kapselnachweis der *S. pneumoniae* D39 Mutanten

Für den Kapselnachweis wurde zunächst ein Agglutinationstest durchgeführt. Ist eine Kapsel vorhanden, so verklumpen die Bakterien mit dem Antiserum und flocken aus. Ist hingegen keine Kapsel vorhanden, bleibt die Flüssigkeit milchig.

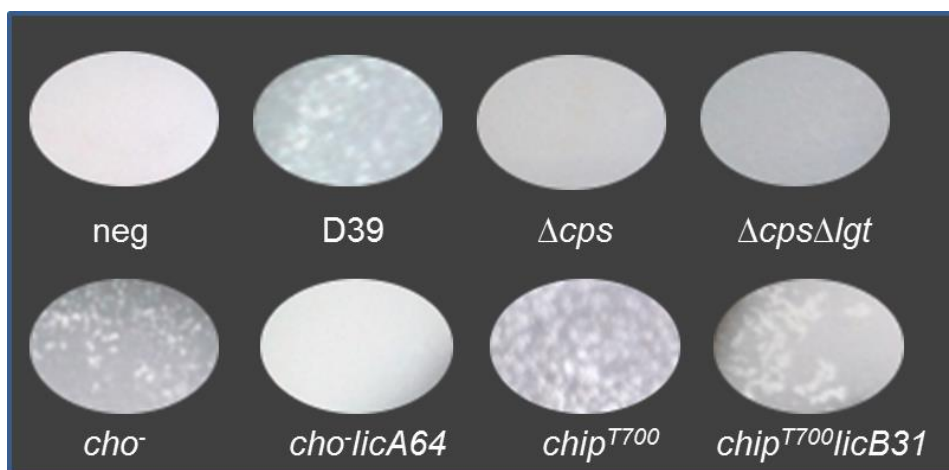


Abb. 13 Kapselagglutination der *S. pneumoniae* D39 Mutanten mit dem Slidex Pneumokit (bioMérieux). Wenn eine Kapsel vorhanden ist, kommt es zur Bildung von Agglutinaten, und wenn keine Kapsel vorhanden ist, bleibt die Flüssigkeit milchig wie bei der Negativkontrolle (neg). Gleiche Resultate bei zweimaliger Wiederholung. Pneumokokken wurden auf Columbia-Blutagar kultiviert.

Im Agglutinationstest (Abb. 13) zeigen alle Bakterien, dass nach der PCR auf Kapselgene (Abb. 5a) erwartete Verhalten außer D39 *cho⁻licA64*. D39 *cho⁻licA64* verfügt laut PCR (Abb. 5a) über Kapselgene. Die fehlende Agglutination zeigt aber, dass sich keine Kapsel auf der Oberfläche befindet (Abb. 13).

Zur weiteren Bestätigung dieser Beobachtung wurde die Kapsel durch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie dargestellt. Hierfür wurden die Pneumokokken in TSB-Flüssigkultur kultiviert. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung erfolgt mit dem Typ 2 Antiserum vom States and Serum Institut (ssi). So konnte auch nachgewiesen werden, dass es sich bei *S. pneumoniae* D39 um Pneumokokken mit dem Kapselserotyp 2 handelt. Durch Verwendung von *S. pneumoniae* TIGR4 mit dem Kapselserotyp 4 konnte gezeigt werden, dass das Typ 2 Antiserum auch nur an Pneumokokken mit dem Kapselserotyp 2 bindet (Abb. 14a) (Boersma et al., 2015). Zur Färbung der Kapsel im Elektronenmikroskop wurde Ruthenium Rot verwendet (Hammerschmidt et al., 2005). Beide Experimente bestätigen die Vermutung, dass D39 *cho⁻licA64* keine Kapsel zu exprimieren scheint. D39 *chip^{T700}licB31* weist in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine recht dicke Kapsel auf (Abb. 14b). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass D39 *chip^{T700}licB31* schleimiger ist als die anderen Mutanten.

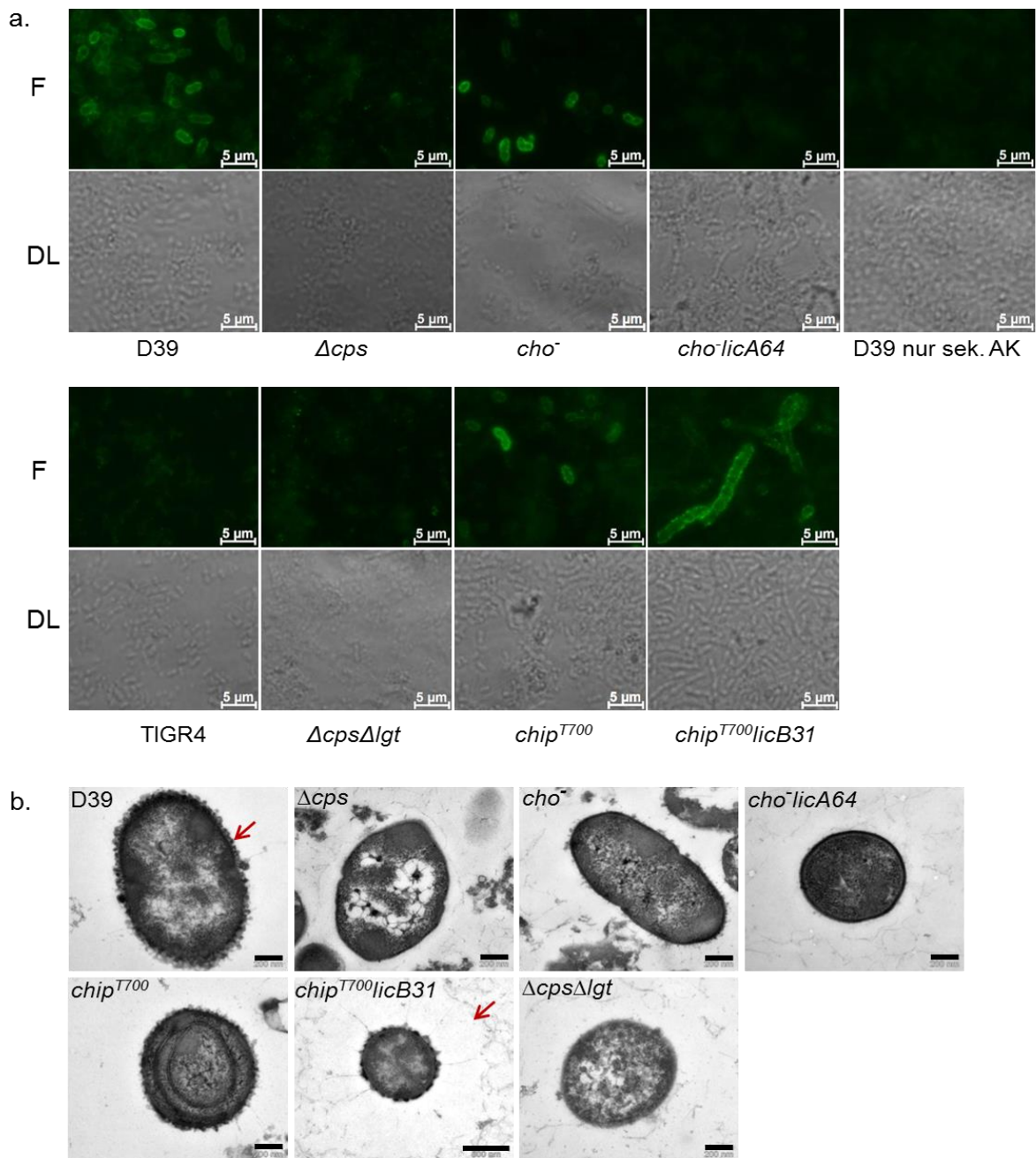


Abb. 14 Kapseldarstellung der *S. pneumoniae* D39 Mutanten **a.** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Kapsel von *S. pneumoniae* D39 Mutanten durch das Typ 2 Antiserum (ssi) und einem FITC-markierten sekundären Antikörper (sek. AK) gegen Hasen-IgM und -IgG. Die erste Reihe stellt die fluoreszenzmarkierten Bilder (F= Fluoreszenz) und die zweite Reihe die Durchlichtbilder (DL= Durchlicht) dar, Maßstabsbalken $\cong 5 \mu m$ **b.** Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der *S. pneumoniae* D39 Mutanten. Die Kapsel wurde zur besseren Darstellung mit Ruthenium Rot gefärbt. Roter Pfeil bei D39 markiert die Kapselreste, die auch in cho^- und $chip^{T700}$ zu sehen sind. Bei $chip^{T700}licB31$ markiert der rote Pfeil die vermutete Kapsel. Zu sehen sind hier Ausläufer, die in die Kapsel hinein ragen. Maßstabsbalken $\cong 200 nm$ außer bei $chip^{T700}licB31$, da $500 nm$. D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp

Für den besseren Überblick über die einzelnen Mutanten und zum besseren Verständnis ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften wurden diese Mutanten in Abb. 15 schematisch dargestellt.

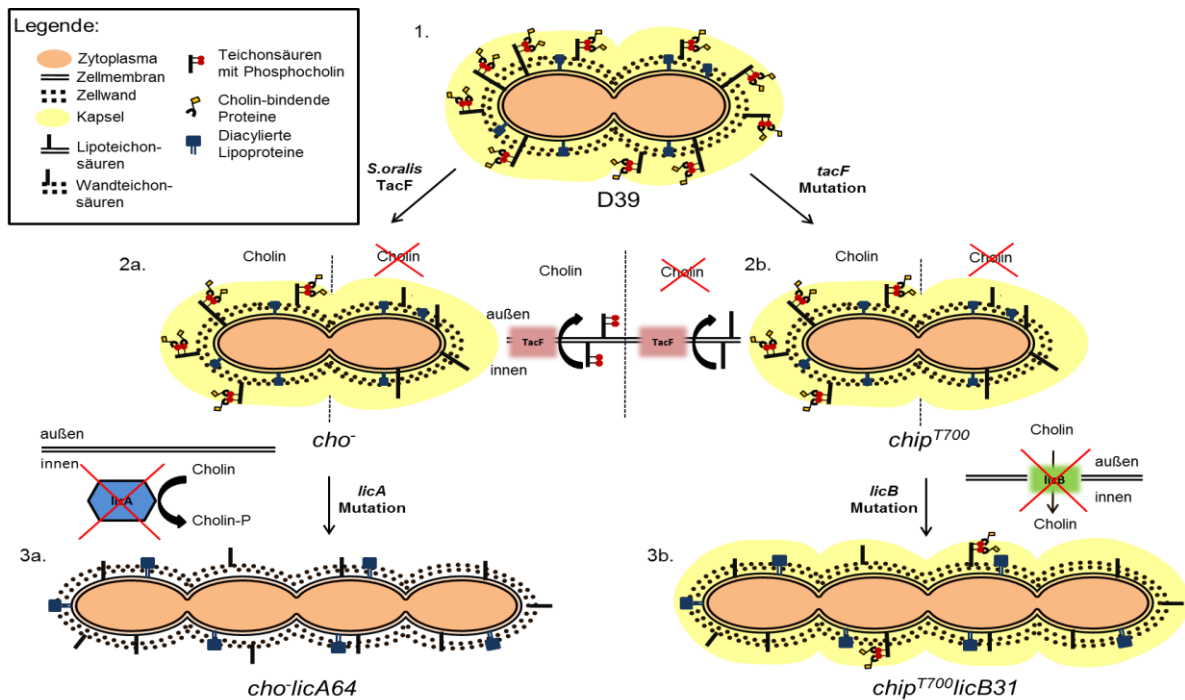


Abb. 15 Die Cholinmutanten von *S. pneumoniae* D39. Der *S. pneumoniae* D39 Wildtyp (D39) verfügt über eine Kapsel, Phosphocholin und daran bindende Cholin-bindende Proteine (CBP) sowie Lipoproteine (1). Durch eine Veränderung der Flippase TacF kann diese im Gegensatz zum *S. pneumoniae* D39 Wildtyp Teichonsäuren mit und ohne Phosphocholin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran befördern (2). Der Wildtyp kann nur Teichonsäuren mit Phosphocholin auf die Außenseite bringen. D39 *cho⁻* ist durch eine rekombinante Kreuzung mit *S. oralis* entstanden (2a) und D39 *chip^{T700}* hat eine Punktmutation im *tacF*-Gen (2b). Ist Cholin im Wachstumsmedium vorhanden, verwenden die Mutanten dieses Cholin und dekorieren die Teichonsäuren mit Phosphocholin. Sie können aber auch im cholinfreien Medium wachsen (2). Die beiden Doppelmutanten D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* beruhen auf den Mutanten D39 *cho⁻* und D39 *chip^{T700}* und können somit cholinunabhängig wachsen (3). Durch die Mutation im *licA*-Gen von D39 *cho⁻licA64* kann kein Cholin phosphoryliert werden. Die Teichonsäuren der Zellwand sind ohne Phosphocholin und können CBP nicht mehr binden (3a). Die Experimente haben gezeigt, dass D39 *cho⁻licA64* keine Kapsel zu haben scheint (Abb. 13 und 14). Bei D39 *chip^{T700}licB31* führt eine Mutation im *licB*-Gen dazu, dass kein Cholin über den LicB-Transporter inkorporiert werden kann. Somit sollte D39 *chip^{T700}licB31* auch kein Phosphocholin an den Teichonsäuren der Zellwand aufweisen (3b). Im Westernblot konnte hingegen Phosphocholin detektiert werden (Abb. 6b). Durch das Fehlen der autolytischen CBP wachsen D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* in langen Ketten (Abb. 7a). Die Abbildungen des Cholinmetabolismus sind teilweise in Anlehnung an Eberhardt et al., 2009 erstellt worden. Cholin-P = Phosphocholin, D39= *S. pneumoniae* D39

3.7 Immunstimulatorisches Verhalten der in Flüssigkultur mit Zusatz von Cholinchlorid gewachsenen *S. pneumoniae* D39 Mutanten

Cholinchlorid bindet die CBP der Pneumokokken, sodass alle Pneumokokkenmutanten keine CBP mehr haben sollten. Aus Abb. 7b ist zu entnehmen, dass bei Zugabe von Cholinchlorid der Wildtyp D39 und D39 *cho*⁻ in langen Ketten wachsen. D39 Δ *cps* und D39 Δ *cps* Δ *lgt* verändern ihr Wachstumsverhalten hingegen nicht und wachsen weiter als Diplokokken. D39 *chip*^{T700} wächst größtenteils weiter als Diplokokken, bildet aber auch einige wenige längere Ketten (Abb. 7b).

Das Fehlen der CBP unterscheidet D39 *cho*⁻ von D39 *cho*⁻*licA64* und D39 *chip*^{T700} von D39 *chip*^{T700}*licB31*, sodass diese nach Wachstum in 2 % Cholinchlorid jeweils die gleichen immunmodulatorischen Eigenschaften aufweisen sollten.

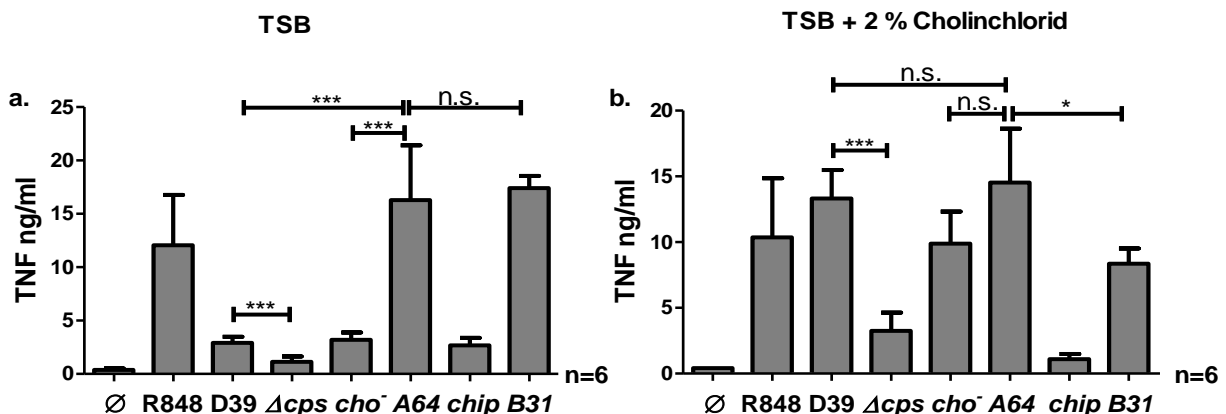


Abb. 16 Einfluss des Pneumokokkenwachstums in Cholinchlorid auf deren immunstimulatorisches Verhalten. Monozyten wurden mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und die TNF-Konzentration im 24 h-Überstand mittels ELISA gemessen. **a.** Pneumokokken über Nacht in TSB-Flüssigkultur gewachsen. **b.** Pneumokokken über Nacht in TSB-Flüssigkultur + 2 % Cholinchlorid gewachsen. Als Positivkontrolle wurde der TLR7/8-Ligand R848 verwendet. Ø= Negativkontrolle, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho*⁻*licA64*, *chip*= D39 *chip*^{T700}, B31= D39 *chip*^{T700}*licB31*, n.s. = nicht signifikant, n= Anzahl der Spender, von jedem Spender wurden Triplikate gemacht, Fehlerbalken = SEM, zweiseitiger gepaarter T-Test: * <0,05 und *** <0,001

Zur Überprüfung dieses Wachstumsverhaltens, wurden Monozyten mit Pneumokokkenzellen stimuliert, die zuvor in TSB + 2 % Cholinchlorid als Flüssigkultur und zur Kontrolle in TSB-Flüssigkultur gewachsen sind. Hierbei ergab sich, dass die Mutanten,

die in langen Ketten wachsen, bessere immunstimulatorische Eigenschaften haben als die Pneumokokken, die als Diplokokken wachsen. Im Vergleich zu TSB wachsen bei Zugabe von 2 % Cholinchlorid nun neben D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* auch D39 Wildtyp und D39 *cho⁻* in langen Ketten (Abb. 7b). Dabei fällt auf, dass sich das immunstimulatorische Potential dieser Mutanten gesteigert hat (Abb. 16). Durch die Zugabe von 2 % Cholinchlorid zu dem Wachstumsmedium ist der signifikante Unterschied zwischen D39 Wildtyp und D39 *cho⁻licA64* sowie zwischen D39 *cho⁻* und D39 *cho⁻licA64* verschwunden (Abb. 16b). Das langkettige Wachstum von D39 Wildtyp und D39 *cho⁻* verstärkt deren immunstimulatorisches Potential und ist nur unsignifikant geringer als von D39 *cho⁻licA64* (Abb. 16b). D39 *chip^{T700}licB31* wächst immer noch in Ketten, aber in kürzeren im Vergleich zu den in TSB gewachsenen (Abb. 7b). Dies würde auch sein vermindertes immunstimulatorisches Verhalten erklären (Abb. 16b).

3.8 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Immunantwort gegen *S. pneumoniae* D39

Auffällig ist, dass D39 *chip^{T700}licB31* beim Wachstum in TSB-Flüssigkultur fast das gleiche immunstimulatorische Potential wie D39 *cho⁻licA64* aufweist, hingegen beim Wachstum auf Columbia-Blutagar (Platte) ein deutlich schwächeres (Abb. 17 a und b). Zur Überprüfung dieser Tatsache wurden zusätzlich, neben Monozyten, auch PBMCs mit Pneumokokken stimuliert. Das immunstimulatorische Verhalten der beiden auf Columbia-Blutagar gewachsenen Doppelmutanten unterscheidet sich zwischen PBMCs und Monozyten nicht (Abb. 17 a und c). Beim Wachstum in TSB-Flüssigkultur sind keine signifikanten immunstimulatorischen Unterschiede auf Monozyten zwischen D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* zu erkennen (Abb. 17b). Im Gegensatz dazu weist D39 *chip^{T700}licB31* ein stärkeres immunstimulatorisches Potential bei PBMCs als D39 *cho⁻licA64* auf (Abb. 17d).

Ein Unterschied zwischen den beiden Wachstumsbedingungen ist u.a. die Wachstumszeit der Bakterien. In TSB-Flüssigkultur betrug die Wachstumszeit zwischen 8 bis 12 Stunden und auf der Platte 48 Stunden. Das verlängerte Wachstum könnte einen unterschiedlichen Anteil lebendiger Bakterien bedingen.

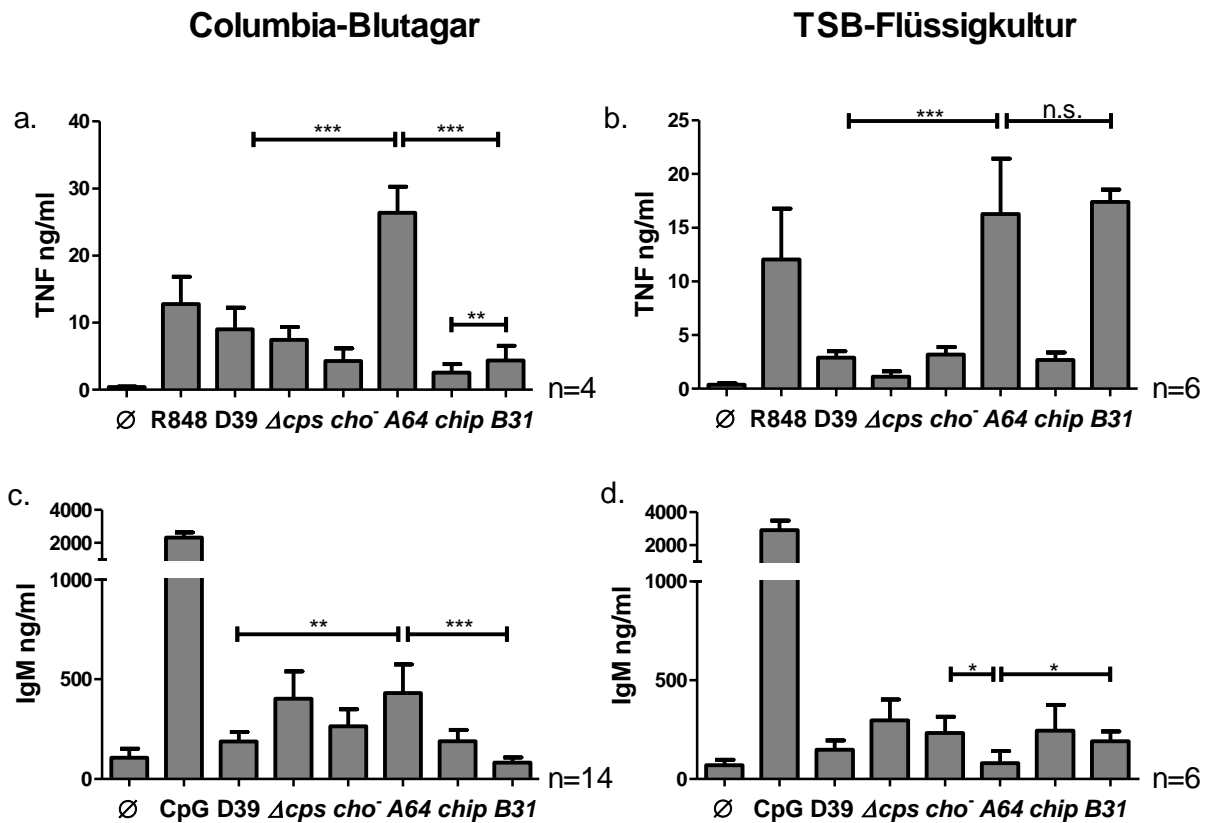


Abb. 17 Einfluss der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf das immunstimulatorische Verhalten der Pneumokokkenmutanten. **a.** und **b.** Monozyten mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und im Überstand die TNF-Konzentration durch ELISA bestimmt. **c.** und **d.** PBMCs mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und im Überstand die IgM-Konzentration durch ELISA bestimmt. **a.** und **c.** Bakterien auf Columbia-Blutagar für 48 h gewachsen. **b.** und **d.** Bakterien in TSB-Flüssigkultur für 12 h gewachsen. Als Positivkontrolle wurde der TLR7/8-Ligand R848 oder der TLR9-Ligand CpG2006 verwendet. Ø= Negativkontrolle, CpG= CpG2006, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 $cho^-licA64$, chip= D39 $chip^{T700}$, B31= D39 $chip^{T700}licB31$, n.s. = nicht signifikant, n= Anzahl der Spender, von jedem Spender wurden Triplikate gemacht, Fehlerbalken = SEM, zweiseitiger gepaarter T-Test: * <0,05, ** <0,01, *** <0,001

Anhand von Wachstumskurven wurde das Wachstumsverhalten der Pneumokokken in TSB-Flüssigkultur verfolgt. Dabei zeigten alle Pneumokokkenmutanten ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichten nach 6 bis 8 Stunden die stationäre Phase (Abb. 18). Lediglich im exponentiellen Wachstumsverhalten können die Pneumokokkenmutanten in die schnell wachsenden (D39 cho^- , D39 $cho^-licA64$ und D39 $chip^{T700}licB31$) und die langsamer wachsenden (D39 $chip^{T700}$, D39 Δcps und D39 $\Delta cps\Delta lgt$) eingeteilt werden. Letztere zeigten zudem häufiger nach wiederholten Passagen kein Wachstum (persönliche

Beobachtungen). Bei Stimulation der Immunzellen befanden sich aber alle Bakterien in der stationären Phase und es wurde jeweils mit der gleichen MOI stimuliert.

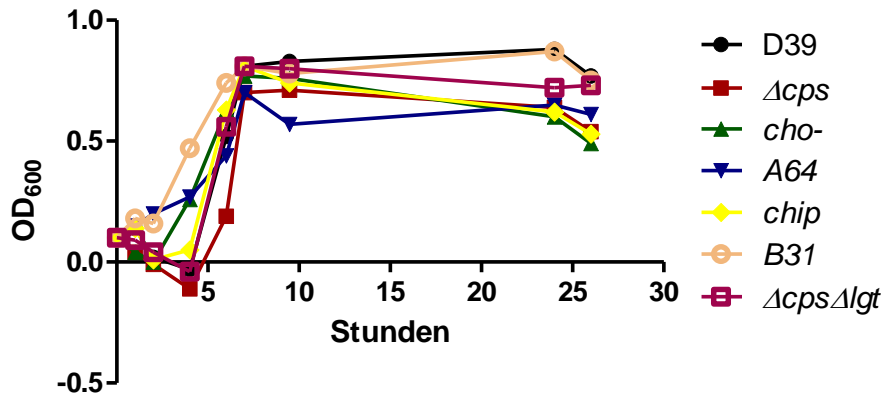


Abb. 18 Wachstumskurven der *S. pneumoniae* D39 Mutanten. *S. pneumoniae* D39 Mutanten sind in TSB-Flüssigkultur bei 37 °C und 5 % CO₂ gewachsen. Ausgangs-OD₆₀₀ betrug 0,1. Gemessen wurde in 1- bis 2-stündigen Abständen. Die dargestellte Wachstumskurve ist eine repräsentative von dreien. D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho*⁻*licA64*, *chip* = D39 *chip*^{T700}, B31= D39 *chip*^{T700}*licB31*

Der Anteil lebendiger Bakterien wurde mit Hilfe einer Vitalitätsfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Für die Auswertung wurden zwei unterschiedliche Methoden (siehe 2.2.1.2) verwendet, die aber keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Vitalität der Bakterien lieferten (Daten nicht dargestellt). Die Vitalität der Bakterien konnte durch diese Methode entweder nicht ausreichend bestimmt werden oder scheint sich zwischen den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen nicht zu unterscheiden.

3.9 Bedeutung des TLR2 bei der Immunantwort auf *S. pneumoniae* D39 und deren Cholinmutanten

Bisher wurde nur das immunologische Verhalten der *S. pneumoniae* D39 Mutanten betrachtet. Für das immunologische Verhalten der Pneumokokken sind u.a. Rezeptorinteraktionen mit der Immunzelle verantwortlich. Die vorwiegende publizierte Meinung ist, dass der TLR2 an der Immunantwort gegen Pneumokokken beteiligt ist (Tomlinson et al., 2014).

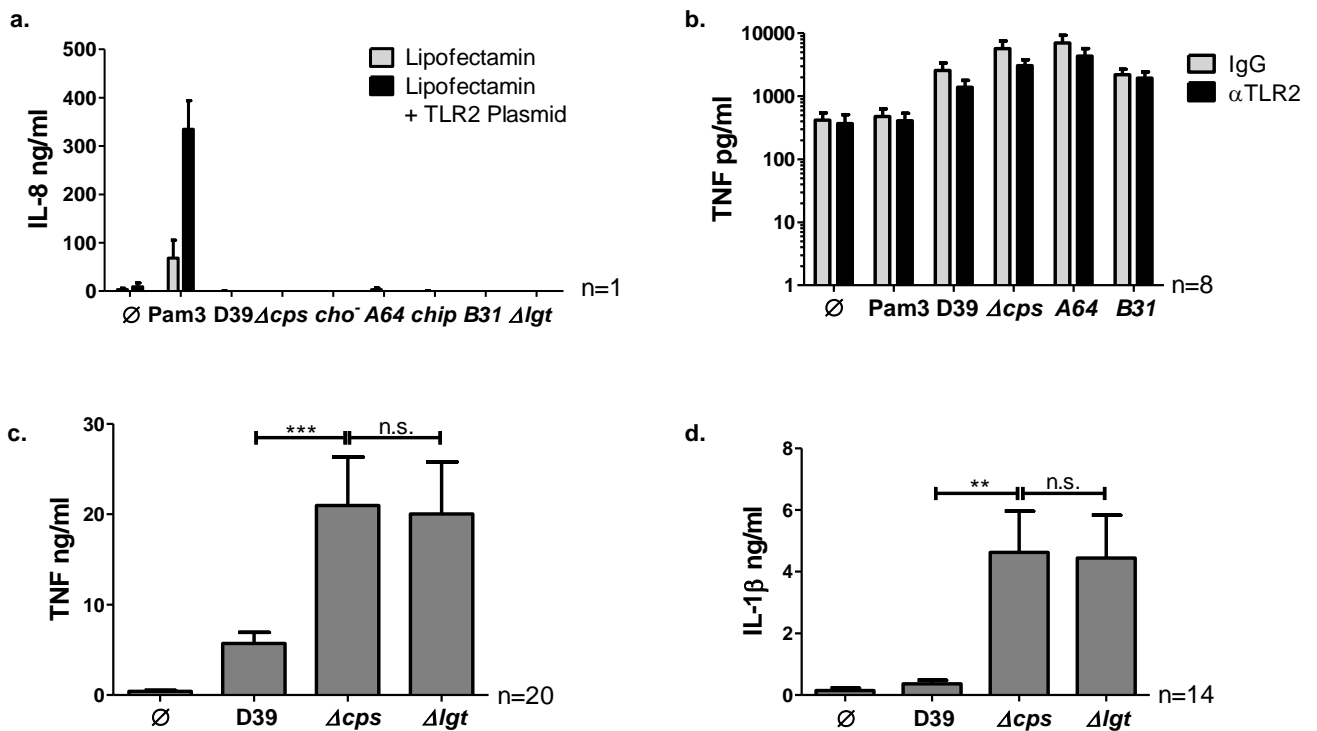


Abb. 19 Die Rolle von TLR2 an der Pneumokokkenerkennung. **a.** HEK293-Zellen wurden mit Lipofectamin als Negativkontrolle prästimuliert. Mit Hilfe des Lipofectamins wurde das TLR2 Plasmid in die HEK-Zellen eingebracht und anschließend mit den *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert. Die IL-8-Konzentration im Überstand wurde durch den ELISA bestimmt. **b.** Monozyten wurden mit IgG (0,5 mg/ml) als Positivkontrolle prästimuliert und der TLR2 wurde 30 min vor der Stimulation mit den *S. pneumoniae* D39-Mutanten mit 0,5 mg/ml anti-TLR2 ($\alpha TLR2$) blockiert. Zur Auswertung wurde im Überstand TNF durch den ELISA bestimmt. **c.** und **d.** Monozyten wurden mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert und TNF oder IL-1 β wurde durch den ELISA im Überstand bestimmt. Als Positivkontrolle wurde der TLR2-Ligand Pam3 CSK₄ verwendet. Ø= Negativkontrolle, Pam3= Pam3 CSK₄, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64= D39 *cho*⁻*licA64*, *chip*= D39 *chip*^{T700}, B31= D39 *chip*^{T700}*licB31*, Δlgt = D39 $\Delta cps \Delta lgt$, n.s. = nicht signifikant, n = Anzahl der Spender, Fehlerbalken = SEM, zweiseitiger gepaarter T-Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001

Die Bedeutung des TLR2 bei der Immunantwort gegen Pneumokokken wurde mittels eines HEK-Zell-Experiments überprüft (Abb. 19a). Hierbei wurden in HEK293-Zellen, die natürlicherweise keine TLR exprimieren (Dittrich et al., 2015), mit Lipofectamin das TLR2-Plasmid eingebracht, um gezielt die TLR2-Wirkung zu zeigen. Pam3 CSK₄, als Ligand für den TLR2 (Vashishta et al., 2015), zeigt, dass die Transfektion erfolgreich war. Hingegen scheinen weder der *S. pneumoniae* D39 Wildtyp noch die Mutanten den TLR2-Rezeptor zu

verwenden (Abb. 19a). Da auch keine der Mutanten den TLR2 verwendet, scheinen die CBP keinen Einfluss auf den TLR2 und die damit vermittelte Immunantwort zu haben. Moffitt et al. (2015) konnten ebenfalls zeigen, dass keine TLR2-Aktivität der Pneumokokken in einem HEK-Zellexperiment zu sehen ist (Moffitt et al., 2015). Um eine direkte Interaktion der TLR2-Liganden und des Rezeptors zu gewährleisten, wurde auch ein HEK-Zellexperiment mit hitzedenaturierten Bakterien (15 min bei 98 °C) durchgeführt. Hierbei ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Negativkontrolle mit dem Lipofektamin und dem TLR2-Plasmid (Daten nicht dargestellt).

Zur weiteren Untersuchung der TLR2 Bedeutung wurde bei den Monozyten der TLR2 30 min vor der Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten mit anti-TLR2 (α TLR2) inhibiert. Zur Positivkontrolle wurde der Stimulus IgG, genauso wie α TLR2, 30 min vor der Stimulation mit den Pneumokokkenmutanten hinzugegeben (Abb. 19b). Die TNF-Produktion, die im Überstand der Monozyten durch den ELISA bestimmt wurde, zeigt bei allen Mutanten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Positivkontrolle IgG und dem inhibierten TLR2 (Abb. 19b).

Es wurde bereits gezeigt, dass diacylierte Lipoproteine an den TLR2 binden (Gisch et al., 2013). Zur Überprüfung dieses Ergebnisses, wurde die *S. pneumoniae* D39 Mutante $\Delta cps \Delta lgt$ verwendet (Abb. 20). Dieser Mutante fehlt neben der Kapsel (Δcps) auch die Lipoprotein Diacylglycerol Transferase (Δlgt), die für die Diacylierung der Lipoproteine verantwortlich ist (Pribyl et al., 2014). Fehlen die diacylierten Lipoproteine, ist auch kein TLR2 Ligand vorhanden.

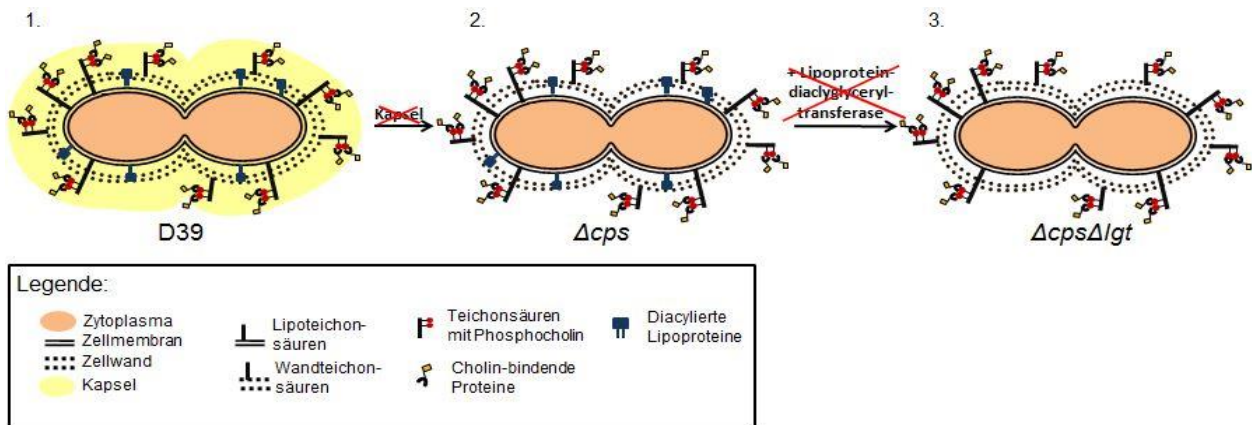


Abb. 20 Entstehung der Kapsel- und Lipoproteinmutanten. Durch eine Mutation im Kapselgen des *S. pneumoniae* D39 Wildtypen (1) entsteht die kapsellose Mutante Δcps (2). Diese dient als Grundlage für die Doppelmutante $\Delta cps\Delta lgt$, der neben der Kapsel auch die Lipoprotein Diacylglyceryl Transferase (Lgt) fehlt. Das Fehlen der Lgt führt dazu, dass keine diacylierten Lipoproteine mehr gebildet werden können und in der Mutante als TLR2 Ligand fehlen (3). D39= *S. pneumoniae* D39, Δcps = *S. pneumoniae* D39 Δcps und $\Delta cps\Delta lgt$ = *S. pneumoniae* D39 $\Delta cps\Delta lgt$

In Abbildung 19c sind die Ergebnisse der Monozytenstimulation mit *S. pneumoniae* D39 WT und den beiden Mutanten D39 Δcps und D39 $\Delta cps\Delta lgt$ zu sehen. Zur Bestimmung des immunstimulatorischen Potentials der Pneumokokken wurde die TNF-Konzentration im 24 h-Überstand durch den ELISA ermittelt. Da kein signifikanter Unterschied zwischen D39 Δcps und D39 $\Delta cps\Delta lgt$ zu sehen ist, scheint auch hier keine TLR2-Aktivität vorhanden zu sein. Neben der TNF-Konzentration im Überstand wurde auch die IL-1 β -Konzentration durch den ELISA bestimmt. Hierbei ergaben sich die gleichen Ergebnisse wie bei TNF (Abb. 19d). Zusammenfassend konnte man in keiner der in Abbildung 19 dargestellten Experimente eine TLR2-Aktivität der Pneumokokken erkennen.

3.10 Einfluss einer LPS Vorstimulation auf die Immunantwort gegen *S. pneumoniae* D39 Mutanten

Für die verbesserte Bindung an TLR sind u.a. Korezeptoren verantwortlich; sie können dadurch die zelluläre Immunantwort verstärken (Di Gioia und Zanoni, 2015). Der TLR2 Korezeptor CD36 hat eine besondere Bedeutung bei der Immunantwort auf Pneumokokken, da das P-Cholin von *S. pneumoniae* an CD36 bindet (Di Gioia und Zanoni, 2015; Sharif et al., 2013). Sharif et al. (2013) konnten zeigen, dass CD36 die Immunantwort

auf Pneumokokken im respiratorischen Epithel suppremiert und Sovershaev et al. (2007), dass LPS die CD36 Expression erhöht (Sharif et al., 2013; Sovershaev et al., 2007).

Um die Bedeutung von CD36 an der Zytokinproduktion auf *S. pneumoniae* D39 und deren Cholinmutanten zu überprüfen, wurden Monozyten zunächst mit 1 ng/ml LPS für 2 h prästimuliert. Hierdurch soll die CD36 Expression erhöht und der Effekt von CD36 auf die Zytokinproduktion verstärkt werden. Nach den 2 h wurde die CD36 Konzentration auf den vorstimulierten Monozyten und den nicht vorstimulierten Monozyten über einen PE-markierten anti-humanen CD36- Antikörper im Durchflusszytometer gemessen. Bei 12 von 14 Spendern konnte eine geringe Zunahme der CD36-Konzentration verzeichnen werden (Prozentuale Differenz von $3,76 \pm 0,53$ (SEM)). Der Anteil der CD36 positiven Monozyten an allen Monozyten schwankte bei den unstimulierten zwischen 4,3 bis 44,6 %, sodass CD36 nicht zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse zwischen vorstimulierten und nicht vorstimulierten Monozyten verwendet werden kann (Abb. 21).

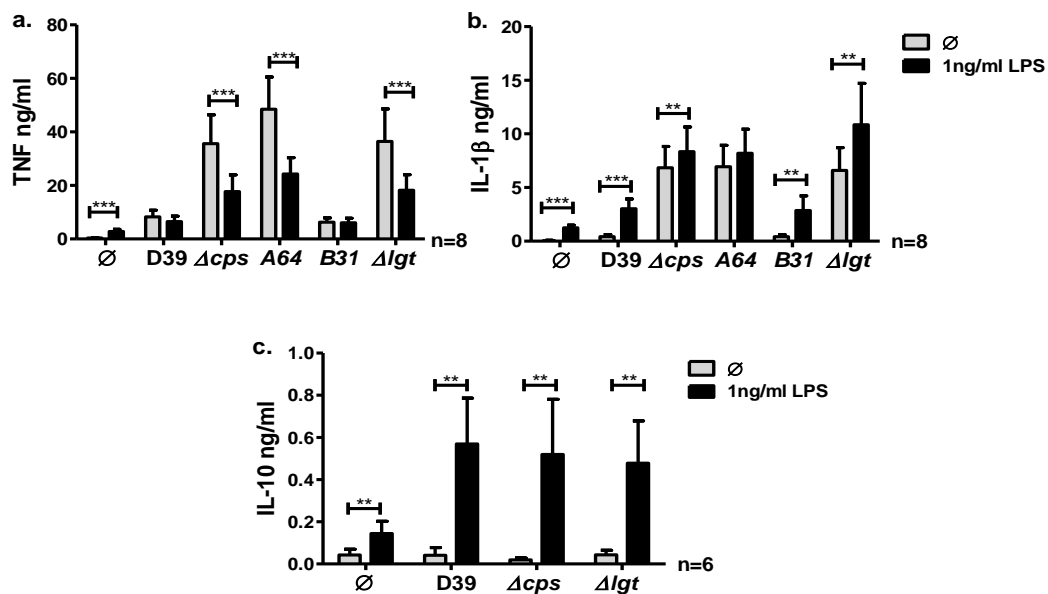


Abb. 21 Prästimulationsexperimente der Monozyten mit LPS. Monozyten wurden für 2 h entweder mit 1 ng/ml LPS prästimuliert oder ohne LPS als Negativkontrolle (\emptyset), LPS wurde anschließend ausgewaschen und die Monozyten wurden mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten stimuliert. Die jeweiligen Zytokine wurden anschließend in den Überständen durch einen ELISA gemessen. **a.** TNF, **b.** IL-1 β , **c.** IL-10, Legende von b. bezieht sich auf a. und b.. \emptyset = unstimuliert, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, A64 = D39 *cho*^{licA64}, B31= D39 *chip*^{T700}*licB31*, Δlgt = D39 $\Delta cps \Delta lgt$, n=Anzahl der Spender, von jedem Spender wurden Triplikate gemacht, Fehlerbalken= SEM, zweiseitiger gepaarter T-Test: **<0,01, *** <0,001

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass die LPS Vorstimulation auch ohne Pneumokokkenstimulation bereits zu einer vermehrten Zytokinproduktion von TNF, IL-1 β und IL-10 führt. Die LPS-Vorstimulation führt zu einer signifikant geringeren TNF-Produktion der Monozyten, die mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten Δcps , $cho^{\bar{}}licA64$ und $\Delta cps\Delta lgt$ stimuliert wurden. Bei D39 Wildtyp und D39 $chip^{T700}licB31$ führt die LPS Vorstimulation zu keinem Unterschied in der TNF-Produktion (Abb. 21a). IL-1 β und IL-10 wird nach LPS-Vorstimulation der Monozyten, auf die Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten, signifikant mehr gebildet als ohne LPS-Vorstimulation (Abb. 21b und c). Eine Ausnahme hiervon stellt die IL-1 β Produktion der Monozyten nach Stimulation mit D39 $cho^{\bar{}}licA64$ dar. Hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen LPS-Vorstimulation und keiner Vorstimulation vorhanden (Abb. 21b).

3.11 Wirkung von TNF auf IL-1 β - und IgM-Produktion

Zur Auswertung der bisherigen Experimente wurde stets TNF oder IL-1 β verwendet und es wurden Unterschiede zwischen den beiden Zytokinen in der Immunantwort auf Pneumokokken beobachtet. Um der Frage nach den Unterschieden in der Immunantwort nachzugehen, wurde der gegenseitige Einfluss der beiden Zytokine aufeinander untersucht.

Bisher ist bekannt, dass die TNF-Rezeptordichte durch IL-1 β herunterreguliert wird (Ibelgaufts, 2013). Umgekehrt scheint aber TNF keinen Einfluss auf die IL-1 β -Produktion zu haben (Abb. 22a). Hierzu wurde anti-TNF (α TNF) 30 Minuten vor der Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten zu den Monozyten gegeben, um das produzierte TNF direkt zu binden. Abbildung 22b stellt die Negativkontrolle dar. Sie zeigt, dass nach Blockade von TNF mit α TNF im TNF-ELISA kein TNF mehr detektiert werden kann. Vergleicht man die IL-1 β -Produktion der Monozyten auf die *S. pneumoniae* D39 Stimulation mit und ohne geblockten TNF, so fallen bei den *S. pneumoniae* D39 Mutanten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 22a). Die Blockade von TNF scheint hingegen auf die IgM-Produktion der PBMCs nach Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten einen Einfluss zu haben (Abb. 22c). Durch das Binden des produzierten TNFs bilden B-Zellen, die mit D39 $cho^{\bar{}}$ und D39 $cho^{\bar{}}licA64$ stimuliert wurden, signifikant weniger IgM. Fasst man die beobachteten immunstimulatorischen Eigenschaften von TNF zusammen, so scheint TNF

keinen Einfluss auf die IL-1 β Produktion der Monozyten zu haben. Die IgM-Produktion der B-Zellen aus PBMCs wird hingegen gesteigert.

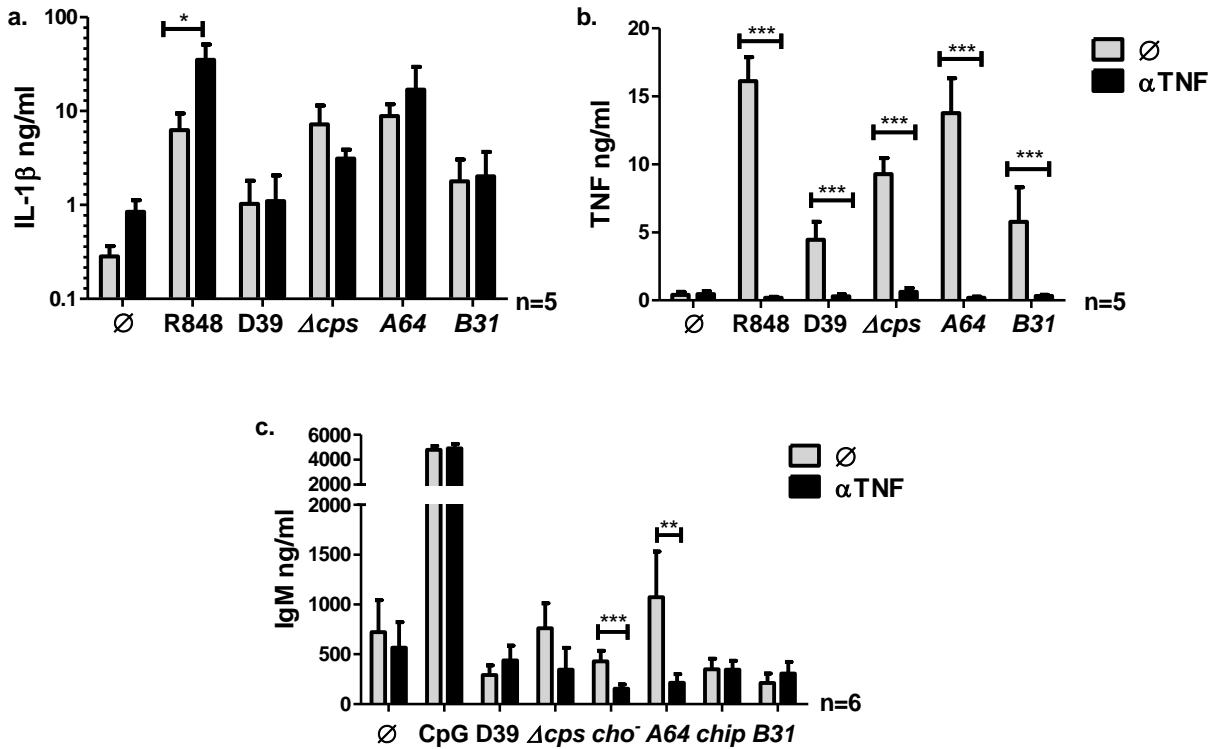


Abb. 22 Einfluss von TNF α auf die Produktion von IL-1 β und IgM. **a.** und **b.** Bei den Monozyten wurde die TNF Produktion mit anti-TNF (α TNF = 5 μ g/ml) 30 min vor Stimulation mit *S. pneumoniae* D39-Mutanten inhibiert. Legende von b. bezieht sich auf a. und b.. **a.** IL-1 β -Konzentration wurde im Überstand durch den ELISA bestimmt. **b.** TNF wurde im Überstand durch den ELISA bestimmt um die Wirkung von α TNF zu zeigen. **c.** Bei den PBMCs wurde die TNF Produktion mit α TNF 30 min vor Stimulation mit *S. pneumoniae* D39-Mutanten inhibiert. Im Überstand wurde die IgM-Konzentration durch ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle wurde der TLR7/8-Ligand R848 oder CpG2006 als TLR9-Ligand verwendet. \emptyset = unstimuliert, CpG= CpG2006, D39= *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, chip= D39 chip^{T700}, A64= D39 cho⁻licA64, B31= D39 chip^{T700}licB31, n=Anzahl der Spender, von jedem Spender wurden Triplikate gemacht, Fehlerbalken = SEM, zweiseitiger gepaarter T-Test: * <0,05, ** <0,01, *** <0,001

4. Diskussion

Die oben dargestellten immunologischen Experimente konnten zeigen, dass sowohl die Kapsel als auch die CBP von *S. pneumoniae* D39 einen Einfluss auf die Immunevasion der Pneumokokken haben. Seit Längerem ist bekannt, dass die Polysaccharidkapsel die Pneumokokken durch Bedecken der Pneumokokkenantigene vor dem Erkennen durch das Komplementsystem schützt (Nelson et al., 2006). Das Fehlen der Kapsel in *S. pneumoniae* D39 Δcps zeigt, dass die Pneumokokken in Abwesenheit der Kapsel besser von Monozyten und PBMCs erkannt werden und eine stärkere Immunantwort hervorrufen als der Wildtyp (Abb. 9 und 10). *S. pneumoniae* D39 $cho^{\bar{}}licA64$, dem P-Cholin (Abb. 6) und somit vermutlich die CBP fehlen, zeigt im Vergleich zu D39 Δcps ein signifikant stärkeres immunstimulatorisches Potential bezogen auf die monozytäre TNF-Produktion (Abb. 9a). Die IL-1 β -Produktion der Monozyten und die IgM-Produktion der B-Zellen in PBMCs, die mit D39 $cho^{\bar{}}licA64$ stimuliert wurden, sind annähernd vergleichbar mit denen in Antwort auf Exposition gegenüber D39 Δcps (Abb. 9b und 10a). Aufgrund dieser Ergebnisse stellen sich die beiden Fragen, warum sich die Zytokinproduktion zwischen IL-1 β und TNF auf D39 $cho^{\bar{}}licA64$ Stimulation unterscheidet und ob die signifikant höhere TNF Produktion der Monozyten auf D39 $cho^{\bar{}}licA64$ allein auf das Fehlen der CBP zurückzuführen ist.

4.1 Unterschiede in der Zytokinproduktion der Monozyten zwischen IL-1 β und TNF auf D39 $cho^{\bar{}}licA64$ Stimulation im Vergleich zu D39 Δcps

Die Unterschiede in der Zytokinproduktion der Monozyten zwischen IL-1 β und TNF auf Stimulation mit D39 $cho^{\bar{}}licA64$ und D39 Δcps können verschiedene Ursachen haben. Für die Interaktion mit den Immunzellen spielen Rezeptoren sowie Korezeptoren der Immunzellen eine Rolle. Durch Bindung der Pathogene an Rezeptoren werden verschiedene Signalwege aktiviert. D39 $cho^{\bar{}}licA64$ und D39 Δcps fehlen aufgrund ihrer Mutationen unterschiedliche Virulenzfaktoren, die bei der Bindung an die Rezeptoren eine Rolle spielen. Dies könnte dazu führen, dass andere Signalwege verwendet werden und Unterschiede in der Zytokinproduktion zu erkennen sind.

4.1.1 Immunerkennung der Pneumokokken über TLR2

Pneumokokken werden von PRRs (pattern recognition receptors) erkannt (Koppe et al., 2012). Die PRRs beinhalten u.a. TLR (Toll-like Rezeptor), NLR (Nod-like Rezeptor) und viele zytoplasmatische DNA-Sensoren. Zu den TLR, die Pneumokokken erkennen sollen, gehören der membranständige TLR2 und TLR4 sowie der in den Endosomen befindliche TLR9 (Koppe et al., 2012). Der TLR9 erkennt fremde DNA, die unmethylierte CpG Motive enthält (Albiger et al., 2007) und TLR4 ist an der Erkennung von Pneumolysin beteiligt (Malley et al., 2003; Nguyen et al., 2015).

Wie in Kapitel 3.9. bereits dargestellt wurde, ist aus einigen Veröffentlichungen zu entnehmen, dass der TLR2 an der Erkennung von Pneumokokken beteiligt ist (Mogensen et al., 2006; Tomlinson et al., 2014). In den durchgeführten HEK293-TLR2-Transfektions-Experimenten (Abb. 19a) konnte keine signifikante TLR2 abhängige Zytokinproduktion auf *S. pneumoniae* D39 und deren Mutanten verzeichnet werden. Hingegen konnten Koedel et al. (2003) in HEK293-Zellen, die mit TLR2 und CD14 sowie MD-2 kotransfiziert waren, eine vermehrte TNF-Produktion verzeichnen (Koedel et al., 2003). Dieses könnte darauf hindeuten, dass neben dem TLR2 noch weitere Korezeptoren für eine vollständige Immunantwort vorhanden sein müssen. Eine ähnliche Hypothese stellten auch Knapp et al. (2004) auf. In *in vitro*-Experimenten mit TLR2-defizienten Alveolarmakrophagen zeigten diese keine Zytokinsekretion auf Pneumokokkenstimulation (Knapp et al., 2004). Diese *in vitro*-Ergebnisse waren aber nicht *in vivo* im Rahmen einer Pneumonie zu reproduzieren. Die durch Pneumokokken ausgelöste Pneumonie führte in TLR2-defizienten Mäusen zu keinen relevanten Unterschieden in der Zytokinexpression im Vergleich zum Wildtyp, sodass TLR2 nicht für die Immunantwort gegen Pneumokokken als wesentlich betrachtet wurde (Knapp et al., 2004).

Durch die alleinige Blockade des TLR2 der Monozyten im Vergleich zur Positivkontrolle (IgG) konnten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Positivkontrolle und Monozyten mit blockiertem TLR2-Rezeptor der jeweiligen Pneumokokkenmutanten festgestellt werden (Abb. 19b). Bei der Immunantwort der Monozyten auf die Pneumokokken zeigte sich jedoch weiterhin das gewohnte Bild, dass *S. pneumoniae* D39 Δcps und D39 $\Delta cho\tilde{licA64}$ die stärkste Immunantwort induzieren (Abb. 19b). Die von der

Lipoprotein Diacylglyceryl Transferase (Lgt) prozessierten diacylierten Lipoproteine binden an TLR2 (Gisch et al., 2013). Da die D39 $\Delta cps \Delta lgt$ -Mutante im Vergleich zu der D39 Δcps Mutante kein signifikant geringeres immunstimulatorisches Potential aufzeigt (Abb. 19 c und d), konnte nur ein geringer zusätzlicher TLR2 Effekt bei der Immunantwort der Monozyten auf die Pneumokokken nachgewiesen werden. Dies bestätigt ebenfalls die Hypothese, dass *S. pneumoniae* hauptsächlich andere Rezeptoren oder wichtige Korezeptoren für die Interaktion mit Immunzellen zu verwenden scheint.

4.1.2 Die Rolle des Korezeptors CD36 bei der LPS Prästimulation

Dem TLR2 Korezeptor CD36 wird eine inflammationshemmende Wirkung zugeschrieben, da eine Hochregulation von CD36 zu einer verminderten inflammatorischen Antwort führt (Di Gioia und Zanoni, 2015; Patel et al., 2004). LPS kann die CD36-Expression hochregulieren (Sovershaev et al., 2007) und somit die Immunantwort auf *S. pneumoniae* vermindern.

Durchflusszytometrisch konnte eine geringe prozentuale Zunahme der CD36-Konzentration der Monozyten ($3,76 \pm 0,53$ (SEM)) nach 2 h Prästimulation mit LPS im Vergleich zur Negativkontrolle ohne LPS-Prästimulation verzeichnet werden (Kapitel 3.10). Da die CD36-Rezeptordichte bereits im unstimulierten Zustand sehr stark schwankte, kann CD36 nicht der Hauptgrund für die Unterschiede in der Zytokinproduktion auf Pneumokokkenstimulation mit und ohne LPS-Vorstimulation sein (Abb. 21).

Eine stärkere Erhöhung der Rezeptordichte ist evt. durch eine längere Prästimulation der Monozyten mit LPS möglich. Eine 10fach höhere LPS-Konzentration zeigte hingegen keine eindeutigeren Ergebnisse. Die geringe Hochregulation von CD36 würde eine verminderte Immunantwort auf Pneumokokkenstimulation erwarten lassen. Die verminderte Immunantwort spiegelt sich in einer geringeren proinflammatorischen (TNF)- und einer erhöhten antiinflammatorischen (IL10) Zytokinantwort wieder (Abb. 21 a und c). Die erhöhte proinflammatorische (IL-1 β) Zytokinantwort passt nicht in dieses Schema (Abb. 21b), sodass neben der geringen Rolle von CD36 andere Interaktionen eine Rolle spielen müssen.

4.1.3 Gegenseitige Beeinflussung von TNF, IL-1 β und IL-10

Aus Abb. 21 ist zu entnehmen, dass eine LPS-Vorstimulation zu einer geringeren monozytären TNF-Produktion auf Pneumokokkenstimulation führt (Abb. 21a). Allerdings führt es auch zu einer höheren IL-1 β und IL-10-Produktion (Abb. 21b und c). Diese Ergebnisse könnte man mit der „Endotoxintoleranz“ erklären, die eine verminderte Reaktion der Zelle auf wiederholte Stimulation mit einer verminderten Zytokinantwort von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β und TNF) und einer vermehrten Zytokinantwort von antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10) beschreibt (Waller et al., 2016). Die „Endotoxintoleranz“ könnte darauf beruhen, dass das hochregulierte antiinflammatorische Zytokin IL-10 (Abb. 21c) die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF an mehreren Stellen des Signalwegs inhibieren kann (Mittal und Roche, 2015) und zum anderen, dass die TNF-Rezeptordichte von IL-1 reduziert werden kann (Ibelgaufts, 2013), sodass eine Selbstverstärkung der TNF Produktion vermindert wird. Umgekehrt scheint TNF keinen Einfluss auf die IL-1 β Produktion zu haben (Abb. 22a und b). Aber TNF stimuliert die IgM-Produktion der B-Zellen in PBMCs auf einige Pneumokokkenmutanten (Abb. 22c).

Eine Beeinflussung der einzelnen Zytokine untereinander scheint sich nur bemerkbar zu machen, wenn vor der Stimulation mit Pneumokokken eine Vorstimulation mit z.B. LPS stattgefunden hat (Abb. 21) oder eine längere Inkubationszeit als 24 h besteht. Dies ist für die IgM-Produktion mit 13 Tagen zutreffend (Abb. 22c). Eine 24-stündige Inkubationszeit der Zellen mit Pneumokokken, wie bei den Monozytenexperimenten, scheint nicht auszureichen, um den Effekt der einzelnen Zytokine aufeinander darstellen zu können.

Ein möglicher Grund wäre, dass bei einer direkten Stimulation der Zellen mit Pneumokokken die Expression der einzelnen Zytokine zeitgleich und in ausreichenden Mengen abläuft. Rezeptorregulationen machen sich nicht bemerkbar und es sind keine Zytokine vor Beginn der Stimulation vorhanden, die andere Zytokinproduktionswege herunterregulieren können. Wurden die Zytokine durch die LPS-Vorstimulation hingegen schon frühzeitig gebildet, könnten sie direkt die Zytokinproduktion der Monozyten auf die Pneumokokkenstimulation beeinflussen. Bei der 13-tägigen Inkubationszeit wie bei der IgM-Produktion der B-Zellen in den PBMCs können Zytokine, die von anderen PBMCs außer

den B-Zellen gebildet worden sind, die B-Zellen in ihrer IgM-Produktion auf Pneumokokkenstimulation beeinflussen.

Für die unterschiedliche monozytäre Zytokinproduktion von IL-1 β und TNF nach Stimulation mit den beiden *S. pneumoniae* D39 Mutanten Δcps und *cho $\bar{l}icA64$* müssen andere Mechanismen als die Interaktion der einzelnen Zytokine untereinander eine Rolle spielen. Zum einen handelt es sich um Monozyten, die nur 24h ohne Vorstimulation mit Pneumokokken stimuliert wurden. Zum anderen sind die Unterschiede nur bei einigen Pneumokokkenmutanten und nicht bei allen zu erkennen (Abb. 9).

4.1.4 Unterschiedliche monozytäre Zytokinproduktion auf Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Mutanten Δcps und *cho $\bar{l}icA64$*

Eine unterschiedliche monozytäre Zytokinantwort auf Stimulation mit *S. pneumoniae* D39 Δcps und D39 *cho $\bar{l}icA64$* könnte damit zusammenhängen, dass TNF und IL-1 β durch unterschiedliche Stimuli produziert und somit unterschiedliche Signalwege angesprochen werden. TLR und NOD2 stimulieren über MyD88 die NF- κ B abhängige Produktion von Zytokinen wie TNF, IL-6 und pro-IL-1 β (Koppe et al., 2012). TNF und IL-6 sind direkt nach der Translation funktionstüchtig und können freigesetzt werden (Koppe et al., 2012). Pro-IL-1 β hingegen benötigt noch ein weiteres Signal (Koppe et al., 2012). Hierzu muss Pneumolysin an NLRP3 oder Pneumokokken DNA an AIM2 binden und dadurch Inflammasome aktivieren, die pro-IL-1 β durch Spaltung zu dem funktionstüchtigen IL-1 β aktivieren (Koppe et al., 2012). Witzenrath et al. (2011) haben herausgefunden, dass Bakterien mit weniger hämolytischen Pneumolysin kaum die IL-1 β -Produktion stimulieren (Witzenrath et al., 2011).

Der Einfluss von Pneumolysin könnte ebenfalls einen Grund für die unterschiedliche monozytäre Zytokinantwort auf *S. pneumoniae* D39 Δcps und D39 *cho $\bar{l}icA64$* darstellen (Abb. 9). Zu den CBP gehören u.a. auch die autolytischen Proteine LytA und C (Bai et al., 2014; Mellroth et al., 2012; Ramos-Sevillano et al., 2011). Mangels P-Cholin in der *S. pneumoniae* D39 Mutante *cho $\bar{l}icA64$* (Abb. 6) fehlen auch diese CBP. Deshalb können sie keine oder nur im geringen Maße Autolyse betreiben. Daraus resultieren eventuell auch geringere Mengen an freigesetztem Pneumolysin oder freigesetzter DNA, die eine

geringere IL-1 β -Produktion induzieren. In Abb. 13 und 14 ist zu erkennen, dass *S. pneumoniae* D39 *cho⁻licA64* keine Kapsel zu exprimieren scheint. Das Fehlen der Kapsel in D39 *cho⁻licA64* und D39 Δ *cps* könnte dafür verantwortlich sein, dass die beiden Mutanten eine äquivalente IL-1 β -Produktion induzieren (Abb. 9b). D39 *cho⁻licA64* induziert eine signifikant größere TNF Produktion in den Monozyten im Vergleich zu D39 Δ *cps* (Abb. 9a). Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass D39 *cho⁻licA64* weder über eine Kapsel noch über CBP verfügt. Durch das Fehlen von zwei Virulenzfaktoren ist die Immunantwort auf D39 *cho⁻licA64* höher als nur auf die kapselfreie Mutante D39 Δ *cps*. Pneumolysin scheint auf die TNF-Produktion keinen Einfluss zu haben (Witzenrath et al., 2011), sodass dies nur die IL-1 β Antwort erklären könnte.

4.2 Gründe für die signifikant höhere TNF-Produktion der Monozyten auf *S. pneumoniae* D39 *cho⁻licA64* Stimulation im Vergleich zu D39 Δ *cps*

Zur Klärung der zweiten Frage, ob die signifikant höhere TNF-Produktion der Monozyten auf die Pneumokokkenmutante D39 *cho⁻licA64* gegenüber D39 Δ *cps* nur durch das Fehlen der CBP bedingt ist, wurden weitere Experimente mit *S. pneumoniae* D39 *chip^{T700}licB31* durchgeführt.

Zum einen kann D39 *chip^{T700}licB31* durch die Mutation in der Flippase TacF cholinunabhängig wachsen (Kharat et al., 2008) und zum anderen kann D39 *chip^{T700}licB31* aufgrund der Mutation im *licB*-Gen kein Cholin importieren und somit auch kein P-Cholin auf der Oberfläche verankern (Eberhardt et al., 2009). Dies führt dazu, dass D39 *chip^{T700}licB31* der Theorie nach keine CBP binden kann.

In den immunstimulatorischen Experimenten mit Monozyten fiel auf, dass D39 *chip^{T700}licB31* eine deutlich geringere Zytokinproduktion von TNF und IL-1 β als D39 *cho⁻licA64* induziert (Abb. 12). In PBMCs ist ebenfalls eine geringere IgM-Produktion zu erkennen (Abb. 12c). Das immunstimulatorische Potential von D39 *chip^{T700}licB31* ist teilweise geringer oder gleich dem des Wildtyps (Abb. 12). Die P-Cholin-Menge der Pneumokokkenzellwand und damit die möglichen Bindungspartner wurden durch Fluoreszenzmikroskopie und durch Westernblot nachgewiesen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist weder für D39 *cho⁻licA64* noch für D39 *chip^{T700}licB31* P-Cholin

auf der Pneumokokkenoberfläche zu erkennen (Abb. 6a). Im Westernblot hingegen konnten bei D39 *chip*^{T700}*licB31* P-Cholin in deutlich größeren Mengen als bei D39 *cho*⁻*licA64* nachgewiesen werden (Abb. 6b und c). Da bei D39 *cho*⁻*licA64* durch die *licA*-Mutation kein Cholin mehr phosphoryliert (Eberhardt et al., 2009) werden kann, ist verständlich, dass weder durch Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 6a) noch durch Westernblot (Abb. 6b) Phosphocholin in der Mutante nachgewiesen werden konnte. Bei D39 *chip*^{T700}*licB31* fehlt hingegen LicB, das für den Cholinimport zuständig ist (Eberhardt et al., 2009). Gelingt es der Mutante Cholin durch andere Transporter zu importieren, so kann dies, wie üblich, phosphoryliert sowie an der Zellwand verankert werden und damit als Anker für CBP dienen.

Bei der Genomsequenzierung von *S. pneumoniae* D39 wurde noch ein weiteres Protein gefunden, das am Import von Cholin beteiligt ist (Lanie et al., 2007). Dabei handelt es sich um einen ABC-Importer, der aus ProV (SPD_1643) und ProWX (SPD_1642) besteht (Brown et al., 2015; Swetha et al., 2014). ProWX ist dabei die Permease (Transmembranprotein) und ProV das ATP-bindende Protein (Brown et al., 2015). Durch diesen ABC-Importer kann unabhängig von LicB Cholin aufgenommen werden. Es scheint, dass durch diesen ABC-Transporter weniger Cholin aufgenommen werden kann, da kein P-Cholin bei D39 *chip*^{T700}*licB31* in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 6a) und nur geringere Mengen an P-Cholin im Westernblot dargestellt werden konnten (Abb. 6b). Ein indirektes Kriterium dafür, dass die P-Cholin Menge in D39 *chip*^{T700}*licB31* nicht ausreichend ist, um alle CBP (u.a. LytB) zu binden, ist, dass D39 *chip*^{T700}*licB31* in langen Ketten in TSB-Flüssigkultur wächst (Abb. 7a). Der Cholintransporter könnte erklären, weshalb das immunstimulatorische Potential von D39 *chip*^{T700}*licB31* leicht unter dem von D39 *cho*⁻*licA64* liegt, aber nicht das D39 *chip*^{T700}*licB31* beim Wachstum auf Columbia-Blutagar ein so geringes immunstimulatorisches Potential wie der Wildtyp aufweist, obwohl ihm einige Virulenzfaktoren fehlen.

4.2.1 Mangelnde Verankerung als möglicher Grund für das Fehlen der Kapsel

Beim Betrachten des Wachstums der *S. pneumoniae* D39 Mutanten auf Columbia-Blutagar fällt auf, dass D39 *chip*^{T700}*licB31* deutlich schleimiger wirkt als die anderen Mutanten (persönliche Beobachtungen) und sich bei den immunstimulatorischen Experimenten D39 *cho*⁻*licA64* ähnlich der Kapselmutante D39 Δ *cps* verhält. Diese beiden Beobachtungen lassen vermuten, dass D39 *cho*⁻*licA64* im Gegensatz zu D39 *chip*^{T700}*licB31* keine Kapsel aufweist. Auf genetischer Ebene zeigten alle Mutanten, außer die beiden Kapselmutanten D39 Δ *cps* und D39 Δ *cps* Δ *lgt*, Kapselgene (Abb. 5a). Überraschenderweise scheint D39 *cho*⁻*licA64* keine Kapsel zu haben, da sowohl in dem Kapselagglutinationstest (Abb. 13), in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 14a), als auch in der Elektronenmikroskopie (Abb. 14b) keine Kapsel zu erkennen ist. Aus diesen Ergebnissen resultiert die Frage, warum bei D39 *cho*⁻*licA64* trotz vorhandener Kapselgene die Kapsel fehlt. Hierzu kann man folgende Hypothesen aufstellen.

1. Die erste Hypothese lautet, dass D39 *cho*⁻*licA64* eine Kapsel bilden kann, aber aufgrund einer Mutation im *spr1226* Gen die Kapselverankerung durch Psr nicht mehr erfolgt. Das durch das *spr1226*-Gen kodierte Psr ist vermutlich für die Verankerung der Kapsel an Peptidoglykanen oder für die Verankerung der Teichonsäuren an Glc-DAG (LTA) sowie an Peptidoglykane (WTA) verantwortlich (Denapaitte et al., 2012).

Durch die heterologe genetische Kreuzung mit *S. oralis* ist die *S. pneumoniae* D39 Mutante *cho*⁻ entstanden (Kharat und Tomasz, 2006), die Vorläufermutante von D39 *cho*⁻*licA64*. Hierbei wurde das große *lic3* Gencluster für die Teichonsäuresynthese der Pneumokokken (R6) durch Gene von *S. oralis* ersetzt (Denapaitte et al., 2012) und einige *S. oralis*- Gene wie *tacF*, *pce*, *licD4*, *orf2*, *orf4* und *orf5* wurden dabei zusätzlich in die Pneumokokken- DNA eingebaut, sowie einige Pneumokokken Gene (*spr1221-1224*) deletiert (Kharat et al., 2008).

Der Einbau des *tacF*-Gens von *S. oralis* in die Pneumokokken-DNA ermöglicht das cholinunabhängige Wachstum (Kharat et al., 2008). Außerdem scheint die Glykosyltransferase *orf2* zu 44 % identisch mit dem deletierten *spr1223* zu sein (Kharat et al., 2008). Das *psr*-Gen liegt unmittelbar vor dem *lic3* Gencluster in *S. pneumoniae* R6 und wurde bei der Kreuzung durch das *psr*-Gen von *S. oralis* ersetzt (Kharat et al., 2008). Es ist zu 77 % identisch mit dem Pneumokokken *psr*-Gen, jedoch wurde bei der

Transformation die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Sma*I deletiert (Kharat et al., 2008). Die Deletion könnte dazu führen, dass in Hybridisierungsexperimenten das *psr* Gen sowohl in R6 *cho*⁻ als auch in D39 *cho*⁻ nicht mehr zu erkennen ist und als deletiert vermutet wird (Kharat und Tomasz, 2006).

Die exakte Beschreibung des genetischen Aufbaus von der *cho*⁻ Mutante wurde bisher nur an dem nicht bekapselten R6-Stamm vorgenommen und nicht an dem für die Experimente verwendeten D39-Stamm. Da *S. pneumoniae* R6 aus D39 entstanden ist (Lanie et al., 2007) und für die Transformation vom D39 Wildtyp in *cho*⁻ die DNA aus *S. pneumoniae* R6 *cho*⁻ verwendet wurde (Kharat und Tomasz, 2006), lassen sich die meisten genetischen Veränderungen vermutlich übertragen. Nicht schlüssig an dieser Erklärung für die fehlende Verankerung der Kapsel ist, dass unter diesen Umständen sowohl *S. pneumoniae* D39 *cho*⁻ als auch die Doppelmutation D39 *cho*⁻*licA64* über keine Kapsel verfügen sollte. In den Experimenten (Abb. 13 und 14) zeigte sich hingegen nur, dass D39 *cho*⁻*licA64* keine Kapsel zu exprimieren scheint, D39 *cho*⁻ hingegen schon. Die D39 *cho*⁻ Kapsel in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 14b) wirkt sehr dünn, sodass sich hier über eine mögliche Kapsel diskutieren lassen könnte. Es müssen aber zumindestens ausreichende Kapselreste vorhanden sein, um das Binden von Kapselserotyp 2-Antikörpern (Abb. 14a) oder eine Kapselagglutination (Abb. 13) zu ermöglichen. Durch die Doppelmutation müsste bei D39 *cho*⁻*licA64* noch ein weiterer Mechanismus betroffen sein, der zu gar keiner oder einer noch schwächeren Verankerung der Kapsel führt.

Neben der Phosphotransferase *Psr* sind auch die anderen beiden Phosphotransferasen der LCP-Proteinfamilie, *LytR* (*spr1759*) und *CpsA*, an der Kapsel- oder Teichonsäurenverankerung beteiligt (Denapaite et al., 2012). *LytR* wird vornehmlich während des exponentiellen Wachstums von kompetenten Pneumokokken gebildet und schützt die Pneumokokken vor der Zelllyse durch die Peptidoglykanhydrolase *CbpD* (Denapaite et al., 2012).

CpsA, als Bestandteil des *cps*-Operons (Yother, 2011), wird zusammen mit den anderen Kapselgenen reguliert und ist gemeinsam mit *LytR* für die Expression der an der Zellwand verankerten Kapsel von *S. pneumoniae* D39 verantwortlich (Denapaite et al., 2012). *CpsA lytR* Doppelmutanten zeigen eine erhebliche Beeinträchtigung im

Wachstum und der Zellmorphologie und verlieren ca. die Hälfte ihres Kapselmaterials in den Überstand (Eberhardt et al., 2012). Des Weiteren können *cpsA lytR* Doppelmutanten in Flüssigkultur nur bis zu einer optischen Dichte von 0,2-0,3 wachsen und lysieren anschließend (Eberhardt et al., 2012). Dies bestätigt den Schutz von LytR vor der Autolyse (Denapaite et al., 2012). Eberhardt et al. (2012) konnten ebenfalls zeigen, dass eine Mutation entweder in dem *psr* oder *cpsA*-Gen lediglich zu einer geringeren Kapselmenge führt, die allerdings nicht in den Überstand abgegeben wird (Eberhardt et al., 2012). Da LytR die Autolyse durch das CBP CbpD unterdrückt (Denapaite et al., 2012), ist eine weitere Hypothese, dass durch das Fehlen der CBP in D39 *cho⁻licA64* die Aktivität von LytR herunterreguliert wird und eine noch geringere Kapselverankerung als bei der alleinigen Mutation von *Psr* in D39 *cho⁻* zu finden ist.

2. Die zweite Hypothese ist, dass eine Kapselverankerung oder eine Reduktion der Kapselmenge durch das Katabolit kontrollierende Protein A (CcpA) reguliert wird und P-Cholin das CcpA beeinflussen kann. CcpA bindet an den katabolitempfindlichen Bereich (*cre*) der DNA (Carvalho et al., 2011). In Abhängigkeit der *cre*-Position zur Promotorposition in der DNA kann eine Bindung von CcpA an *cre* aktivierende oder inhibierende Eigenschaften auf die Transkription der DNA aufweisen (Carvalho et al., 2011). CcpA scheint sowohl Einfluss auf die Kapselgenexpression (Giammarinaro und Paton, 2002), als auch auf die Ausprägung von Virulenzfaktoren, wie z.B. P-Cholin, zu haben (Carvalho et al., 2011).

Carvalho et al. (2011) konnten zeigen, dass sowohl für den D39 Wildtyp als auch für die D39 Δ *ccpA* Mutante im galaktosehaltigen Medium eine größere Kapsel gebildet wird. Allerdings waren 94 % der Kapsel der D39 Δ *ccpA* Mutante im Überstand zu finden und nicht an der Zellwand verankert. Beim Wildtyp hingegen waren dieses lediglich 13 % und auch nur in der transparenten Phase (Carvalho et al., 2011). Das lässt den Schluss zu, dass CcpA einen entscheidenden Einfluss auf die Verankerung der Kapsel hat.

Des Weiteren sind die Gene, die in den Cholinmetabolismus involviert sind (*licABC* und *tarJI*), in der D39 Δ *ccpA* Mutante hochreguliert und die Menge an CDP-Cholin erhöht (Carvalho et al., 2011). Daraus lässt sich entnehmen, dass CcpA die Cholinmenge der Zellwand beeinflussen kann, und somit auch die Virulenzfaktoren der Pneumokokken durch die Menge an bindenden CBP (Carvalho et al., 2011).

Das bei der Glykolyse entstandene ATP triggert u.a. die CcpA Aktivität, durch die Induktion einer vermehrten CcpA Bindung an *cre* (Giammarinaro und Paton, 2002). Glukose dient vornehmlich dem optimalen Wachstum der Pneumokokken und der Blockade von Virulenzfaktoren, wie P-Cholin oder NanAB (Carvalho et al., 2011). Galaktose fördert die Kapselverankerung und blockiert ebenfalls die Virulenzfaktoren (Carvalho et al., 2011).

CcpA könnte durch die Regulation der CpsA-Synthese den Grad der Verankerung der Kapsel an der Zellwand bestimmen. Es ist wahrscheinlich, dass CpsA bei der durch CcpA induzierten Kapselverankerung beteiligt ist, da für CcpA in *S. suis* die Beeinflussung der CpsA-Synthese festgestellt wurde (Willenborg et al., 2011). CcpA stellt zudem das erste Genprodukt außerhalb des *cps*-Lokus dar, das die Kapselbiosynthese direkt beeinflusst.

Die Wirkung von unterschiedlichen Zuckern sollte kein Grund für den entscheidenden Unterschied zwischen der Kapselverankerung von D39 *cho*⁻ und D39 *cho*⁻*licA64* sein, da alle Bakterienmutanten auf Nährmedien gleicher Zusammensetzung gewachsen sind. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Kapselverankerung von D39 *cho*⁻ und D39 *cho*⁻*licA64* wäre, dass durch die geringere Menge an P-Cholin in D39 *cho*⁻*licA64* die Inhibierung von CcpA auf die P-Cholin-Synthese wegfällt und CcpA herunter reguliert wird. Die Herunterregulation von CcpA könnte dazu führen, dass die Kapselverankerung nicht weiter verstärkt wird und dadurch die Kapsel weniger stark an der Zellwand verankert ist. Bei D39 *chip*^{T700}*licB31* ist mehr P-Cholin als bei D39 *cho*⁻*licA64* vorhanden (Abb. 6), sodass hier evt. die Rückkopplung nicht stattfinden kann.

Des Weiteren fehlt bei D39 *chip*^{T700}*licB31* die erste Mutation im *psr*-Gen. Deshalb sollte aus einer möglichen Herunterregulation von CcpA lediglich eine leicht geringere Kapselverankerung resultieren, da 2 von 3 LCP-Proteinen noch funktionieren, wohingegen bei D39 *cho*⁻*licA64* nur noch eins funktionieren würde. In der Elektronenmikroskopie weist D39 *chip*^{T700}*licB31* sogar eine besonders dicke Kapsel auf (Abb. 14b), die mit dem schleimigen Wachstum zu vereinbaren wäre (persönliche Beobachtungen). Der genaue Mechanismus der Beeinflussung der Kapsel- und Virulenzfaktoren über CcpA ist noch nicht vollständig geklärt, sodass sich zum jetzigen Wissensstand nur Hypothesen aufstellen lassen.

4.2.2 Die Auswirkung der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf das immunstimulatorische Verhalten der Pneumokokken

Die Kapselverankerung durch CpsA spielt ebenfalls beim Wachstum der Pneumokokken unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen eine Rolle. Überraschenderweise zeigt D39 *chip*^{T700}*licB31* beim Wachstum in TSB-Flüssigkultur ein deutlich stärkeres immunstimulatorisches Verhalten sowohl auf Monozyten als auch auf B-Zelle in PBMCs im Vergleich zum Wachstum auf Columbia-Blutagar (Abb. 17). D39 *cho*⁻*licA64* zeigt unter beiden Wachstumsbedingungen ein ähnlich hohes immunstimulatorisches Potential, wird aber von dem in Flüssigkultur wachsenden *chip*^{T700}*licB31* überboten (Abb. 17).

Oggioni et al. (2006) konnten zeigen, dass das Wachstum der Pneumokokken auf Agar sich hinsichtlich der Genexpression von denen in Flüssigkultur deutlich unterscheidet. Hier wurde Tryptic Soy als Agar (TSA) oder Tryptic Soy als Flüssigkultur (TSB) als Nährmedium verwendet (Oggioni et al., 2006). Pneumokokken (TIGR4), die auf Agar wachsen, haben im Vergleich zur Flüssigkultur eine stärkere CpsA-, eine stark verringerte Pneumolysin- und eine leicht verringerte PspA-mRNA-Produktion (Oggioni et al., 2006). Bakterien, die in Flüssigkultur wachsen, ähneln in ihrem Genexpressionsmuster denen, die bei einer Sepsis vorkommen (Oggioni et al., 2006). Das Genexpressionsmuster der Pneumokokken, die auf Agar gewachsen sind, ähnelt durch die vermehrte *cps2* Genexpression und die verringerte Genexpression der Virulenzgene (*ply*, *pspA*, *nanA* und *B*) (Oggioni et al., 2006) ein wenig der durch CcpA induzierten Genexpression der im galaktosehaltigen Medium gewachsenen Pneumokokken (Carvalho et al., 2011). Da die Pneumokokken bei Oggionis Experimenten alle im gleichen reichhaltigen Medium gewachsen sind (Oggioni et al., 2006), können auch hier unterschiedliche Genexpressionsmuster nicht durch verschiedene Zucker bedingt sein.

Beim Wachstum auf der Agarplatte wachsen die Bakterien in mehreren kleinen Kolonien (persönliche Beobachtungen). Die Bakterien wachsen in den einzelnen Kolonien eng gehäuft zusammen und können vermutlich nur die Nährstoffe verwenden, die sich direkt in ihrer Umgebung befinden. Da Glukose den bevorzugten Zucker darstellt, wird dieser zuerst verstoffwechselt (Oggioni et al., 2006). Nach vollständiger Verstoffwechslung der Glukose, müssen andere Zucker, wie u.a. Galaktose, verwendet werden (Oggioni et al., 2006). Bei dem Wachstum auf Agar ist das Nährstoffangebot limitierter als in der Flüssigkultur, da die

Bakterien beim zuletzt genannten weniger stark zusammenwachsen und das Nährstoffangebot der kompletten Kultur verwenden können. Optimal ist dieses, wenn die Bakterien im Schüttler wachsen. Diese Ergebnisse und Vermutungen können nicht vollständig klären, weshalb D39 *chip^{T700}licB31* in Flüssigkultur gewachsen, ein deutlich besseres immunstimulatorisches Potential aufweist als bei Wachstum auf Blutagar (Abb. 17).

Die offensichtlichste Erklärung ist, dass durch die verminderte *cps2*-mRNA-Expression der Bakterien in Flüssigkultur gegenüber Agar, die Kapselverankerung lockerer ist und damit die Immunerkennung durch das Immunsystem erleichtert wird. Gegen diese Hypothese spricht, dass sich das immunstimulatorische Verhalten von allen Mutanten in Flüssigkultur verbessern müsste. Dies ist aber aus den Daten (Abb. 17) nicht zu entnehmen. Es scheint sogar so, dass es bei den auf Agar gewachsenen Pneumokokken leicht verbessert ist. Außerdem zeigt D39 *chip^{T700}licB31* eine dicke Kapsel beim Wachstum in Flüssigkultur (Abb. 14b) und ein schleimiges Aussehen bei Wachstum auf dem Agar (persönliche Beobachtungen). In welchem Maße das Kapselaussehen von D39 *chip^{T700}licB31* sich aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen geändert hat, lässt sich an den vorliegenden Daten nicht erkennen. Eine besondere Beobachtung bei D39 *chip^{T700}licB31* ist, dass er in Flüssigkultur am schnellsten gewachsen ist und im Vergleich zu seiner Vorläufermutante D39 *chip^{T700}* weder beim Wachstum auf Agar noch in Flüssigkultur Wachstumsprobleme aufweist (Abb. 18).

Des Weiteren zeigt die Wachstumskurve in Abb. 18, dass die Pneumokokkenmutanten alle der gleichen Wachstumskurve folgen und nach 6 bis 8 Stunden ein von der optischen Dichte ähnliches stationäres Stadium erreicht haben. Aus Kapitel 3.8 und Abb. 18 kann man entnehmen, dass es zwei Gruppen bei der Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase gibt. Die Gruppe mit dem schnellen Wachstum führt D39 *chip^{T700}licB31* an und bei dem langsamen Wachstum findet sich seine Vorläufermutante D39 *chip^{T700}* wieder. Die zusätzliche Mutation im *licB*-Gen hat bei D39 *chip^{T700}licB31* dazu geführt, dass es schneller wächst (Abb. 18), eine dickere Kapsel exprimiert (Abb. 14b), im Gegensatz zu D39 *chip^{T700}* auch keine weiteren Einschlüsse in der Zelle zeigt (Abb. 14b) und - wie erwartet - durch das Fehlen der CBP in langen Ketten wächst (Abb. 7a). Dass die Absterbephase bei allen Bakterien erst nach 24 h einsetzt und

nicht - wie erwartet - schon früher deutlich abnimmt, könnte durch einen Messfehler bedingt sein. Da die Pneumokokken zum Wachstum nur in den Inkubator gestellt wurden und nicht in den Schüttler, musste vor jeder Messung die Bakterienflüssigkultur aufgeschüttelt werden. Dabei wurden auch Reste von lysierten Bakterien mit aufgewirbelt und diese hielten die optische Dichte lange hoch.

Um die Frage nach dem unterschiedlichen immunstimulatorischen Potential von D39 *chip*^{T700}*licB31* in den verschiedenen Wachstumsbedingungen zu klären, kommt noch erschwerend hinzu, dass in den zugrundeliegenden Experimenten, D39 *chip*^{T700}*licB31* in unterschiedlichen Nährmedien gewachsen ist. Als Agar wurde Columbia-Blutagar und als Flüssigkultur TSB verwendet (vgl. Kapitel 2.2.1.1). Bei beiden handelt es sich um reichhaltige Nährmedien (Becton Dickinson GmbH, April 2013; BD Diagnostic Systems, Februar 2008) und da die Nährstoffzusammensetzung nicht den entscheidenden Unterschied in Oggionis Experimenten zu machen schien (Oggioni et al., 2006), sondern eher die Konsistenz, kann dieser Aspekt vermutlich vernachlässigt werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Wachstumsbedingungen sind die unterschiedlichen Wachstumszeiten. Auf Columbia-Blutagar sind die Pneumokokken 24 h gewachsen und in TSB-Flüssigkultur nur 8 h (siehe Kapitel 2.2.1.1). Das Bakterienwachstum auf Columbia-Blutagar musste mindestens 24 h dauern, da ansonsten nicht genügend große Kolonien von der Platte zu entnehmen waren, um eine ausreichende optische Dichte im Photometer für Stimulationsexperimente zu erzielen (persönliche Beobachtungen). Durch das längere Wachstum auf Columbia-Blutagar gegenüber der Flüssigkultur könnte der Anteil der lebendigen Bakterien beeinträchtigt sein und somit das immunstimulatorische Verhalten in unterschiedlichem Maße beeinflussen. Zur Bestimmung der Lebendigkeit wurde das Vitalitätsfärbekit von BD mit den Farbstoffen Propidiumiodid und Thiazolorange verwendet.

Der grüne Farbstoff Thiazolorange, als DNA/RNA-Farbstoff, färbt alle Bakterien (Grimberg et al., 2008) und das rote Propidiumiodid ist nur permeabel für nicht intakte Zellen und färbt somit die toten Zellen (BD Biosciences, Mai 2015). Die Auswertung der Vitalitätsfärbung erfolgte nicht, wie in dem Kit angegeben mit dem Durchflusszytometer sondern mit dem Fluoreszenzmikroskop. Bei der Durchflusszytometrie hätte vermutlich das Wachstum der Bakterien in langen Ketten durch eine Signalüberlagerung die Ergebnisse unbrauchbar

gemacht. Die Farbstoffe für die Durchflusszytometrie sind vermutlich weniger lichtstabil, da bei der Durchflusszytometrie nur eine kurze Belichtungszeit notwendig ist. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden die einzelnen Bildabschnitte längere Zeit mit Fluoreszenzlicht durchleuchtet und die Farbstoffe verblassen. Dieses sollte allerdings bei der Auswertung unproblematisch sein, da beide Farbstoffe verblassen und immer noch ein deutlicher Unterschied zwischen den rot und grün gefärbten Bakterien zu erkennen war.

Beim Betrachten der Bilder entstand der Eindruck, dass D39 Δcps weniger lebendig ist, als die anderen Mutanten. Dieser Eindruck ließ sich nach der Bildauswertung mit zwei unterschiedlichen Methoden nicht bestätigen. Hierfür wurde die auf Mathematica und ImageJ basierende Schwellwertanalyse und die CellProfiler basierte Clusteranalyse verwendet. Für die Problemdiskussion der programm-basierten Auswertung sei auf das Kapitel 2.2.1.2 verwiesen. Beide Auswertungsmethoden lieferten keine signifikanten Unterschiede in der Lebendigkeit. Ein Fehler der bereits während der Färbung aufgetreten sein könnte ist, dass D39 Δcps und D39 $\Delta cps\Delta lgt$ durch das Fehlen der Kapsel deutlich permeabler für Propidiumiodid sind und damit v.a. beim Wachstum in TSB subjektiv weniger lebendig wirken. Bei D39 $cho\tilde{licA64}$ ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt zu beobachten. Er wächst aber auf Columbia-Blutagar in deutlich kürzeren Ketten als in TSB (Kapitel 3.2; Daten nicht dargestellt).

Das Wachstum in kurzen Ketten ist vermutlich nicht für das sehr gute immunstimulatorische Potential von D39 $cho\tilde{licA64}$ verantwortlich, da wie in Kapitel 4.2.3 erläutert, das immunstimulatorische Potential eher mit zunehmender Kettenlänge zunimmt. Mit dieser Methode konnte die Hypothese der unterschiedlichen Lebendigkeit der Bakterien unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen nicht bestätigt werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass diese Erklärung aufgrund der hohen Fehleranfälligkeit nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Die wahrscheinlichste Erklärung für das unterschiedliche Verhalten unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ist, dass durch das schnelle und enge Wachstum von D39 $chip^{T700}licB31$ auf dem Agar eine bessere Interaktion zwischen den Bakterien stattfindet, wodurch sich die Expression von Virulenzgenen verstärkt, die wiederum die Immunantwort auf die Bakterien erschwert. Dass ein Signalaustausch zwischen Bakterien ab einer bestimmten Zelldichte zustande kommt, kann anhand des

Kompetenzsystems, das durch das Quorum-sensing-Peptid induziert wird, beobachtet werden (Oggioni et al., 2006). Die koordinierte Kompetenzentwicklung findet v.a. bei Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase statt (Oggioni et al., 2006). Die Quorum-sensing-Kommunikation dient der Regulation von physiologischen Prozessen, u.a. der Virulenz, Kompetenz, Beweglichkeit und Biofilmbildung (Miller und Bassler, 2001). Somit scheinen neben dem Nährstoffangebot auch die bakteriellen Interaktionen an der Regulation der Virulenzgene beteiligt zu sein.

4.2.3 Einfluss von CBP der Pneumokokken auf das Immunsystem

Die zur Einleitung des Kapitels 4.2 gestellte Frage, ob die signifikant höhere TNF Produktion der Monozyten auf *S. pneumoniae* D39 *cho⁻licA64* im Vergleich zu D39 Δ *cps* allein auf das Fehlen der CBP zurückzuführen ist, wurde auf die Kapselverankerung und die Genregulation während der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen hin untersucht. Auch wurde eine zweite Mutante ohne CBP, D39 *chip^{T700}licB31*, verwendet und mit D39 *cho⁻licA64* verglichen.

Um den alleinigen Einfluss der CBP zu überprüfen, wurde der TSB-Flüssigkultur 2 % Cholinchlorid hinzugefügt. Cholinchlorid führt zum Lösen der CBP vom P-Cholin der Zellwand (Miyaji et al., 2015), sodass alle Pneumokokkenmutanten, die in TSB plus 2 % Cholinchlorid gewachsen sind, keine CBP mehr aufweisen sollten. Das Fehlen der CBP sollte dazu führen, dass die immunstimulatorischen Potentiale von D39 *cho⁻* und D39 *chip^{T700}* sich an die der Doppelmutanten D39 *cho⁻licA64* und D39 *chip^{T700}licB31* annähern. Die immunstimulatorische Aktivität von D39 *cho⁻* verbessert sich unter Cholinchlorideinwirkung deutlich, bleibt aber noch unter der von D39 *cho⁻licA64* (Abb. 16). Bei D39 *chip^{T700}* hat die Zugabe von 2 % Cholinchlorid in das Nährmedium kaum Änderungen bewirkt und die immunstimulatorische Aktivität von D39 *chip^{T700}licB31* ist leicht abgefallen (Abb. 16). Anhand des Wildtypes von *S. pneumoniae* D39 wird die immunstimulatorische Wirkung der CBP besonders deutlich. Hier steigt das immunstimulatorische Potential durch den Wegfall der CBP um das 4,6 fache (Abb. 16). Der Wegfall der CBP in D39 Δ *cps* zeigte eine Verdreifachung des immunstimulatorischen Potentials, das aber nicht das von D39 *cho⁻* und D39 *cho⁻licA64* überschreitet (Abb. 16).

Dies ist erstaunlich, denn durch das Fehlen der Kapsel und der CBP sollte es eigentlich dem von D39 *cho⁻licA64* entsprechen.

Um zu beweisen, dass die CBP durch das Cholinchlorid nicht mehr an die Pneumokokkenzellwand binden, wurde die Morphologie der Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Durch den Wegfall der CBP sollten alle Stämme nun in langen Ketten wachsen. In Abb. 7 sind die fluoreszenzmikroskopischen Bilder dargestellt. Alle Mutanten, die einen Zugewinn in ihrem immunstimulatorischen Potential bei Wachstum in TSB plus 2 % Cholinchlorid gegenüber dem Wachstum in TSB alleine erzielt haben, wachsen in langen Ketten. Weiterhin als Diplokokken wachsen somit nur D39 Δcps und D39 *chip^{T700}*. Das bessere immunstimulatorische Potential der in langen Ketten wachsenden Pneumokokken kann neben den fehlenden CBP auch durch eine bessere Phagozytose erklärt werden.

Pneumokokken, die an Epithelzellen adhärieren, wie bei der Kolonialisierung des Nasopharynx, wachsen in längeren Ketten, damit sie eine möglichst große Oberfläche für die Interaktion mit den Epithelzellen bieten (Rodriguez et al., 2012). Bei einer Sepsis wachsen Pneumokokken nur als Diplokokken, um möglichst wenig Angriffsfläche für das Immunsystem zu bieten (Rodriguez et al., 2012). Die Kettenlänge scheint auch abhängig von dem Umgebungsmilieu eine direkte Korrelation zur Kapselsynthese zu haben. In langen Ketten wachsende Pneumokokken sind eher im Nasopharynx und mit einer geringer ausgeprägten Kapsel zu finden. Stark bekapselte kurzkettige Pneumokokken befinden sich hingegen während der Sepsis in der Blutbahn oder im Liquor (Rodriguez et al., 2012).

Da D39 Δcps und D39 *chip^{T700}* auch nach Zugabe von Cholinchlorid nicht in langen Ketten wachsen, könnte es sein, dass die hohe Konzentration von Cholinchlorid die Bakterien schädigt und in ihrem Wachstum inhibiert. D39 Δcps ist durch ihre fehlende Kapsel möglicherweise weniger vor den Umwelteinflüssen geschützt. D39 *chip^{T700}* ist durch sein schlechtes Wachstumsverhalten (Abb. 18) und durch die Einschlüsse, die in den elektronenmikroskopischen Bildern sichtbar sind, ebenfalls anfälliger (Abb. 14b). Ein Hinweis auf eine die Lebendigkeit der Bakterien beeinflussende Wirkung von Cholinchlorid konnte anhand der oben beschriebenen Vitalitätsfärbung nicht gefunden werden. Lediglich ein durch Cholinchlorid erzeugtes unterschiedliches Ionenmilieu könnte Genregulationen und Wachstum beeinflussen.

Aus den vorherigen Erläuterungen lässt sich schließen, dass die CBP die Virulenz der Pneumokokken steigern. Besonders gut ist dieses am Wildtyp zu erkennen. Bei D39 Δcps und D39 *chip*^{T700} scheint die Bindung der CBP nicht vollständig aufgehoben zu sein, da durch das Wachstum als Diplokokken die autolytischen CBP vermutlich noch aktiv sind. Dadurch würde sich auch das verminderte immunstimulatorische Potential dieser Mutanten erklären lassen.

5. Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae ist der weltweit häufigste Erreger für ambulant erworbene Pneumonien und Verursacher der lebensbedrohlichen Sepsis und Meningitis, wovon besonders Kleinkinder, Senioren sowie Immunsupprimierte betroffen sind.

Die heute auf dem Markt befindlichen Impfstoffe gegen Pneumokokken richten sich gegen die Kapsel der Stämme, die die meisten Krankheiten hervorrufen. Aufgrund des derzeitigen Standes der Forschung ist es nicht möglich, einen Kapselimpfstoff gegen alle Pneumokokkenserotypen herzustellen, sodass an alternativen, kapselunabhängigen Impfstoffansätzen geforscht werden muss. Cholin-bindene Proteine (CBP), als bedeutende Virulenzfaktoren der Pneumokokken, wären eine mögliche Alternative zu den Kapselimpfstoffen.

Anhand von immunologischen Experimenten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die CBP als auch die Kapsel für die Virulenz der Pneumokokken von entscheidender Bedeutung sind. Für diese Experimente wurden Pneumokokkenmutanten verwendet, die eine Mutation im Cholinmetabolismus aufzeigen und somit entweder kein Cholin inkorporieren (D39 *chip*^{T700}*licB31*) oder phosphorylieren (D39 *cho*⁻*licA64*) können, sowie kapselfreie Mutanten.

Dabei scheint die Phosphorylierung von Cholin (*licA*) deutlich entscheidender zu sein als der Cholinimport (*licB*), da zwischen den beiden Mutanten starke Unterschiede im immunstimulatorischen Verhalten festgestellt werden konnten. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass die verwendete Mutante mit der fehlenden Phosphorylierungsmöglichkeit des Cholin (D39 *cho*⁻*licA64*) keine Kapsel zu verankern scheint, aber Kapselgene vorhanden sind. Dies könnte das bessere immunstimulatorische Verhalten dieser Mutante gegenüber der anderen Cholinmutante erklären.

Für die erfolgreiche Impfstoffforschung ist es wichtig, dass - neben der Kenntnis der immunmodulatorischen Eigenschaften der CBP - auch der molekulare Mechanismus der cholinvermittelten Suppression der proinflammatorischen Zytokinantwort bekannt ist. Ich konnte zeigen, dass an der cholinvermittelten Suppression der proinflammatorischen Zytokinantwort der Toll-like Rezeptor 2 keine Rolle spielt. Mit Hilfe der D39 Mutanten

cho⁻licA64 und *Δcps* konnte ich nachweisen, dass es Unterschiede in den Produktionswegen der beiden proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF gibt, da der gleiche Versuchsansatz signifikant unterschiedliche Ergebnisse erbrachte. In der Produktion von TNF scheinen CBP eine größere Rolle als bei der IL-1β Produktion einzunehmen.

Für die meisten Fragestellungen in der Literatur wurde nur eine Wachstumsbedingung oder nur ein Infektionsweg der Pneumokokken, z.B. intranasal oder intravenös, untersucht. Die immunstimulatorischen Experimente von Pneumokokken, die entweder in Flüssigkultur oder auf einer Agarplatte gewachsen sind, zeigten deutliche Unterschiede. Verantwortlich hierfür könnte die unterschiedliche Genexpression von Virulenzfaktoren durch Interaktionen der Bakterien oder eine unterschiedliche Nährstoffzusammensetzung der Umgebung sein.

Meine Experimente zeigen, dass der additive Effekt von Kapsel und CBP als Idee für die Impfstoffforschung weiter verfolgt werden sollte, da sich das immunstimulatorische Potential beim Fehlen beider Virulenzfaktoren potenziert. Fragen, die bei weiterer Forschung noch geklärt werden sollten, wären, ob *licA* als cholinphosphorylierendes Enzym für die Kapselverankerung verantwortlich ist, und somit durch eine *licA* Blockade diese beiden Virulenzfaktoren gleichzeitig blockiert werden können. Ebenfalls sollten bei den weiteren Forschungen mehrere Wachstumsbedingungen untersucht werden, um die Regulationsmechanismen weiter zu klären und Impfstoffe zu finden, die in allen Körperkompartimenten wirken.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau der Pneumokokken. Adaptiert nach McCullers und Tuomanen, 2001.	11
Abb. 2	Schematische Darstellung des Cholinmetabolismus. Adaptiert nach Eberhardt et al., 2009.....	14
Abb. 3	Darstellung der Wzy-abhängigen Typ 2 Kapselsynthese von <i>S. pneumoniae</i> . Adaptiert nach Yother, 2011.....	22
Abb. 4	Vitalitätsfärbung von <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten und dem Wildtyp.....	37
Abb. 5	PCRs zum Nachweis der <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutationen	50
Abb. 6	Nachweis von Phosphocholin in <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	51
Abb. 7	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung unterschiedlicher <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten.....	52
Abb. 8	FlowCytomix-Auswertung der im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Zytokine	54
Abb. 9	Monozyten stimuliert mit <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten.	54
Abb. 10	PBMCs stimuliert mit <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	55
Abb. 11	PBMCs stimuliert mit <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten (Darstellung der einzelnen Spender).....	56
Abb. 12	Unterschiede in der Immunantwort auf D39 <i>cho⁻licA64</i> und D39 <i>chip^{T700}licB31</i>	57
Abb. 13	Kapselagglutination der <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	58
Abb. 14	Kapseldarstellung der <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	60
Abb. 15	Die Cholinmutanten von <i>S. pneumoniae</i> D39	61
Abb. 16	Einfluss des Pneumokokkenwachstums in Cholinchlorid auf deren immunstimulatorisches Verhalten	62
Abb. 17	Einfluss der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf das immunstimulatorische Verhalten der Pneumokokkenmutanten	64
Abb. 18	Wachstumskurven der <i>S. pneumoniae</i> D39 Mutanten	65
Abb. 19	Die Rolle von TLR2 an der Pneumokokkenerkennung	66
Abb. 20	Entstehung der Kapsel- und Lipoproteinmutanten	68
Abb. 21	Prästimulationsexperimente der Monozyten mit LPS.....	69
Abb. 22	Einfluss von TNF α auf die Produktion von IL-1 β und IgM	71

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	PCR-Ansatz für 8 Proben	43
Tab. 2	Verwendete Primer	44
Tab. 3	Programm des Thermozyklers für die DreamTaq Polymerase	44
Tab. 4	Zusammensetzung für ein SDS-Gel	46
Tab. 5	Eigenschaften der unterschiedlichen humanen ELISA-Kits.....	48

7. Literaturverzeichnis

Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S, Henriques-Normark B. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular Microbiology* 2007; 3: 633–644

Bai X-H, Chen H-J, Jiang Y-L, Wen Z, Huang Y, Cheng W, Li Q, Qi L, Zhang J-R, Chen Y, Zhou C-Z. Structure of Pneumococcal Peptidoglycan Hydrolase LytB Reveals Insights into the Bacterial Cell Wall Remodeling and Pathogenesis*. *The Journal of biological chemistry* 2014; 34: 23403–23416

Bajaj M, Mamidyala SK, Zuegg J, Begg SL, Ween MP, Luo Z, Huang JX, McEwan AG, Kobe B, Paton JC, McDevitt CA, Cooper MA. Discovery of novel pneumococcal surface antigen A (PsaA) inhibitors using a fragment-based drug design approach. *ACS chemical biology* 2015; 6: 1511–1520

BD Biosciences. BD Cell Viability Kit. <http://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-6755.pdf> (Zugriffsdatum: 02.09.2016)

BD Diagnostic Systems. BD Tryptic Soy Broth (TSB). <http://www.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/ba/de-ba-257107.pdf> (Zugriffsdatum: 02.09.2016)

Becton Dickinson GmbH. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8609> (Zugriffsdatum: 02.09.2016)

Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology (Reading, England)* 2006; Pt 2: 295–303

Boersma MJ, Kuru E, Rittichier JT, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Winkler ME. Minimal Peptidoglycan (PG) Turnover in Wild-Type and PG Hydrolase and Cell Division Mutants of *Streptococcus pneumoniae* D39 Growing Planktonically and in Host-Relevant Biofilms. *Journal of Bacteriology* 2015; 21: 3472–3485

Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C. *Streptococcus Pneumoniae*. Burlington: Elsevier Science 2015

Callaway E. Hidden bonus from vaccination. *Nature* 2014; 7512: 14–15

Carpenter AE und Jones TR. CellProfiler cell image analysis software. <http://cellprofiler.org/manuals/current/> (Zugriffsdatum: 4.10.2016)

Carvalho SM, Kloosterman TG, Kuipers OP, Neves AR. CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PloS one* 2011; 10: e26707

Chen A, Mann B, Gao G, Heath R, King J, Maissoneuve J, Alderson M, Tate A, Hollingshead SK, Tweten RK, Briles DE, Tuomanen EI, Paton JC. Multivalent Pneumococcal Protein Vaccines Comprising Pneumolysoid with Epitopes/Fragments of CbpA and/or PspA Elicit Strong and Broad Protection. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2015; 10: 1079–1089

- Chimalapati S, Cohen JM, Camberlein E, MacDonald N, Durmort C, Vernet T, Hermans PWM, Mitchell T, Brown JS. Effects of deletion of the *Streptococcus pneumoniae* lipoprotein diacylglyceryl transferase gene *Igt* on ABC transporter function and on growth in vivo. *PLoS one* 2012; 7: e41393
- Damjanovic M, Kharat AS, Eberhardt A, Tomasz A, Vollmer W. The Essential *tacF* Gene Is Responsible for the Choline-Dependent Growth Phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2007; 19: 7105–7111
- Dave S, Carmicle S, Hammerschmidt S, Pangburn MK, McDaniel LS. Dual Roles of PspC, a Surface Protein of *Streptococcus pneumoniae*, in Binding Human Secretory IgA and Factor H. *The Journal of Immunology* 2004; 1: 471–477
- Denapaite D, Brückner R, Hakenbeck R, Vollmer W. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 2012; 3: 344–358
- Di Gioia M, Zanoni I. Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Molecular immunology* 2015; 2: 143–152
- Dittrich N, Berrocal-Almanza LC, Thada S, Goyal S, Slevogt H, Sumanlatha G, Hussain A, Sur S, Burkert S, Oh D-Y, Valluri V, Schumann RR, Conrad ML. Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2015; 3: 328–335
- Eberhardt A, Hoyland CN, Vollmer D, Bisle S, Cleverley RM, Johnsborg O, Havarstein LS, Lewis RJ, Vollmer W. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 2012; 3: 240–255
- Eberhardt A, Wu LJ, Errington J, Vollmer W, Veening J-W. Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Molecular microbiology* 2009; 2: 395–408
- EMA. 2017 European Medicines Agency - Find medicine - Synflorix. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000973/human_med_001071.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (Zugriffsdatum: 20.4.2017)
- Fröhling A, Schlüter O. Flow cytometric evaluation of physico-chemical impact on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology* 2015; 6: 939
- García P, González MP, García E, López R, García JL. *LytB*, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Molecular microbiology* 1999; 4: 1275-1281
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clinical microbiology reviews* 2015; 3: 871–899

- Giammarinaro P, Paton JC. Role of RegM, a Homologue of the Catabolite Repressor Protein CcpA, in the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2002; 10: 5454–5461
- Gisch N, Kohler T, Ulmer AJ, Müthing J, Pribyl T, Fischer K, Lindner B, Hammerschmidt S, Zähringer U. Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *The Journal of biological chemistry* 2013; 22: 15654–15667
- Grimberg BT, Erickson JJ, Sramkoski RM, Jacobberger JW, Zimmerman PA. Monitoring *Plasmodium falciparum* growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2008; 6: 546–554
- Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and immunity* 2005; 8: 4653–4667
- Henriques MX, Rodrigues T, Carido M, Ferreira L, Filipe SR. Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Molecular microbiology* 2011; 2: 515–534
- Hergott CB, Roche AM, Naidu NA, Mesaros C, Blair IA, Weiser JN. Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *The Journal of clinical investigation* 2015; 10: 3878–3890
- Hilmi D, Parcina M, Bode K, Ostrop J, Schuett S, Heeg K, Ziebuhr W, Sommerburg O, Bekeredjian-Ding I. Functional variation reflects intra-strain diversity of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the host-pathogen interaction. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2013; 2: 61–69
- Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and immunity* 2010; 2: 704–715
- Ibelgaufts H. 2013 TNF-alpha (Cytokines & Cells Encyclopedia - COPE). <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=TNF-alpha> (Zugriffsdatum: 22.11.2015)
- Jomaa M, Yuste J, Paton JC, Jones C, Dougan G, Brown JS. Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 2005; 10: 6852–6859
- Kharat AS, Denapaite D, Gehre F, Brückner R, Vollmer W, Hakenbeck R, Tomasz A. Different pathways of choline metabolism in two choline-independent strains of *Streptococcus pneumoniae* and their impact on virulence. *Journal of Bacteriology* 2008; 17: 5907–5914

- Kharat AS, Tomasz A. Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Molecular microbiology* 2006; 1: 93-107
- Klugman KP. Vaccination: a novel approach to reduce antibiotic resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004; 5: 649–651
- Knapp S, Wieland CW, van 't VC, Takeuchi O, Akira S, Florquin S, van der Poll T. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2004; 5: 3132–3138
- Koedel U, Angele B, Rupprecht T, Wagner H, Roggenkamp A, Pfister H-W, Kirschning CJ. Toll-Like Receptor 2 Participates in Mediation of Immune Response in Experimental Pneumococcal Meningitis. *J Immunol* 2003; 1: 438–444
- Kohler S, Voss F, Gomez Mejia A, Brown JS, Hammerschmidt S. Pneumococcal lipoproteins involved in bacterial fitness, virulence, and immune evasion. *FEBS letters* 2016; 21: 3820–3839
- Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cellular Microbiology* 2012; 4: 460–466
- Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity* 2011; 2: 548–561
- Kugelberg E. B cell memory: Making sense in humans. *Nature reviews. Immunology* 2015; 3: 133
- Lanie JA, Ng W-L, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, Tettelin H, Glass JI, Winkler ME. Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *Journal of Bacteriology* 2007; 1: 38–51
- Lees J, Gladstone RA. R-M systems go on the offensive. *Nature reviews. Microbiology* 2015; 3: 131
- Lin H, Peng Y, Lin Z, Zhang S, Guo Y. Development of a conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease based on capsular polysaccharides coupled with PspA/family 1 protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 2015; 83-84: 35–40
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 2: 145–151
- Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 4: 1966–1971

- Malpica N, Solórzano CO de, Vaquero JJ, Santos A, Vallcorba I, García-Sagredo JM, del Pozo F. Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. *Cytometry* 1997; 4: 289–297
- Manso AS, Chai MH, Atack JM, Furi L, Ste Croix M de, Haigh R, Trappetti C, Ogunniyi AD, Shewell LK, Boitano M, Clark TA, Korlach J, Blades M, Mirkes E, Gorban AN, Paton JC, Jennings MP, Oggioni MR. A random six-phase switch regulates pneumococcal virulence via global epigenetic changes. *Nature communications* 2014; 5: 5055
- Marchant A, Goldman M. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clinical & Experimental Immunology* 2005; 141: 10-18
- Marshall JE, Faraj BHA, Gingras AR, Lonnen R, Sheikh MA, El-Mezgueldi M, Moody PCE, Andrew PW, Wallis R. The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex. *Scientific reports* 2015; 5: 13293
- McCullers JA, Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2001; 6: 887- 889
- Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Ronnlund D, Blom H, Widengren J, Normark S, Henriques-Normark B. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry* 2012; 14: 11018–11029
- Mellroth P, Sandalova T, Kikhney A, Vilaplana F, Heseck D, Lee M, Mobashery S, Normark S, Svergun D, Henriques-Normark B, Achour A. Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 2014; 1: e01120-13
- Meyer F, Beucher S. Morphological segmentation. *Journal of Visual Communication and Image Representation* 1990; 1: 21–46
- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology* 2001; 55: 165–199
- Mittal SK, Roche PA. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Current opinion in immunology* 2015; 34: 22–27
- Miyaji EN, Vadesilho CFM, Oliveira MLS, Zelanis A, Briles DE, Ho PL. Evaluation of a vaccine formulation against *Streptococcus pneumoniae* based on choline-binding proteins. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2015; 2: 213–220
- Moffitt K, Howard A, Martin S, Cheung E, Herd M, Basset A, Malley R. T(H)17-Mediated Protection against Pneumococcal Carriage by a Whole-Cell Vaccine Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Surface Lipoproteins. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2015; 8: 909–916

Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *Journal of leukocyte biology* 2006; 2: 267–277

Morales M, Martin-Galiano AJ, Domenech M, Garcia E. Insights into the Evolutionary Relationships of LytA Autolysin and Ply Pneumolysin-Like Genes in *Streptococcus pneumoniae* and Related Streptococci. *Genome biology and evolution* 2015; 9: 2747–2761

Moreno AT, Oliveira MLS, Ho PL, Vadesilho CFM, Palma GMP, Ferreira JMC, Ferreira DM, Santos SR, Martinez MB, Miyaji EN. Cross-reactivity of antipneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2012; 4: 499–507

Mukerji R, Mirza S, Roche AM, Widener RW, Croney CM, Rhee D-K, Weiser JN, Szalai AJ, Briles DE. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2012; 11: 5327–5335

Musher DM. 2015 Pneumococcal vaccination in adults. http://www.uptodate.com/contents/pneumococcal-vaccination-in-adults?source=search_result&search=S.pneumoniae&selectedTitle=3%7E150 (Zugriffsdatum: 17.10.2015)

Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance. *Infection and immunity* 2006; 1: 83–90

Nguyen CT, Kim E-H, Luong TT, Pyo S, Rhee D-K. TLR4 mediates pneumolysin-induced ATF3 expression through the JNK/p38 pathway in *Streptococcus pneumoniae*-infected RAW 264.7 cells. *Molecules and cells* 2015; 1: 58–64

Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, Cluzel C, Morlot C, Noirot-Gros M-F, Guiral S, Lavergne J-P, Veening J-W, Grangeasse C. Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS genetics* 2015; 9: e1005518

Oggioni MR, Trappetti C, Kadioglu A, Cassone M, Iannelli F, Ricci S, Andrew PW, Pozzi G. Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Molecular microbiology* 2006; 5: 1196–1210

ORTIZ DE SOLORZANO C, GARCIA RODRIGUEZ E, JONES A, PINKEL D, GRAY JW, SUDAR D, LOCKETT SJ. Segmentation of confocal microscope images of cell nuclei in thick tissue sections. *J Microsc* 1999; 3: 212–226

- Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of clinical microbiology* 2006; 1: 124–131
- Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015; 1: a016246
- Panelius J, Meri S. Complement System in Dermatological Diseases – Fire Under the Skin. *Frontiers in Medicine* 2015; 2: 1-10
- Patel SN, Serghides L, Smith TG, Febbraio M, Silverstein RL, Kurtz TW, Pravenec M, Kain KC. CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages. *The Journal of infectious diseases* 2004; 2: 204–213
- PEI. 2017 PEI Liste zugelassener Impfstoffe gegen Pneumokokken. <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/pneumokokken/pneumokokken-node.html> (20.04.2017)
- Polonskaya Z, Deng S, Sarkar A, Kain L, Comellas-Aragones M, McKay CS, Kaczanowska K, Holt M, McBride R, Palomo V, Self KM, Taylor S, Irimia A, Mehta SR, Dan JM, Brigger M, Crotty S, Schoenberger SP, Paulson JC, Wilson IA, Savage PB, Finn MG, Teyton L. T cells control the generation of nanomolar-affinity anti-glycan antibodies. *The Journal of clinical investigation* 2017; 4: 1491–1504
- Pribyl T, Moche M, Dreisbach A, Bijlsma JJE, Saleh M, Abdullah MR, Hecker M, van Dijk JM, Becher D, Hammerschmidt S. Influence of impaired lipoprotein biogenesis on surface and exoproteome of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of proteome research* 2014; 2: 650–667
- Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. Nasopharyngeal Colonization and Invasive Disease Are Enhanced by the Cell Wall Hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS ONE* 2011; 8: e23626
- Ramos-Sevillano E, Urzainqui A, Campuzano S, Moscoso M, González-Camacho F, Domenech M, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Madrid F, Brown JS, García E, Yuste J. Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infection and immunity* 2015; 2: 591–603
- Reinert RR. 2005 Resistenzsituation bei Pneumokokken und A-Streptokokken. http://www.p-e-g.org/archiv_tmp/jahrestagung_20/symp2/abs_reinert.htm (Zugriffsdatum: 03.10.2016)
- Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch U-K, Hammerschmidt S, Nau R. Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infection and immunity* 2010; 2: 865–871

Rico-Lastres P, Díez-Martínez R, Iglesias-Bexiga M, Bustamante N, Aldridge C, Heseck D, Lee M, Mobashery S, Gray J, Vollmer W, García P, Menéndez M. Substrate recognition and catalysis by LytB, a pneumococcal peptidoglycan hydrolase involved in virulence. *Scientific reports* 2015; 5: 16198

Robert Koch-Institut. 2014 RKI - Pneumoweb-Sentinel. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Sentinel/Pneumoweb/Pneumoweb_node.html (Zugriffsdatum: 13.12.2015)

Rodriguez JL, Dalia AB, Weiser JN. Increased chain length promotes pneumococcal adherence and colonization. *Infection and immunity* 2012; 10: 3454–3459

Roux A de, Schmöle-Thoma B, Schmöele-Thoma B, Siber GR, Hackell JG, Kuhnke A, Ahlers N, Baker SA, Razmpour A, Emini EA, Fernsten PD, Gruber WC, Lockhart S, Burkhardt O, Welte T, Lode HM. Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; 7: 1015–1023

Sandalova T, Lee M, Henriques-Normark B, Heseck D, Mobashery S, Mellroth P, Achour A. The crystal structure of the major pneumococcal autolysin LytA in complex with a large peptidoglycan fragment reveals the pivotal role of glycans for lytic activity. *Molecular microbiology* 2016; 101: 954-967

Schumann B, Hahm HS, Parameswarappa SG, Reppe K, Wahlbrink A, Govindan S, Kaplonek P, Pirofski L-A, Witzgenrath M, Anish C, Pereira CL, Seeberger PH. A semisynthetic *Streptococcus pneumoniae* serotype 8 glycoconjugate vaccine. *Science translational medicine* 2017; 9: eaaf5347

Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infection and immunity* 2004; 9: 5031–5040

Sharif O, Matt U, Saluzzo S, Lakovits K, Haslinger I, Furtner T, Doninger B, Knapp S. The scavenger receptor CD36 downmodulates the early inflammatory response while enhancing bacterial phagocytosis during pneumococcal pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 11: 5640–5648

Sovershaev MA, Egorina EM, Gruber FX, Olsen JO, Osterud B. High tissue factor-expressing human monocytes carry low surface CD36: application to intersubject variability. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007; 12: 2453–2460

STIKO. 2015 Epidemiologisches Bulletin. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/34_15.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 17.10.2015)

- Swetha RG, Sekar DKK, Devi ED, Ahmed ZZ, Ramaiah S, Anbarasu A, Sekar K. Streptococcus pneumoniae Genome Database (SPGDB): a database for strain specific comparative analysis of Streptococcus pneumoniae genes and proteins. *Genomics* 2014; 6 Pt B: 582–586
- Terrasse R, Amoroso A, Vernet T, Di Guilmi AM. Streptococcus pneumoniae GAPDH Is Released by Cell Lysis and Interacts with Peptidoglycan. *PloS one* 2015; 4: e0125377
- Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, Lapp T, Cohen J, Camberlein E, Stafford S, Periselneris J, Aldridge C, Vollmer W, Picard C, Casanova J-L, Noursadeghi M, Brown J. TLR-mediated inflammatory responses to Streptococcus pneumoniae are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2014; 7: 3736–3745
- Tostes RO, Rodrigues TC, da Silva JB, Schanoski AS, Oliveira MLS, Miyaji EN. Protection Elicited by Nasal Immunization with Recombinant Pneumococcal Surface Protein A (rPspA) Adjuvanted with Whole-Cell Pertussis Vaccine (wP) against Co-Colonization of Mice with Streptococcus pneumoniae. *PloS one* 2017; 1: e0170157
- Toumanen EI. 2015 Microbiology and pathogenesis of Streptococcus pneumoniae. http://www.uptodate.com/contents/microbiology-and-pathogenesis-of-streptococcus-pneumoniae?source=search_result&search=Mocrobiology+and+pathogenesis+of+S.pneumoniae&selectedTitle=1%7E150 (Zugriffsdatum: 18.10.2015)
- Tuomanen EI. 2015 Pneumococcal (Streptococcus pneumoniae) conjugate vaccines in children. http://www.uptodate.com/contents/pneumococcal-streptococcus-pneumoniae-conjugate-vaccines-in-children?source=search_result&search=s+pneumoniae&selectedTitle=8%7E150 (Zugriffsdatum: 18.10.2015)
- Vashishta M, Khan N, Mehto S, Sehgal D, Natarajan K. Pneumococcal Surface Protein A (PspA) Regulates Programmed Death Ligand 1 Expression on Dendritic Cells in a Toll-Like Receptor 2 and Calcium Dependent Manner. *PloS one* 2015; 7: e0133601
- Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 2015; 2: 318–326
- Wählby C, Sintorn I-M, Erlandsson F, Borgefors G, Bengtsson E. Combining intensity, edge and shape information for 2D and 3D segmentation of cell nuclei in tissue sections. *Journal of microscopy* 2004; Pt 1: 67–76
- Waller T, Kesper L, Hirschfeld J, Dommisch H, Kölpin J, Oldenburg J, Uebele J, Hoerauf A, Deschner J, Jepsen S, Bekeredjian-Ding I. Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Induce Selective Tumor Necrosis Factor Tolerance in a Toll-Like Receptor 4- and mTOR-Dependent Manner. *Infect. Immun.* 2016; 4: 1194–1204

- Wang L, Jiang Y-L, Zhang J-R, Zhou C-Z, Chen Y. Structural and enzymatic characterization of the choline kinase LicA from *Streptococcus pneumoniae*. *PloS one* 2015; 3: e0120467
- Watkins ER, Penman BS, Lourenço J, Buckee CO, Maiden MCJ, Gupta S. Vaccination Drives Changes in Metabolic and Virulence Profiles of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS pathogens* 2015; 7: e1005034
- Wen Z, Liu Y, Qu F, Zhang J-R. Allelic Variation of the Capsule Promoter Diversifies Encapsulation and Virulence In *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific reports* 2016; 6: 30176
- Wen Z, Sertil O, Cheng Y, Zhang S, Liu X, Wang W-C, Zhang J-R. Sequence elements upstream of the core promoter are necessary for full transcription of the capsule gene operon in *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infection and immunity* 2015; 5: 1957–1972
- Willenborg J, Fulde M, Greeff A de, Rohde M, Smith HE, Valentin-Weigand P, Goethe R. Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiology (Reading, England)* 2011; Pt 6: 1823–1833
- Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2011; 1: 434–440
- World Health Organization. 2014 Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1741841> (Zugriffsdatum: 13.12.2015)
- Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annual review of microbiology* 2011; 6: 563–581
- Young NM, Foote SJ, Wakarchuk WW. Review of phosphocholine substituents on bacterial pathogen glycans: synthesis, structures and interactions with host proteins. *Molecular immunology* 2013; 4: 563–573
- Zheng JJ, Sinha D, Wayne KJ, Winkler ME. Physiological Roles of the Dual Phosphate Transporter Systems in Low and High Phosphate Conditions and in Capsule Maintenance of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2016; 6: 1-17

8. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding, die mir mit dem Thema meiner Dissertation ermöglicht hat, meinem Interesse an Bakterien und deren Interaktion mit dem menschlichen Organismus nachzugehen. Durch Ihre hervorragende Betreuung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft konnte die Arbeit überhaupt erst gelingen.

Ein weiterer Dank gebührt meiner Arbeitsgruppe sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn, die mir bei allen Fragen zu Methoden weitergeholfen haben und stets mit guten Ratschlägen zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Julia Uebele und Frau Dr. Josefine Hirschfeld, die immer mitgedacht und mich in meinem Projekt gut betreut haben.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Doktorandenvorgängerin Frau Dr. Maria Miranda-Gracia. Ihre Vordaten ermöglichten mir einen optimalen Einstieg in mein experimentelles Arbeiten.

Großer Dank gebührt auch den Mitarbeitern des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen, besonders Herrn Dr. Klaus Boller und Frau Regina Eberle, die mir bei allen Fragen rund um die Mikroskopie zur Seite standen und mich bei der Elektronenmikroskopie tatkräftig unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt in Greifswald, Herrn Prof. Dr. Alexander Tomasz in New York und Herrn Prof. Dr. Waldemar Vollmer in Newcastle für das freundliche zur Verfügungstellen der Pneumokokkenmutanten.

Bei dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für Ihre Unterstützung und Ihr Verständnis bedanken.