

IMMUNSUPPRESSIVE FUNKTIONEN VON INTERLEUKIN-37 (IL-37)  
IN MAKROPHAGEN BEI INFEKTIONEN MIT *STREPTOCOCCUS*  
*PNEUMONIAE* UND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Maximilian Wilsdorf**  
**geboren am 15.7.1994 in Halle (Saale)**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. med. Hortense Slevogt, Jena**
- 2. Apl. Prof. Dr. Ignacio Rubio, Jena**
- 3. Prof. Dr. Ildiko Dunay, Magdeburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 1.3.2022**

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	3
3	Einleitung	5
3.1	Bakterielle Infektionen	5
3.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
3.1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
3.2.	Die unspezifische Immunreaktion auf bakterielle Erreger	8
3.3	Spezielle Rolle der Monozyten und Makrophagen während der Entzündungsreaktion	9
3.4	Phasen der Makrophagenantwort	10
3.4.1	Proinflammationsreaktion von Makrophagen	11
3.4.2	Resolution der Entzündungsreaktion und Toleranz am Beispiel der Makrophagen	12
3.4.3	Toleranz am Beispiel Sepsis	13
3.5	Interleukin-37	14
3.5.1	Entdeckung und Wirkung	14
3.5.2	Synthese, Aktivierung und intrazelluläre Effekte von IL-37	16
3.5.3	Extrazelluläre Wirkmechanismen von IL-37	16
3.5.4	Die Rolle von IL-37 bei <i>S. pneumoniae</i> - und <i>S. aureus</i> -Infektionen	17
4	Ziele der Arbeit	18
5	Methodik	19
5.1	Geräte und Materialien	19
5.1.1	Laborgeräte	19
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
5.1.3	Kits und Assays	21
5.1.4	Software und Datenbanken	22
5.1.5	Puffer und Lösungen	22
5.1.6	Antikörper	24
5.2	Zellkultur	25
5.2.1	Zelllinie	25
5.2.2	Kulturbedingungen	25
5.2.3	Kryokonservierung der RAW264.7-Zellen	25
5.2.4	Auftauen der RAW 264.7-Zellen	25
5.3	Transfektion der RAW 264.7-Zellen	26
5.3.1	Der Vektor	26
5.3.2	Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i>	26
5.3.3	DNA-Isolation	27
5.3.4	Restriktionsendonuklease-Verdau	27

5.3.5	Transfektion der RAW 264.7-Zellen	28
5.4	Zellstimulation	28
5.4.1	Kultivierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
5.4.2	Kultivierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	29
5.4.3	Stimulationsschema für die qPCR-Analyse der Toleranzinduktion	29
5.4.4	Stimulationsschema für die ELISA-Analyse der Toleranzinduktion	30
5.5	Molekularbiologische Methoden	30
5.5.1	RNA-Isolation	30
5.5.2	cDNA-Synthese	30
5.5.3	Semiquantitative PCR	31
5.5.4	Agarose Gelelektrophorese	32
5.5.5	quantitative PCR (qPCR)	33
5.5.6	Primer-Design	34
5.5.7	Transkriptomanalyse / Next-Generation-Sequencing (NGS): RNA-AmpliSeq	36
5.6	Proteinbiochemische Methoden	38
5.6.1	Solubilisierung der RAW 264.7-Zellen	38
5.6.2	Immunpräzipitation IL-37	39
5.6.3	Bestimmung der Proteinmenge	39
5.6.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
5.6.5	Western Blot	40
5.6.6	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	41
5.6.7	Zytotoxizitätsanalyse	42
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
6.1.	Expression des humanen IL-37B in murinen RAW 264.7 Zellen	43
6.1.1	Kontrolle der verwendeten Plasmide	43
6.2	Charakterisierung der IL37B-Expression nach TLR-Aktivierung in RAW267.4 -Zellen	45
6.2.1	Charakterisierung der transfizierten Zelllinien RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37	45
6.2.2	Expressionsanalyse von inflammatorischen Markern nach Stimulation der RAW-Zellen mit <i>S. pneumoniae D39 wt</i> bzw. <i>S. aureus</i>	48
6.2.3	Induktion der proinflammatorischen Antwort in Abhängigkeit von der MOI	49
6.3	Toleranzinduktion durch <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. aureus</i>	50
6.3.1	Die proinflammatorische Antwort und Toleranzinduktion in RAW-Zellen bei Stimulation mit bekapselten und unbekapselten <i>S. pneumoniae D39</i>	50
6.3.2	Vergleich der Toleranzinduktion nach <i>S. pneumoniae</i> - und <i>S. aureus</i> -Stimulation in RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen	53
6.3.2.1	Toleranzinduktion auf Proteinebene	53
6.3.2.2	Toleranzinduktion auf Genebene	55
6.4	Transkriptomanalyse	56
6.4.1	Identifizierung tolerisierbarer Gene mittels RNA-AmpliSeq	57
6.4.2	Identifizierung nicht-tolerisierbarer Gene mittels RNA-AmpliSeq	63
6.4.2	Durch IL-37B veränderte Genexpression	65

6.5 Verifikation der RNA-AmpliSeq Ergebnisse durch qPCR	67
6.5.1 Ccl22 ist tolerierbar	67
6.5.2 Mmp9 und Slamf1 werden unter Anwesenheit von IL-37B vermindert exprimiert	68
6.5.3 IL-37B Effekte auf die Gdf15- und Clec2d-Expression	70
6.5.4 IL-27-Expression in der qPCR	71
6.5.5 Kein Effekt von IL-37B auf Pdc1-Expression	72
<b>7 Diskussion</b>	<b>74</b>
7.1 IL-37B-Expression in RAW-264.7-Zellen	75
7.2 IL-37B zeigt nach Stimulation von RAW264.7-Zellen mit <i>S. pneumoniae</i> oder <i>S. aureus</i> nur geringe Auswirkungen auf die Proinflammation	76
7.3 Toleranzinduktion in RAW264.7-Zellen durch <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. aureus</i> am Beispiel der TNF $\alpha$ -Expression	77
7.4 Toleranzinduktion in RAW264.7-Zellen durch <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. aureus</i> ermittelt durch RNA-AmpliSeq	78
7.5 Veränderungen der Genexpression in RAW264.7-Zellen durch IL-37B bleiben ohne Einfluss auf den generellen toleranten Zustand	80
<b>8 Schlussfolgerung</b>	<b>84</b>
<b>9 Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>95</b>
10.1 Tabellenverzeichnis	95
10.2 Abbildungsverzeichnis	96
10.3 Danksagung	98
10.4 Ehrenwörtliche Erklärung	99

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest	Destilliertes Wasser (lat.: aqua destillata)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	engl.: complementary/copy DNA
CFU	Kolonie-bildende Einheit (engl.: colony forming units)
CT	Zyklus-Schwellenwert (engl.: cycle threshold)
DMEM	engl.: Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
FC	Fold-Change
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)
G-CSF	engl.: granulocyte-colony stimulating factor
HBSM	HEPES-gepufferte Salzlösung mit Magnesium (engl.: HEPES buffered saline with magnesium)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl.: horse raddish peroxidase)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IRES	engl.: internal ribosome entry site
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LytA	Autolysin A
MALP-2	engl.: macrophage-activating lipopeptide-2

MDP	Muramyldipeptid
MOI	Multiplizität der Infektion (engl.: multiplicity of infection)
mRNA	Boten RNA (engl.: messenger RNA)
Nf-κB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NT-Gen	nicht tolerisierbares Gen
OD	Optische Dichte
Pam3CSK/P3C	Pam3Cys-Ser-(Lys) <sub>4</sub>
PAMPs	engl.: pathogen associated molecular patterns
PBMC	engl.: peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PRR	engl.: pattern recognition receptor
PspA	engl.: pneumococcal surface protein A
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RPKM	engl. Reads per kilobase per million mapped reads
RT	Reverse Transkriptase / Reverse Transkription
RT-	Negativkontrolle in der RT zur Kontrolle des DNA-Verdaus während der RNA-Reinigung
<i>S. aureus</i> / <i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i> / <i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SIGIRR	engl.: Single Ig IL-1-related Receptor
SIRS	engl.: systemic inflammatory response syndrome
T-Gen:	tolerisierbares Gen
THY	Todd Hewitt Yeast
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
WT	Wildtyp

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Nach primärem Kontakt angeborener Immunzellen mit Endotoxinen kommt es bei einer darauffolgenden erneuten Exposition zum Phänomen der Endotoxin-Toleranz. Hierbei handelt es sich um eine verminderte Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden trotz erfolgter Endotoxin-Bindung. Klinisch kommt es dadurch im Rahmen bakterieller Infektionen zu einer Dysregulation des Immunsystems und unter Umständen auch zu einer Immunsuppression und damit einhergehend zu einer erhöhten Mortalität. Zur Toleranzentwicklung in Makrophagen bei Gram-positiven *S. aureus*- oder *S. pneumoniae*-Infektionen – insbesondere zu molekulargenetischen Veränderungen in diesem Stadium - gibt es bislang jedoch nur wenige Daten.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts verdichteten sich die Hinweise, dass IL-37 intrazellulär und extrazellulär als ein Suppressor des angeborenen und erworbenen Immunsystems fungiert (Nold et al. 2010; Boraschii et al. 2011). Dabei wird das Protein verstärkt in Makrophagen oder anderen Immunzellen exprimiert, nachdem diese Kontakt zum TLR4-Agonisten LPS oder TLR2-Agonisten MALP-2 hatten (Dinarello et al. 2016). Die Substanzen MALP-2 und insbesondere LPS wurden wiederum wiederholt mit dem Phänomen der Endotoxintoleranz in Makrophagen in Verbindung gebracht. Im Mittelpunkt der vorgelegten Arbeit stand die Frage, ob IL-37 einen Einfluss auf die Toleranzinduktion oder -ausprägung von Makrophagen bei Kontakt mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus* hat.

Da bis heute kein Gen-Homolog von IL-37 in der Maus identifiziert werden konnte, stützen sich alle in dieser Arbeit generierten Ergebnisse auf stabil transfizierte Mausmakrophagen (RAW 264.7), denen die komplette Gensequenz des humanen IL-37B mittels des pIRES-Expressionsvektors eingebracht wurde. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion eines leeren pIRES-Vektors, sodass zwei vergleichbare Zelllinien entstanden.

Zunächst konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass die Expression von IL-37B durch eine Stimulation der stabil transfizierten RAW-Zellen mit den PAMPs Pam3Csk und MDP induziert wird. Im nächsten Schritt konnte die Expressionskinetik von IL-37B nach Stimulation mit *S. pneumoniae* und *S. aureus* mittels qPCR nachvollzogen werden. Anschließend wurde ein Stimulationsprotokoll zum Vergleich der Proinflammation und der toleranten Phase etabliert. Hierbei zeigten sich sowohl während der Proinflammation als auch während der toleranten Phase nur geringfügig veränderte Expressionslevel proinflammatorischer Zytokine in IL-37B produzierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Eine signifikant verminderte Produktion der Zytokine während der toleranten Phase nach Zweitstimulation konnte im ELISA nachgewiesen werden.

Auf die Analyse einzelner Zytokine nach etabliertem Stimulationsprotokoll folgte eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Ampliseq. Auf diese Weise wurden 911 Gene, welche mit der Immunantwort von Monozyten und Makrophagen assoziiert sind, genauer analysiert. Anhand der Sequenzierungsdaten wurden nach *S. pneumoniae*- bzw. *S. aureus*-Stimulation einerseits T- (tolerisierbare) und NT-Gene (nicht tolerisierbare) und andererseits Gene, welche in ihrer Expression durch IL-37



beeinflusst werden, herausgefiltert. Hierbei war festzustellen, dass sich die für *S. pneumoniae* und *S. aureus* ermittelten T- und NT-Gene weitestgehend von den bisher publizierten unterscheiden. Dasselbe trifft auf 25 durch IL-37B in ihrer Expressionsstärke modulierte Gene zu. Zwischen *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulationen waren nur geringfügige Unterschiede zu detektieren. Da zwischen den identifizierten T-Genen in Leervektor- und IL37B-transfizierten Zellen kaum Unterschiede nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation zu detektieren waren, ist davon auszugehen, dass alle detektierten T-Gene unabhängig von IL-37B tolerierbar sind. Ferner gab es keine Überschneidung zwischen IL37B-regulierten Genen und T-Genen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass IL-37B keinen Einfluss auf die generelle Toleranzinduktion nimmt, sondern als Zytokin mit antiinflammatorischer Wirkung funktionell anders modulatorisch eingreift.

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Bakterielle Infektionen

Bakterien sind Mikroorganismen, die zirkuläre doppelsträngige DNA und (mit Ausnahme von Mykoplasmen) Zellwände besitzen. Die weitere Einteilung erfolgt unter anderem anhand der Morphologie, der Färbereigenschaften und des Sauerstoffbedarfs. Morphologisch werden sphärische (Kokken) von zylindrischen (Stäbchen) oder spiralförmigen (Spirochäten) Bakterien unterschieden. Manche Bakterien sind außerdem in Kapseln eingeschlossen. Für einige Bakterien (z. B. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) ist diese Kapsel hilfreich, um sich vor der Aufnahme durch Fresszellen zu schützen. Die Verkapselung erhöht dadurch die bakterielle Virulenz. Die Gram-Färbung ist die gängigste Färbung zur allgemeinen Unterscheidung von Bakterien. Sogenannte grampositive Bakterien färben sich nach Jodfixierung, Entfärbung mit Alkohol und Gegenfärbung mit Safranin kristallviolett; gramnegative Bakterien, die keine kristallviolette Farbe behalten, erscheinen rot. Ursache für die unterschiedlichen Färbungen ist der Aufbau der Zellwand. Gramnegative Bakterien besitzen eine zusätzliche äußere Membran, die Lipopolysaccharid enthält und die Virulenz dieser Bakterien ansteigen lässt. Hinsichtlich des Sauerstoffbedarfs werden aerobe, anaerobe und fakultativ anaerobe Spezies unterschieden. Während aerobe Bakterien mittels aerober Zellatmung Energie gewinnen, erfolgt dies in anaeroben Keimen durch Gärung oder anaerobe Atmung. Folglich wachsen aerobe Bakterien nur bei ausreichendem Sauerstoffangebot, während anaerobe Bakterien ein sauerstoffarmes bzw. sauerstoffreies Milieu bevorzugen. Fakultative anaerobe Keime können auf beiden der genannten Wege Energie gewinnen, sodass ihr Wachstum und Überleben unabhängig vom Sauerstoffangebot ist.

Viele Bakterien existieren im Menschen als normale Flora und kommen zum Teil in großer Anzahl in vielen Bereichen wie z. B. auf der Haut oder im Gastrointestinaltrakt vor. Das aktive oder passive Eindringen eines Bakteriums in bestimmte Körperregionen mit konsekutiver Gewebeschädigung wird als bakterielle Infektion bezeichnet, doch nur wenige Bakterienspezies sind für Menschen mit funktionierendem Immunsystem humanpathogen. Hierbei werden obligat und fakultativ pathogene Erreger differenziert. Letztere können bestimmte Bereiche des Körpers besiedeln ohne eine Infektion auszulösen. Werden sie jedoch in andere Bereiche verschleppt oder ändert sich das Gleichgewicht der Nische, kann es auch durch sie zur Infektion kommen. Obligat pathogene Erreger gehören nicht zur körpereigenen Flora und verursachen bei Besiedelung stets eine Infektion. Hierzu gehören z. B. diverse Streptokokken- und Staphylokokkenspezies (Hof und Dörries 2004; Longmore 2010, Groß 2013, Suerbaum 2016).

### 3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind grampositive, unbewegliche, fakultativ anaerobe Keime, die sich in Haufen anordnen. Die größte Bedeutung in der Medizin hat hierbei die Spezies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), da sie weltweit vorkommt und sowohl nosokomiale als auch extrahospitale Infektionen hervorrufen kann. *S. aureus* gehört zur transienten Hautflora des Menschen und kommt bei 30% der Bevölkerung asymptomatisch im Nasen-Rachen-Raum vor. Durch günstige Bedingungen oder ein geschwächtes Immunsystem kann es jedoch zu Krankheitserscheinungen kommen. Das Krankheitsspektrum verteilt sich auf nahezu alle Organsysteme, am häufigsten sind jedoch die Haut und die Herzklappen betroffen. Typische durch *S. aureus* verursachte Krankheiten sind Abszesse, Phlegmone, Impetigo contagiosa, Endokarditis und Osteomyelitis. *S. aureus*-Toxine können auch zu Lebensmittelvergiftungen (Enterotoxin), Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom (Exfoliatintoxin), bis hin zum lebensbedrohlichen Toxic-Shock-Syndrom (Toxin-1) führen (Longmore 2010, Groß 2013, Suerbaum 2016).

Für seine Interaktion mit den Wirtszellen benötigt *S. aureus* zahlreiche Virulenzfaktoren. Zu diesen zählen einerseits zellwandassoziierte Proteine und andererseits Exoproteine, Exoenzyme und Toxine, welche sezerniert werden. Die zellwandassoziierten Proteine wie z.B. Clumpingfactor A und B, Fibronectin-Binding-Protein A und B oder das Extracellular-Adherence-Protein ermöglichen die Adhärenz an wirtseigene Strukturen. Zu den sezernierten Proteinen zählen u.a. Hämolysine zum Lysieren von Membranen sowie Proteasen, Lipasen und Hyaluronidasen zum Abbau von Wirtsstrukturen (Otto 2014, Wardenburg, Patel und Schneewind 2007). Weitere Virulenzfaktoren sind in Tab. 3.1 dargestellt. Mittels übergeordneter Genregulatoren wird die Expression der Virulenzfaktoren von *S. aureus* so abgestimmt, dass sich die Infektion optimal ausbreiten kann (Garzoni et al. 2009, Jenkins et al. 2015).

**Tabelle 3.1: Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*:** FnBP – Fibronectin-Binding-Protein, EAP - Extracellular-Adherence-Protein, WTA/LTA – Wand-/Lipoteichonsäuren, vWbp – Von-Willebrand-Faktor-Binding-Protein.

Virulenzfaktoren	Funktion
<b>Zellwandkomponenten</b>	
Protein A	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Schutz vor Phagozytose</li> <li>· Interaktion mit B- und T-Zell Rezeptoren induziert Chemokinfreisetzung</li> </ul>
FnBP Clumpingfactor EAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Adhärenz an Wirtszellen</li> </ul>
Peptidoglykan WTA und LTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Interaktion mit TLR-2</li> <li>· Aktivierung der TLR-2-Kaskade</li> </ul>

Sezernierte Proteine	
<b>Hämolytine</b> α-Toxin	<b>Membranlytierung</b> · Lyse roter Blutzellen · Efflux von K <sup>+</sup> und Ca <sup>2+</sup> · Zytotoxizität + Apoptose von Monozyten
β-Hämolytase δ-Hämolytase	· = Sphingomyelinase C · Abbau von Sphingomyelin
<b>Leukozidine</b>	· Porenbildende Toxine · Lyse weißer Blutzellen · Efflux von Ca <sup>2+</sup>
<b>Proteasen</b> Aureolysin	<b>Schwächung der Wirtsabwehr</b> · Metalloprotease · Inhibiert Komplementsystem durch Inaktivierung von C3
Staphylokinase	· Plasminogen-Aktivator, Fibrinolyse · produziert Biofilm von Fibrin → Resistenz gegen Immunprozesse und Antibiotika
Staphylokoagulase vWbp	· Aktivierung von Prothrombin, Koagulation

Während systemischer Infektionen sind es insbesondere die Makrophagen in der Leber, die *S. aureus* als erstes phagozytieren und eliminieren. Allerdings gelingt es etwa 10% der Bakterien diesen Abwehrmechanismus zu umgehen und sich im Körper auszubreiten (Voyich et al. 2005, Gresham et al. 2000, Kubica et al. 2008, Olivier et al. 2009). Hierfür bedienen sich die Bakterien einer Polysaccharidkapsel mit Protein A, welches vor einer Aufnahme in Makrophagen schützt. Durch Bindung von Protein A an den Fc-Teil von Immunglobulinen wird eine effektive Opsonierung und damit die Erkennung und Phagozytose des Bakteriums durch Makrophagen verhindert (Goodyear und Silverman 2003).

### 3.1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Streptokokken sind grampositive, unbewegliche, sich in Ketten anordnende Bakterien, die keine Sporen ausbilden. Da sie physiologisch Haut und Schleimhäute des Menschen kolonisieren, ruft der Großteil ihrer Spezies keine Krankheitserscheinungen hervor. Die wenigen humanpathogenen Spezies werden nach ihrer Hämolyseart in α-

und  $\beta$ -hämolyzierende Streptokokken eingeteilt (Musher 2009). Klinisch bedeutendster Vertreter der humanpathogenen Streptokokken sind die  $\alpha$ -hämolyzierenden *Streptococcus pneumoniae*. Sie besiedeln die Schleimhäute des Nasopharynx und werden durch Schmier- und Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. Überträger sind meist Kleinkinder im Alter von 1 bis 2 Jahren. Bei Erwachsenen ohne Kontakt zu Kleinkindern konnte nur bei 5% eine Besiedelung nachgewiesen werden, wobei diese in der Regel ohne Krankheitswert ist. Neben den häufigen Infektionen an Mittelohr (Otitis media) und Pharynx (Sinusitis, Weichteilinfektionen) kann es insbesondere bei Störungen des Immunsystems auch zu einer lebensbedrohlichen Pneumonie, Meningitis oder Sepsis infolge einer *S. pneumoniae*-Infektion kommen (van der Poll und Opal 2009) Besonders Säuglinge, Kleinkinder und ältere Menschen sind hiervon betroffen (WHO 2007).

*S. pneumoniae* besitzen eine Zellwand aus Peptidoglykan und Teichonsäuren, die von einer Polysaccharidkapsel bedeckt ist, welche durch negative Ladung vor den Schleimhautsekreten schützt. Während das Peptidoglykan der Zellwand die klassische grampositive Struktur besitzt, beinhalten die Teichonsäuren von *S. pneumoniae* einen Ribitolphosphat-Anker um Phosphorylcholin kovalent zu binden. Dieses wird wiederum benötigt, damit Oberflächenproteine, welche zur Adhärenz an Wirtszellen benötigt werden, nichtkovalent an das Bakterium andocken können (Henriques-Normark und Toumanen 2013). Zu diesen Oberflächenproteinen gehören u.a. LytA Autolysin, Protein A sowie Cholin-Binding-Proteine (CBPs) A, D, E und G. LytA spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung und der Freisetzung intrazellulärer Virulenzfaktoren, indem es die eigene Zellwand spaltet (Mellroth et al., 2012). Das Oberflächen-Protein A (= pneumococcal surface protein A; PspA) verhindert die Komplementaktivierung (Tu et al. 1999). CBPs dienen der Adhärenz an Wirtszellen. Insbesondere CBP A ermöglicht durch Bindung an nasopharyngeale Mukosarezeptoren und Lamininrezeptoren der Blut-Hirn-Schranke eine Translokation des Bakteriums durch die jeweiligen Barrieren (Hammerschmidt et al. 1997, Orihuela et al. 2009). Proteasen (HtrA),  $\beta$ -Glucosidasen und Neuraminidasen spielen eine Rolle in der Kolonisierung. Letztere führen über Biofilmbildung u.a. zu einer Otitis media (Tong et al. 2000). Hyaluronidase lockert durch Spaltung der Hyaluronsäure die Zellverbände und fördert so die Ausbreitung des Bakteriums im Gewebe. Eine besondere Bedeutung kommt der Polysaccharidkapsel zu, die maßgeblich die Virulenz von *S. pneumoniae* beeinflusst. Sie erschwert die Opsonierung des Erregers durch das alternative Komplementsystem sowie die Phagozytose (Kadioglu et al. 2008). Die Dicke der Kapsel sowie ihre chemische Struktur unterscheiden das symptomlose Trägerstadium vom invasiven Infektionsstadium. Je nach Antigeneigenschaften der Polysaccharidkapsel werden die Pneumokokken in Serogruppen klassifiziert (Geno et al. 2015). Aktuell sind hiervon 97 bekannt. Unter ihnen gelten die Typen 1, 2, 3, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23 als hochgradig virulent.

### **3.2. Die unspezifische Immunreaktion auf bakterielle Erreger**

Vom Moment der Geburt an besitzt der Mensch ein unspezifisches (= angeborenes, natürliches) Immunsystem, welches sich aus verschiedenen Mechanismen zur Abwehr körperfremden Materials zusammensetzt. Zu diesen Mechanismen zählen

einerseits physikalische und chemische Barrieren, die den Eintritt von Pathogenen in den Körper verhindern sollen, und andererseits Zellen des unspezifischen Immunsystems sowie deren Produkte (z. B. Enzyme, Immunglobuline), die bereits in den Körper gelangte Fremdkörper beseitigen (Hof und Dörries 2004). Um körperfremde Substanzen zu erkennen besitzen die Zellen des angeborenen Immunsystems auf ihrer Oberfläche sogenannte Pattern-Recognition-Receptors (PRRs). Diese antigenunabhängige Identifikation von Fremdkörpern läuft zwar vergleichsweise schnell ab, ist jedoch für den Großteil der Pathogene nicht zur Elimination ausreichend. Hierfür wird zusätzlich eine verzögerte spezifische Immunantwort benötigt, welche durch die Zellen des unspezifischen Immunsystems eingeleitet wird und nach einigen Stunden bis Tagen wirksam wird (Pezzuto et al. 2006).

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Indem diese Zellen typische Strukturen von Erregern – sog. „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) – mit ihren PRRs erkennen, können sie diese schon bei Erstkontakt spezifisch als fremd erkennen. Nach Phagozytose und Abtötung einiger Pathogene, können deren Bestandteile auf die Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen gebracht und den T-Zellen als Antigene präsentiert werden. Hierdurch wird die spezifische Immunantwort eingeleitet, die aus einer Vielzahl von B- und T-Effektorzellen besteht, die gegen die präsentierten Antigene gerichtet sind (Königshoff und Brandenburger 2012).

### **3.3 Spezielle Rolle der Monozyten und Makrophagen während der Entzündungsreaktion**

Monozyten werden im Knochenmark aus gemeinsamen Vorläuferzellen für Monozyten und neutrophile Granulozyten gebildet. Sie zirkulieren im Blut oder differenzieren nach Extravasation ins Gewebe zu den unterschiedlichen Subpopulationen der Gewebemakrophagen (Geissmann et al. 2010). Im Blut zirkulierende Monozyten sind in der Lage Pathogene zu erkennen und zu phagozytieren. Anschließend werden die phagozytierten Bestandteile in einem regionalen Lymphknoten als Antigene auf MHC-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche präsentiert. Monozyten, die nicht mit Erregern in Kontakt kommen, werden aus dem Blutstrom entfernt oder wandern nach kurzer Zirkulation im Blut ins periphere Gewebe, wo sie anschließend zu Makrophagen ausdifferenzieren. Weiterhin gibt es Makrophagen, die bereits bei der Dottersackbildung während der Embryogenese in die sich bildenden Gewebe einwandern und dort verbleiben. Ihre Bezeichnung richtet sich dabei nach ihrem Aufenthaltsort. So kommen sie z. B. im Knochen als Osteoklasten, in der Leber als Kupferzellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, oder im Gehirn als Mikroglia vor. Grundsätzlich befinden sich in allen Geweben Makrophagen, die meisten jedoch an für Infektionen besonders empfänglichen Stellen wie Lunge oder Darm. Die Funktion der Makrophagen besteht ebenfalls in der Phagozytose von Pathogenen sowie in der Regulation der Entzündungsreaktion bei erfolgter Infektion. Mithilfe der PRRs wird das Pathogen erkannt, von der Zellmembran des Makrophagen umschlossen und internalisiert. Dieses Stadium wird als Phagosom bezeichnet. Anschließend

verschmilzt das Phagosom mit den zytoplasmatischen Lysosomen zum Phagolysosom. Hier werden durch die Stickstoff-Synthetase (iNOS) Stickstoffradikale und durch die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, die einerseits das intrazelluläre Pathogen angreifen und andererseits auch nach extrazellulär abgegeben werden. Man spricht in dieser Phase auch vom Respiratory Burst. Die aus dem Lysosom stammenden Lysozyme, Hydrolasen und Defensine bauen das aufgenommene Pathogen enzymatisch ab. Im Gegensatz zu den eher kurzlebigen neutrophilen Granulozyten überleben Makrophagen die Phagozytose. Die entstehenden Peptide von bakteriellen Proteinen werden anschließend mittels MHC-II-Rezeptoren an der Zelloberfläche präsentiert, um das spezifische Immunsystem zu aktivieren. Insbesondere die Interaktion der antigenpräsentierenden MHC-II-Rezeptoren mit TH1-Zellen führt rückwirkend zu einer verstärkten Hydrolysefähigkeit der Makrophagen (Alberts 2011, Rigby und DeLeo 2012, DeLeo et al. 2009). Während des gesamten Prozesses kommt es gleichzeitig zur Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Dadurch können Makrophagen die Entzündungsreaktion auf Erreger initiieren und auch regulieren. Mittels sezernierter Chemokine können auch weitere Immunzellen wie Granulozyten und dendritische Zellen zum Entzündungsherd rekrutiert werden, wodurch die Entzündungsreaktion verstärkt wird (Fournier und Philpott 2005, Fournier 2012, Sagy et al. 2013).

Neben den Gewebemakrophagen existieren auch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) mit überwiegend anti-inflammatorischen Eigenschaften. Sie kommen in der Umgebung solider Tumoren vor und begünstigen durch Suppression anderer Immunzellen dessen Wachstum und Ausbreitung sowie durch Sekretion von VEGF die Angiogenese. TAMs haben dadurch großen Anteil an karzinombedingten Entzündungsreaktionen und der Metastasenbildung (Komohara et al. 2016).

### **3.4 Phasen der Makrophagenantwort**

Ob die Immunreaktion durch Makrophagen in Richtung Pro- oder Antiinflammation gelenkt wird, hängt maßgeblich vom Stimulus und ihrer Aktivierung ab. Erste Studien hierzu führten Mackaness et al. bereits im Jahr 1964 durch. Hierbei wurde beobachtet, dass der Kontakt von Mäusen zu verschiedenen Erregern Veränderungen in der Makrophagenaktivität führt, welche wiederum die Resistenz gegenüber der Erreger beeinflusste. Diese Aktivierung hängt von spezifischen Wachstumsfaktoren, ihren Rezeptoren, Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren ab (Gordon und Martinez 2010). Dabei sind bis heute noch viele wirtseigene Faktoren, die die Genexpression in Makrophagen regulieren, unbekannt. Eine zentrale Rolle in der Makrophagenaktivierung konnte bis jetzt den IFN $\gamma$ -, IL-4- und IL-13-Signalwegen nachgewiesen werden (Gordon und Martinez, 2010). IFN $\gamma$  wird insbesondere im Rahmen der Typ-I-Immunreaktion von TH1-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen freigesetzt. Dadurch wird in Verbindung mit LPS und dem Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) eine proinflammatorische Immunreaktion hervorgerufen, die als klassische Makrophagenaktivierung bezeichnet wird. Diese klassisch aktivierten Makrophagen produzieren zahlreiche proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  und zeichnen sich durch ausgeprägte iNOS-

Aktivität sowie der verstärkten Fähigkeit zur Antigenpräsentation durch MHC-II-Rezeptoren aus (Biswas und Mantovani 2010, Lawrence und Natoli 2011).

Auch bei Kontakt zu IL-4 oder IL-13, welche vorwiegend von TH2-Lymphozyten sezerniert werden, zeigen Makrophagen eine Aktivierung. Diese wird jedoch eher als antiinflammatorisch interpretiert, sodass diese Reaktion als alternative Makrophagenaktivierung bezeichnet wird (Goerdts et al. 1999). Neben IL-4 und IL-13 ist der alternative Phänotyp auch durch IL-10, Glucocorticoide, Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF), Prostaglandin E oder Vitamin D3 induzierbar (Mantovani et al. 2004). Alternativ aktivierte Makrophagen exprimieren zahlreiche Rezeptoren mit hoher Spezifität für körperfremde Substanzen wie z. B. den Makrophagen-Mannose-Rezeptor (Stein et al. 1992), den  $\beta$ -Glucanrezeptor (Mosser und Handman 1992), oder den Scavenger-Rezeptor-I (Geng und Hansson 1992). Obwohl dadurch ein breites Spektrum der Antigenerkennung gewährleistet wird, kommt es bei diesem Phänotyp nicht zur vermehrten Abtötung von Pathogenen. Dies ist v.a. auf die verminderte Bildung von Stickstoffradikalen zurückzuführen, da die verstärkt exprimierte Arginase der NO-Synthase das Substrat L-Arginin streitig macht (Munder et al. 1998). Durch Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10 oder PGE2 können alternativ aktivierte Makrophagen antiinflammatorische Effekte auf andere Zellen des Immunsystems übertragen (Goerdts et al. 1999).

Bei dem historischen Verständnis der klassischen und alternativen Makrophagenaktivierung handelt es sich um zwei Extreme, die so in der Realität wahrscheinlich nie zu sehen sind. Viel mehr existiert zwischen diesen Extremen ein breites Spektrum an möglichen Phänotypen mit fließenden Übergängen (Mosser und Edwards 2008, Martinez und Gordon 2014). Dennoch setzte sich seit 2000 die von Mills et al. vorgeschlagene Nomenklatur der M1- und M2-Polarisation durch. Diese Nomenklatur wurde ursprünglich durch die Expression von IL-12 (M1) bzw. IL-10 (M2) definiert. Seitdem bezeichnet die M1-Polarisation klassisch aktivierte Makrophagen und die M2-Polarisation alternativ aktivierte Makrophagen. Während die Elimination körperfremder Substanzen oder Pathogene eher durch M1-polarisierte Gewebemakrophagen erfolgt, wurden vermehrt M2-polarisierte Makrophagen nach überstandener Entzündungsreaktion oder unter den Tumor-assoziierten Makrophagen beschrieben (Komohara et al. 2016).

### **3.4.1 Proinflammationsreaktion von Makrophagen**

Die Einleitung der Immunantwort erfolgt über die Erkennung von PAMPs und DAMPs (danger-associated molecular patterns) durch die Zellen des angeborenen Immunsystems. Dabei handelt es sich um Bestandteile der Pathogene wie z. B. Lipoproteine bzw. -peptide, virale Doppelstrang-DNA, Peptidoglykane, Flagellin oder Teichonsäuren. Der bekannteste Vertreter hierunter ist LPS (Lipopolysaccharide), welches in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommt. Die Hauptkomponente der Zellwand grampositiver Bakterien sind jedoch Peptidoglykane und Teichonsäuren. Letztere wurden erstmals auf der Oberfläche von *S. aureus* beschrieben (James and Brewer 1968) und werden in Lipoteichon- (LTA) und Wandteichonsäuren (WTA) unterteilt. Diese Moleküle werden an der Oberfläche von Immunzellen durch PRRs erkannt (Janeway 1989). Eine wichtige Subgruppe dieser

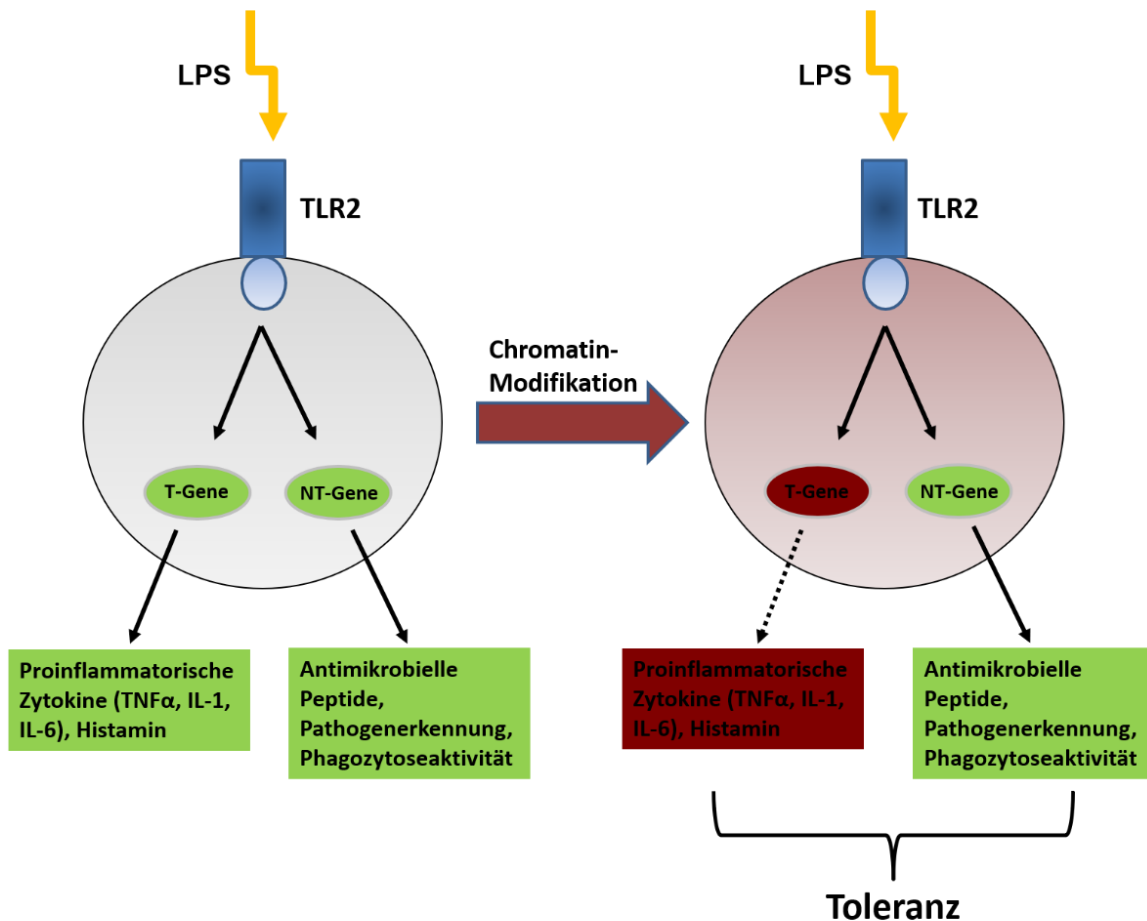


PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Rezeptoren der TLR-Familie sind Typ-1-Transmembranproteine mit extrazellulärer ligandenbindender Domäne. TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 10 befinden sich dabei in der Plasmamembran, TLR 3, 7, 8 und 9 in Endosomen oder Endolysosomen.

Teichonsäuren von *S. aureus* oder *S. pneumoniae* werden von TLR2 erkannt (Schroder et al. 2003). Die Signalkaskade von TLR2 führt zu einer Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern und dadurch zur gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine. Weiterhin können TLRs Heterodimere mit sich selbst und anderen Oberflächenproteinen bilden. Hierzu zählen u.a. TLR2/TLR1 und TLR2/TLR6 Heterodimere (Kang et al. 2009). Der Kontakt von Oberflächenstrukturen grampositiver Erreger zu den TLR2-Korezeptoren CD14 oder CD36 zu führt zur Rekrutierung von TLR2 und TLR6 (Nilsen et al. 2008). CD36 kommt hierbei als Sensor für Diacylglyceride eine entscheidende Rolle zu, da es dadurch über den TLR2/6-Weg die Phagozytose grampositiver Erreger induziert (Hoebe et al. 2005). Das durch PAMPs aktivierte TLR2/6-Heterodimer induziert über die MyD-88-Signalkaskade die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern und damit die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Jin et al. 2007, Kang et al. 2009).

### **3.4.2 Resolution der Entzündungsreaktion und Toleranz am Beispiel der Makrophagen**

Als Schutzmechanismus vor andauernder Gewebeschädigung wird die Entzündungsreaktionen, induziert durch Makrophagen, hauptsächlich durch Herunterregulierung der TLR-Signalwege inhibiert. Aber auch genregulatorische Veränderungen wie z. B. Histonmodifikationen und NF $\kappa$ B-Heterodimerisierungen spielen bei der Abschwächung der Entzündungsreaktion eine Rolle. Dadurch sind die Zellen nach initialer Proinflammationsreaktion nicht mehr in der Lage, adäquat auf sekundäre Pathogene oder Stimuli zu reagieren. Diese Anpassungsreaktion des Körpers wird historisch bedingt als Endotoxintoleranz bezeichnet (Biswas und Lopez-Collazo 2009), da die Toleranz auf Zweitstimulierung zunächst bei LPS-vermittelter Erstaktivierung gezeigt wurde. Bei Zweitkontakt zu Endotoxinen zeigen tolerante Monozyten oder Makrophagen nun eine Herunterregulierung der Expression proinflammatorischer Gene wie Zytokinen und Chemokinen (Medvedev, Kopydlowski und Vogel 2000) bei zum Teil gesteigerter Expression antiinflammatorischer Mediatoren (vgl. Abb. 3.1). Daraufhin wurden Gene in tolerisierbare (T-Gene) und nicht-tolerisierbare (NT-Gene) unterteilt (Foster et al. 2007). Dabei gelten Gene, die in toleranten Zellen nicht stark exprimiert sind und auch nicht reaktiviert werden können, als T-Gene. NT-Gene werden dagegen trotz Toleranz exprimiert oder sind durch Stimulationen reaktivierbar. Zu den T-Genen gehören v.a. proinflammatorische Gene wie TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  oder CCL20, während die Klasse der NT-Gene v.a. antimikrobielle Gene wie MARCO, COX-2, PTGES oder CXCL5 enthält. Makrophagen sind somit in der Phase der Toleranz nicht mehr zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-6 fähig und dadurch auch nicht mehr in der Lage die Proinflammation weiter zu verstärken bzw. aufrechtzuerhalten (Foster und Medzhitov 2009).

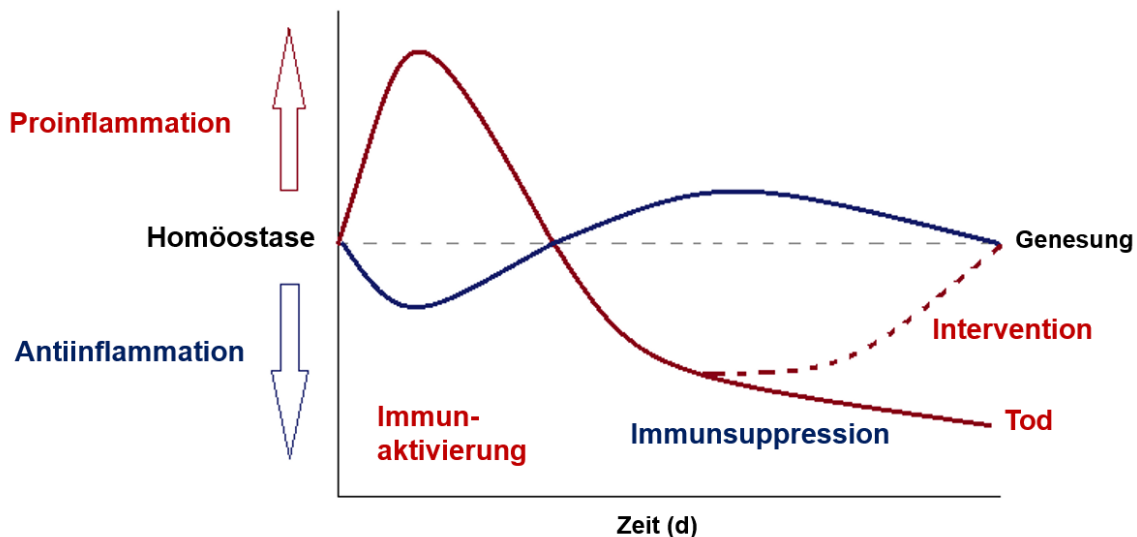


**Abb. 3.1 Vergleich von naiven mit toleranten Makrophagen bezüglich der Expression von T- und NT-Genen nach LPS-Stimulation:** Naive Makrophagen rekrutieren nach LPS-Stimulation Transkriptionsfaktoren für T- und NT-Gene und führen über z.B. Histonacetylierung sowohl zur Expression proinflammatorischer Zytokine als auch zur Expression antimikrobieller Peptide. In toleranten Makrophagen liegen die Promotoren für T-Gene im deacetylierten Zustand vor und können dadurch nicht aktiviert werden. Abb. nach S. L. Foster und R. Medzhitov, 2009.

### 3.4.3 Toleranz am Beispiel Sepsis

Sepsis bezeichnet eine lebensbedrohliche systemische Immunreaktion, die durch eine Infektion mit Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten hervorgerufen wird. Die Mehrheit der Infektionen (62%) wird dabei durch gramnegative Bakterien wie *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella pneumoniae* verursacht, aber auch grampositive Kokken wie *S. aureus* oder *S. pneumoniae* werden häufig nachgewiesen (35%) (Opota et al. 2015). Während der Erkrankung werden verschiedene überlappende Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems beobachtet. Der Krankheitsverlauf kann in 3 Phasen eingeteilt werden (Abb. 1): Zunächst kommt es zu einer frühen systemischen Immunreaktion mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-1 aus Immunzellen und zur Suppression antiinflammatorischer Mediatoren. Auf diese frühe proinflammatorische Phase folgt die Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren, sodass sowohl pro- als auch antiinflammatorische Signalkaskaden aktiviert werden. Die gesteigerte fortlaufende

Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren führt dann letztendlich zu einer Dysregulation des Immunsystems (Monneret et al. 2004, Biswas und Lopez-Collazo 2009), was in Abb. 3.2 dargestellt ist. In dieser Phase ist der Körper nicht mehr in der Lage adäquat auf Pathogene zu reagieren. Die Mehrzahl der Patienten übersteht die frühe proinflammatorische Phase und gelangt unweigerlich in die Phase der Dysregulation oder Immunsuppression, da diese für den Körper notwendig ist um die Entzündungsreaktion zu bremsen. Trotz Maximalbehandlung sterben immer noch 30-50% der Patienten an den Folgen der Erkrankung (Shankar-Hari et al. 2016).



**Abb. 3.2: Systemische Immunreaktion des Körpers bei Sepsis:** Direkt nach Pathogenkontakt kommt es durch systemische Freisetzung proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine, wobei zunächst die proinflammatorischen wie TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-1 überwiegen und zur Phase der Hyperinflammation führen. Daraufhin folgt eine zwischenzeitliche Phase der immunologischen Homöostase, in der die Expression pro- und antiinflammatorischer Mediatoren ausgeglichen ist. Schafft man es nicht, Sepsispatienten in dieser Phase zu stabilisieren, kommt es zur unkontrollierten Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren. Diese immunsuppressive Phase ist durch hohe Mortalität gekennzeichnet, da ein weiterer bzw. wiederholter Pathogenkontakt nicht effektiv abgewehrt werden kann. Abb. nach Das et al. 2014.

## 3.5 Interleukin-37

### 3.5.1 Entdeckung und Wirkung

Interleukin-37 (IL-37) ist ein Mitglied der IL-1-Familie (ursprünglich IL-1F7) und wurde im Jahr 2000 von 3 unabhängigen Gruppen *in silico* entdeckt (Kumar et al. 2000, Busfield et al. 2000, Pan et al. 2000). 1-2 Jahre später konnte es u. a. in humanen Monozyten (Bufler et al. 2002), Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen (Pan et al. 2001) nachgewiesen werden. Weiterhin erfolgte der immunhistochemische Nachweis in Synovialzellen, tonsillären B-Zellen, Plasmazellen, neoplastischen Zellen sowie in Epithelzellen der Haut, der Niere und des Darms. Dabei wird IL-37 nicht

kontinuierlich exprimiert, sondern durch TLR-Aktivierung oder erhöhte IL-1 $\beta$ - und TGF- $\beta$ -Aktivität verstärkt exprimiert und freigesetzt (Nold et al. 2010). Außerdem wurde eine verstärkte IL-37-Freisetzung in humanen Keratinozyten durch Beta-Defensin-3 (Smithrithree et al. 2015) und in humanen Alveolarepithelzellen durch Lipoarabinomannan – freigesetzt von *Mycobacterium tuberculosis* – über gesteigerte ERK1/2- und p38-Aktivität (Huang et al. 2015) beschrieben. Die Expression des Proteins in humanen Monozyten ist allerdings auch während proinflammatorischer Prozesse sehr gering. Seine Konzentration liegt bei 10-20 pg auf eine Million Zellen (Dinarello et al. 2016). Trotz Konzentrationen im picomolaren Bereich zeigt rekombinantes IL-37 in M1-differenzierten humanen Blutmakrophagen starke antiinflammatorische Effekte: Infolge einer LPS-Stimulation kommt es bei gleichzeitigem Vorhandensein von IL-37 zu einer reduzierten IL-1 $\beta$ -, IL-6- und TNF $\alpha$ -Produktion und Freisetzung. Diese Beobachtungen bestätigten sich durch eine verminderte Plasmakonzentration dieser Zytokine in IL-37-transgenen Mäusen nach LPS-Kontakt (Li et al. 2015). Die Verabreichung von bis zu 1  $\mu$ g rekombinantes IL-37 zeigte an Wildtyp-Mäusen ebenfalls eine Verringerung der Neutrophileninvasion in die Lungen bei induzierter Aspergillose (Moretti et al. 2014), eine verminderte Monozyteninfiltration ins Myokard nach einem Herzinfarkt (Wu et al. 2014) sowie eine abgeschwächte allergische Reaktion der Atemwege nach Antigenkontakt (Lunding et al. 2015). Weitere bislang beschriebene Effekte von verabreichtem rekombinantes humanem IL-37 in der Maus sind in Tabelle 3.2 beschrieben.

**Tabelle 3.2: Effekte von rekombinantes IL-37 in Wildtyp-Mäusen**

<u>Krankheitsmodell</u>	<u>Effekt bzw. Funktion</u>	<u>Quelle</u>
<b>Endotoxämie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Proinflammation</li> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> </ul>	Nold-Petry et al. 2015
<b>Akute Pneumonie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Neutrophilenmigration</li> <li>· verminderte IL-1<math>\beta</math>-Expression</li> <li>· gesteigerte IL-10-Expression</li> </ul>	Moretti et al. 2014
<b>Rückenmarksverletzung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> <li>· gesteigerte Mobilität</li> </ul>	Coll-Miró et al. 2016
<b>Hepatische Ischämie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Proinflammation</li> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> </ul>	Sakai et al., 2012
<b>Metabolisches Syndrom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> <li>· verminderte Insulinresistenz</li> </ul>	Ballak et al. 2015
<b>Rheumatoide Arthritis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> <li>· verminderte Neutrophilenmigration</li> </ul>	Cavalli et al. 2016
<b>Asthma bronchiale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> <li>· verminderter Atemwegswiderstand</li> </ul>	Lunding et al. 2015

<b>Myokardinfarkt</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· kleineres Infarktgebiet</li> <li>· bessere Herzfunktion</li> </ul>	<p>Wu et al. 2014</p> <p>Xu et al. 2015</p>
<b>Renale Ischämie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· verminderte Proinflammation</li> <li>· verminderte Zytokinexpression</li> <li>· bessere Nierenfunktion</li> </ul>	<p>Yang et al. 2015</p>

### 3.5.2 Synthese, Aktivierung und intrazelluläre Effekte von IL-37

Es existieren 5 Isoformen des Proteins (IL-37 A-E), wobei die genauen Funktionen der einzelnen Isoformen bislang unbekannt sind. Das Genom der Maus enthält keine für IL-37 homologe Gensequenz. Das humane IL-37-Gen beinhaltet 6 Exons, wobei nur die Isoformen A, B und D die Exons 4, 5 und 6 enthalten. Die ersten 3 Exons werden durch Proteasen abgespalten. Exon 1 von IL-37B besitzt hierfür eine Schnittstelle für Caspase-1, wodurch rekombinantes IL-37B in aktives IL-37 überführt wird (Kumar et al. 2002). Die Aktivität der Formen C, D und E ist bislang unbekannt. Das Gen für IL-37 ist innerhalb der IL-1-Gruppe auf Chromosom 2q12-13 lokalisiert. Durch die Nähe zu Regulatorregionen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wird IL-37 in humanen Monozyten und Makrophagen unter LPS-Stimulation simultan mit diesen Zytokinen parallel koexprimiert (Sharaf et al. 2014). IL-37 wird zumeist in den meisten Zelltypen konstitutiv in geringen Mengen exprimiert, während eine Aktivierung von Makrophagen eine Stabilisierung der mRNA und dadurch eine größere Menge an mRNA und Protein bewirkt.

Für die Freisetzung von IL-37 existieren, wie für die IL-1-Familie üblich, keine spezifischen Signalpeptide. Der inaktive Vorläufer des IL-37B wird intrazellulär nach TLR- oder IL-1-Aktivierung exprimiert. Intrazellulär wird das Vorläuferprotein mittels Caspase-1 in die aktive Form überführt. Weiterhin wurde ein intrazellulärer Komplex aus aktivem IL-37 und Smad3 beschrieben (Grimsby et al. 2004). Man vermutet, dass diese Interaktion den Transport von SMAD3 in den Zellkern moduliert und bei der Regulation der SMAD3-abhängigen Transkription eine Rolle spielt und vor allem immunsuppressive Wirkung aufweist.

### 3.5.3 Extrazelluläre Wirkmechanismen von IL-37

Der IL-37-Vorläufer sowie reifes IL-37 konnten mittels Western Blot extrazellulär in Überständen humaner Monozyten nachgewiesen werden (Bulau et al. 2014). Eine durch ATP-Gabe gesteigerte Caspase-1-Aktivität führte zwar zur gesteigerten Freisetzung des IL-37-Vorläufers, erhöhte jedoch nicht den extrazellulären Anteil an geschnittenem IL-37. Folglich geht man davon aus, dass bislang unbekannte Proteasen für die extrazelluläre Aktivierung des IL-37-Vorläufers sorgen. Die Blutkonzentration des Proteins ist mit < 100 pg/ml im gesunden Menschen zwar äußerst gering, findet sich jedoch erhöht in Krankheitsfällen, wie z. B. bei rheumatoider Arthritis (Zhao et al. 2014) oder Lupus (Ye et al. 2014).

Die ersten Hinweise, dass extrazelluläres IL-37 Entzündungsreaktionen abschwächt gab es bereits 2002. Hier wurde gezeigt, dass eine humane NK-4-Zelllinie bei

Stimulation mit IL-18 unter Anwesenheit von IL-37 nur reduziert IFN $\gamma$  exprimiert (Bufler et al. 2002). Für gewöhnlich bindet IL-18 an IL-18R $\alpha$ , woraufhin die Beta-Kette des IL-18-Rezeptors (IL-18R $\beta$ ) rekrutiert wird. Infolge dessen nähern sich die intrazellulären Rezeptordomänen (= TIR) des IL-18-Rezeptors an und binden MyD88. Dadurch wird eine proinflammatorische Signaltransduktion eingeleitet (Tsutsumi et al. 2014). Die Bindung von IL-37 an IL-18R $\alpha$  wurde anhand Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation, Foerster-Resonance-Energy-Transfer (FRET) und Proximity-Ligation-Assay (PLA) demonstriert (Nold-Petry et al. 2015). Wenn nun IL-37 anstatt IL-18 an IL-18R $\alpha$  bindet, wird anstelle der  $\beta$ -Kette der Single-Ig-IL-1-related Receptor (= SIGIRR = IL1R8) rekrutiert. Die durch SIGIRR veränderte TIR-Domäne (=TIRb) beinhaltet spezielle Aminosäuren, die die Affinität zu MyD88 erhöhen. Durch die vermehrte MyD88-Bindung an TIRb wird die intrazelluläre Interaktion mit der TIR-Domäne von IL-18R $\alpha$  gehemmt. Dies führt wiederum zu einem abgeschwächten MyD88 Aktivierungssignal (Gong et al. 2010). Der Komplex aus IL-37, IL18-R $\alpha$  und SIGIRR wurde mittels Bioluminescence-Resonance-Energy-Transfer (BRET) und GSD-Mikroskopie nachgewiesen (Nold-Petry et al. 2015). Proteomische und transkriptomische Untersuchungen zeigten letztendlich, dass die Signalkaskade des IL-37 über mehrere Zwischenschritte den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B inhibiert (Nold-Petry et al. 2015).

Weiterhin stellte man sowohl in humanen als auch in huIL37-transfizierten Mausmakrophagen fest, dass LPS und IL-1 $\beta$ -induzierte Zytokine unter Anwesenheit von IL-37 supprimiert werden (Sharma et al. 2008, Nold et al. 2010, Nold-Petry et al. 2015). Gleichzeitig wiesen humane Monozyten ohne IL-37 eine gesteigerte Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF und GM-CSF auf (Nold et al. 2010, Nold-Petry et al. 2015). Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche an der humanen Makrophagenzelllinie THP-1. Der lentivirale Abbau von Smad3 führte sowohl in vitro als auch in vivo zur teilweisen Aufhebung der IL-37-abhängigen Immunsuppression (Nold et al. 2010).

### **3.5.4 Die Rolle von IL-37 bei *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Infektionen**

Zur Wirkung von IL-37 während bakterieller Infektionen gibt es bislang äußerst wenige Daten. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich am Mausmodell gezeigt werden, dass IL-37 für den Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Pneumonie nachteilig zu sein scheint. Die IL-37-transgenen Mäuse zeigten eine erhöhte bakterielle Belastung im Lungengewebe und in der bronchoalveolären Lavage (BAL), begleitet von einem massiven Einstrom von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in die entzündeten Lungenbereiche. Zudem zeichneten sich im Vergleich zu dem Lungengewebe von WT-Mäusen verstärkt nekrotische Bereiche im Lungenparenchym der IL-37tg-Mäuse ab. Weiterhin zeigte sich in der frühen Phase der Infektion in Lunge und Blut der IL-37tg-Mäuse eine Reduktion der pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren, während im weiteren Verlauf bei den IL-37tg-Mäusen zu einem starken Anstieg der pro-inflammatorischen Immunreaktionen kam (Schauer et al. 2018). Insgesamt scheint IL-37 im murinen Pneumokokken-Infektionsmodell die körpereigene Abwehr eher negativ zu beeinflussen, was zu einer stärkeren initialen Ausbreitung der Bakterien und zu erhöhter Letalität führt. Zu Infektionen mit *S. aureus* existieren bislang keine vergleichbaren Daten.

## 4 ZIELE DER ARBEIT

IL-37 ist ein Protein der IL-1-Familie, das in den letzten 20 Jahren zunehmend charakterisiert werden konnte. In Makrophagen und anderen Immunzellen wird es nach Kontakt dieser Zellen zu TLR-Agonisten wie MALP-2 und LPS verstärkt exprimiert (Dinarello et al. 2016). Dabei zeigt es vorwiegend antiinflammatorische bzw. immunsuppressive Eigenschaften. Die Mehrzahl der Studien fokussierte sich auf die Rolle von IL-37 bei Erkrankungen, die mit entzündlichen Prozessen und Autoimmunprozessen einhergehen (Teng et al. 2014, Ye et al. 2015, Ye et al. 2014, McNamee et al. 2011, Sakai et al. 2012, Ballak et al. 2014, Nold et al. 2010, Lunding et al. 2015, Xu et al. 2015, Wu et al. 2013, Coll-Miro et al. 2016, Zeng et al. 2017). Der Einfluss von IL-37 bei bakteriellen Infektionen wurde hingegen eher spärlich untersucht (Moretti et al. 2014, van de Veerdonk et al. 2014, Huang et al. 2015, Zhao et al. 2017, Schauer et al. 2018).

Infektionen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* gehören zu den häufigsten Krankheitsbildern in der Medizin. Insbesondere die systemische Ausbreitung der Erreger - auch Sepsis genannt - stellt eine große Herausforderung dar und ist deshalb Gegenstand zahlreicher Studien. Nach den Erkenntnissen des letzten Jahrzehnts wirkt sich das Phänomen der Endotoxintoleranz maßgeblich auf die Überlebensraten von Sepsispatienten aus (Hotchkiss et al., 2013). Hierbei verfällt der Organismus nach einer initial starken Immunreaktion in einen Zustand der Immundysregulation oder Immunparalyse - auch toleranter Zustand genannt. Die Ursache hierfür ist am ehesten auf eine verminderte bzw. veränderte Monozyten- und Makrophagenaktivierbarkeit zurückzuführen (Biswas und Lopez-Callazo, 2009). Der tolerante Zustand konnte in verschiedenen Studien durch wiederholte Stimulationen mit LPS oder MALP-2 gezeigt werden. Zur Toleranzinduktion in Makrophagen durch vitale *S. pneumoniae* oder *S. aureus* gibt es bislang keine Daten.

Da sowohl IL-37 als auch der tolerante Zustand der Makrophagen durch die TLR-Agonisten LPS und MALP-2 bei Erststimulierung induziert werden können, ist eine Funktion von IL-37 als Mediator der Immunsuppression bzw. des toleranten Zustands von Makrophagen denkbar. Diesbezüglich soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob:

- 1) IL-37 nach Stimulation mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus* vermehrt in Makrophagen exprimiert wird.
- 2) die IL-37-Expression einen Einfluss auf die durch *S. pneumoniae* oder *S. aureus* induzierte Proinflammation von Makrophagen hat.
- 3) der tolerante Zustand der Makrophagen durch Stimulation mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus* induziert werden kann.
- 4) IL-37 einen Einfluss auf das Expressionsmuster von aktivierten Makrophagen im toleranten Zustand hat.

## 5 METHODIK

### 5.1 Geräte und Materialien

#### 5.1.1 Laborgeräte

Tabelle 5.1: Laborgeräte, deren Bezeichnung und Herstellung

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchfluss-Zytometer	Attune™ Auto Sampler	Applied Biosystems®, USA
Elektrophoresekammer		Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Heizschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf, Deutschland
Inkubator	Galaxy 170S	New Brunswick, Deutschland
Kühlschrank 4°C Kühlschrank -20°C	Medline	Liebherr, Deutschland
Kühlschrank -80°C	U725 innova	New Brunswick Scientific, USA
Labor-Feinwaage	Kern EWB 620-2M  AZ124	Kern & Sohn GmbH, Deutschland  Sartorius AG, Deutschland
Lichtmikroskop	Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy, Deutschland
Mikrotiterplater- Photometer	TECAN Infinite® M200	TECAN, Schweiz
Mikrowelle	Typ 7849	Severin, Deutschland
Multi-Imaging-System	Fusion FX7™	PEQlab, Deutschland
OD-Messgerät	BioPhotometer plus	Eppendorf, Deutschland
PCR Thermocycler:	MJ Mini Thermal Cycler S1000™ Thermal Cycler T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
pH-Meter	Seven Compact	Mettler Toledo AG, USA
Pipetboy		INTEGRA Biosciences, Deutschland
Pipetten	Research plus	Eppendorf, Deutschland



Pipettierroboter	CAS-1200	Qiagen, Deutschland
qPCR Thermocycler	Corbett-Rotor Gene 6000	Qiagen, Deutschland
Schüttler	Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, USA
Sequenzierer	Ion Chef System Proton Semiconductor Sequencer	ThermoFisher Scientific, USA
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA
Sterilbank	Maxisafe 2020	Thermo Scientific, USA
Stickstofftank	Biosafe Control $\beta$	Cryotherm GmbH & Co. KG, Deutschland
Tank-Blot-System	Mini PROTEAN® II	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Ultraviolet Crosslinker	UVC 500	Amersham, Biosciences, GE Healthcare Europa GmbH, Deutschland
Vortexer	Vortex Genius 3	IKA®, Deutschland
Wasserbad	TW 20	Julabo, Deutschland
Zentrifugen	Typ 5810 R (Kühlfunktion) Typ 5804 R Typ 5415 Typ 5418 R (Kühlfunktion) Minizentrifuge D-6015 MiniSpin	Eppendorf, Deutschland    neoLab, Deutschland

### 5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.2: Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Material	Hersteller
Zellschaber (Corning® Costar® Cell Lifter)	Corning, USA
ZK-Platten	Corning, USA
Filterspitzen, TipOne®	STARLAB, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Corning® Costar® 6-well Zellkultur-Platten	Sigma-Aldrich, USA
Gefrier Röhrchen (CryoTube™)	Thermo Fisher Scientific, USA

Reservoirire	VWR International, USA
Handschuhe	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Nitrozellulose Membran	Thermo Fisher Scientific, USA
Whatman Filter	
Einwegküvetten	Sarstedt, Deutschland
Sterilium Virugard	VWR International, USA
Korsolin (Korsolex® basic)	BODE Chemie GmbH, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Neubauer-Zählkammer	Roth, Deutschland
Columbia Blutagar	BD Biosciences
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter, USA
EtOH [70 %]	Nordbrand Nordhausen GmbH, Deutschland
Tris-EDTA Pufferlösung	Sigma-Aldrich, Schweiz
Magnetplatte	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, USA

### 5.1.3 Kits und Assays

**Tabelle 5.3: Genutzte Kits und deren Hersteller**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
Innuprep RNA Mini Kit	Analytik Jena, Deutschland	RNA-Isolation
ELISA Kits	eBioscience	ELISA
Cytotoxicity Detection Kit	Roche	LDH Assay
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0, Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific	RNA-AmpliSeq
Fast SYBR® Green Master Mix	Bioline	qPCR
BCA-Assay	Pierce	Proteinbestimmung

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	RT-PCR
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen	DNA-Isolation

### 5.1.4 Software und Datenbanken

**Tabelle 5.4: Verwendete Software und Online-Datenbanken**

Software	Hersteller
Endnote	Thomson Reuters
Microsoft Office 2016	Microsoft
Prism 5.0	Graphpad
Photoshop 6.0	Adobe
Rotor-Gene Q Series 2.0.2	
Datenbank	
Ensembl Genome Browser	
Primer-Blast	
Pubmed	

### 5.1.5 Puffer und Lösungen

**Tabelle 5.5: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung**

Puffer / Lösung	Komponenten
HBSM	150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Hepes pH 7,2
Lyse Puffer (Western Blot)	HBSM 1% Triton TX-100 1% Protease Inhibitor Cocktail 1% PMSF
5x Probenpuffer (Western Blot)	12,5% SDS 50% Glycerin

	0,015% Bromphenolblau 0,3 M Tris-HCl pH 6,8
10x TBS (Tris buffered saline)	1,5 M NaCl 0,1 M Tris pH 7,5
TBS-T	TBS + 0,1% Tween
Blockpuffer (Western Blot)	1x TBS + 5% Milchpulver
10x Transferpuffer (Fertiglösung)	0,2 M Tris 1,5 M Glycin
Transferpuffer (Gebrauch)	1x Transferpuffer + 10% Ethanol
1x Ponceau S	destilliertes Wasser 2 % (w/v) Ponceau S 30 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) 30 % (v/v) Sulfosalicylsäure Fertiges Produkt Sigma Aldrich
ELISA Waschpuffer	PBS + 1% Tween
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)	0,04 M Tris-HCl 2% Essigsäure 2 mM EDTA pH 8,5
SOC-Medium	Auf 1l destilliertes Wasser 20g Pepton 5g Hefextrakt 0,5g NaCl 186mg KCl

	0,5% Glucose
LB-Medium	Auf 1l destilliertes Wasser 10g Pepton 5g Hefextrakt 10g NaCl (100mg Kanamycin)
LB-Agar	LB-Medium + 15g Agar (100mg Kanamycin) (50mg Ampicillin)
THY-Medium	Auf 1l destilliertes Wasser 30g Todd-Hewitt-Bouillon 5g Hefeextrakt
BHI-Medium (Brain-Heart- Infusion)	37g Bacto™ Fertigpulver Auf 1l destilliertes Wasser
Bacto™ Brain Heart Infusion	7,7g Kalbshirn 9,8g Rinderherz 10g Pepton 2g Dextrose 5g NaCl 2,5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

### 5.1.6 Antikörper

**Tabelle 5.6: Verwendete Antikörper und deren Hersteller**

Antikörper	Hersteller	Verwendung
anti IL-1H4	P. Bufler	Western Blot 1:4000
Anti KC 14	Proteogenix SAS	IP
Ziege anti Maus HRP	Dianova GmbH	Western Blot 1:5000

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Zelllinie

Gegenstand aller Versuche waren RAW 264.7-Zellen. Hierbei handelt es sich um eine Makrophagenzelllinie, die aus einem Tumor des murinen Leukämievirus männlicher Mäuse isoliert wurden. Die Zellen wurden erstmals von Raschke *et al.* Im Jahr 1976 beschrieben.

### 5.2.2 Kulturbedingungen

Die RAW 264.7-Zellen wurden auf Adhäsionsplatten in DMEM mit 4 mM L-Glutamin, 10% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert (Tab. 5.7). Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mithilfe von sterilen Zellschabern vom Boden gelöst und gut resuspendiert um Klumpen zu lösen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte manuell durch Zählen mithilfe einer Neubauerkammer. Zuvor wurden tote Zellen mit 0,1%igem Trypanblau gefärbt. Je nach Bedarf wurden 500000 Zellen pro ml frischem Medium ausgesät.

**Tabelle 5.7: Verwendete Medien für die Zellkultur**

Medium oder Reagenzien	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose, GlutaMAX™	Gibco
Dulbecco's PBS	
Opti-MEM	
Penicillin/Streptomycin	

### 5.2.3 Kryokonservierung der RAW264.7-Zellen

Die RAW 264.7-Zellen wurden mithilfe von sterilen Zellschabern vom Boden gelöst, in ein Falcon überführt und 5 Minuten bei 150g zentrifugiert. Altes Medium wurde abgesaugt, anschließend wurde das Pellet in neuem Medium resuspendiert, welches neben den regulären Medium-Komponenten zusätzlich 5% DMSO und 10% FCS enthielt. Anschließend wurden jeweils 2 Millionen Zellen pro ml in Gefrier Röhrchen aliquotiert. Diese wurden zunächst für 2 Tage bei -80°C langsam eingefroren bevor sie in den Stickstofftank (-180°C) überführt wurden.

### 5.2.4 Auftauen der RAW 264.7-Zellen

Nachdem das Nährmedium auf 37°C vorgewärmt wurde, wurden die Kryoröhrchen in den Händen oder im Wasserbad schnell erwärmt. Nach kurzer Resuspension wurde der Inhalt der Gefrier Röhrchen in Falcons überführt und dabei in das vorgewärmte Medium (ca. 7 ml) gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 130g

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und damit das DMSO entfernt. Das Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen anschließend auf einer 6cm-Adhäsionsplatte ausplattiert.

## 5.3 Transfektion der RAW 264.7-Zellen

### 5.3.1 Der Vektor

Für die Transfektion der RAW 264.7-Zellen mit dem humanen IL-37b wurde der Vektor pIRES2-EGFP genutzt, welcher von M. Nold zur Verfügung gestellt wurde. Er enthält die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Encephalomyokarditisvirus (ECMV) zwischen der Multiplen Cloning Site (MCS) und einer EGFP codierenden Region. Zusätzlich wurden Resistenzgene gegen Kanamycin und Neomycin eingebracht (Abb. 5.1), wobei letzteres die Selektion mit G418 ermöglicht. Das IL-37-Gen wurde an den Schnittstellen EcoR1 und BamH1 der MCS eingefügt. Als Kontrolle zu den IL37-Versuchen diente ein Leervektor ohne Insert in der MCS.

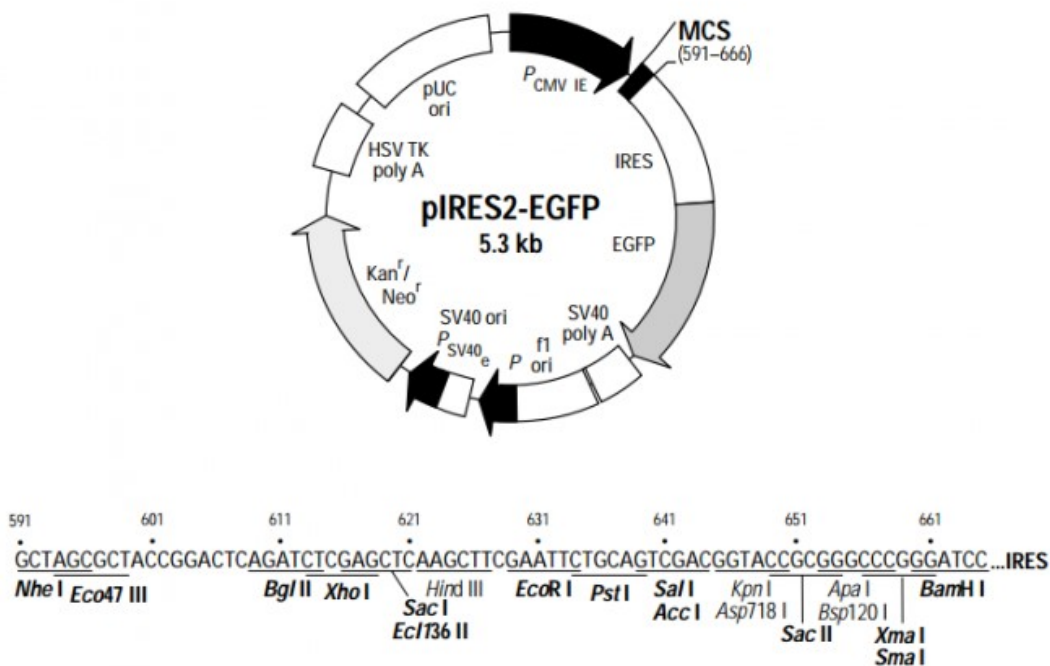


Abb. 5.1: Restriktion Map und Multiple Cloning Site (MCS) des Vektor pIRES2-EGFP

### 5.3.2 Transformation der Plasmide in E. coli

100 µl kompetente E. coli wurden aufgetaut und im gekühlten Eppendorfgefäß mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 45 Sekunden auf exakt 42°C erwärmt und anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium inkubierten die Bakterien eine Stunde bei 37°C. Zur Überprüfung der erfolgreichen Aufnahme der Plasmide wurden die Bakterien später auf mit Ampicillin (50 µg/ml) bzw. Kanamycin (100 µg/ml)

versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen. Während auf der Ampicillin-Platte kein Wachstum zu verzeichnen war, waren zahlreiche Kolonien auf der Kanamycin-Platte zu sehen. Nichttransformierte Bakterien hingegen wuchsen auf der Kanamycin-Platte nicht. Eine Kolonie der auf dem LB-Kanamycin-Agar gewachsenen E. coli wurde in 1ml flüssiges LB-Kanamycin-Medium überführt und inkubierte über Nacht bei 37°C und 300 rpm im Schüttler. Die o.g. Schritte wurden je einmal für den Leervektor (pIRES2/empty) und für den das IL-37-Gen enthaltenden Vektor (pIRES2/IL-37) durchgeführt.

### 5.3.3 DNA-Isolation

Am nächsten Tag wurden die Kulturen 1:1000 in frischem kanamycinhaltigem LB-Medium verdünnt und erneut 16h im Schüttler bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des QIAGEN-Plasmid-Midi-Kits nach dessen spezifischem Protokoll isoliert und lag zum Schluss in sterilem Wasser gelöst vor. Die Menge der gewonnenen DNA wurde mittels UV-Spektrometrie bei 260 nm am NanoDrop gemessen.

### 5.3.4 Restriktionsendonuklease-Verdau

Mithilfe von Restriktionsenzymen können DNA-Stränge an bestimmten Basensequenzen zerschnitten werden. Findet dieser Vorgang an 2 verschiedenen Positionen statt, kann aus einem zirkulären Plasmid ein DNA-Fragment bestimmter Länge, welches durch Gelelektrophorese und Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann, herausgeschnitten werden. Diese Methode wurde genutzt um das Gen für IL-37b in der zur Verfügung gestellten Plasmid-DNA nachzuweisen. Hierfür wurde der folgende Mix aus DNA, Restriktionsenzymen und Puffer (Tab. 5.8) für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend fand die Gelelektrophorese bei 130V statt. Anhand des zurückgelegten Weges und dem Marker DNA-ladder konnte dann auf die Größe des Fragments geschlossen werden.

**Tabelle 5.8: Zusammensetzung des Master-Mix für den Restriktionsendonuklease-Verdau**

Komponente	Menge pro Probe
Plasmid-DNA	1 µg
10x Puffer je nach Restriktionsenzym	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
Nuclease-freies Wasser	Rest
Gesamtvolumen	20 µl



### 5.3.5 Transfektion der RAW 264.7-Zellen

Für die Transfektion wurde das FuGENE HD Transfektionsreagenz von Promega genutzt. Am Tag vor der Transfektion wurden die RAW 264.7-Zellen gesplittet, und nach zentrifugieren in OptiMEM Medium resuspendiert (500000 Zellen pro ml). Anschließend wurden jeweils 1 ml der Suspension (500000 Zellen) in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben und über Nacht inkubiert. Von der gewonnenen Plasmid-DNA wurden 2,2 µg in 102 µl OptiMEM gelöst (0,02µg/µl). Zur gelösten DNA wurden dann 7,7 µl FuGENE HD Reagenz gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 50 µl des Mixes in die entsprechenden Wells mit den RAW 264.7-Zellen vom Vortag gegeben und gut im Medium vermischt. Nach 2 Tagen erfolgte ein kompletter Wechsel des Mediums ohne die Zellen abzuschaben sowie die Zugabe von G418 zur Selektion.

### 5.4 Zellstimulation

Für die Induktion von Proinflammation und Toleranz in RAW-264.7-Zellen wurden die in Tab. 5.9 dargestellten Reagenzien bzw. Pathogene genutzt:

**Tabelle 5.9: Stimulanzen zur Induktion von Proinflammation oder Toleranz**

Stimulanz	Spezies	Gram +/-	Rezeptor	Hersteller
LPS	<i>Salmonella minnesota</i>	-	TLR4	Invivogen, USA
Pam3CSK4(P3C)	synthetisch	+	TLR2/1	Invivogen, USA
MDP		+/-	NOD2	Invivogen, USA
Malp-2	<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	TLR2/6	Enzo Life Sciences, UK
<i>S. pneumoniae</i> D39wt	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	TLR 2	AG Slevogt, UKJ
<i>S. pneumoniae</i> D39Δcps	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	TLR 2	AG Slevogt, UKJ
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	TLR2	<b>S. aureus</b> strain 6850 (53657; ATCC), Manassas, USA, AG Löffler, UKJ

### 5.4.1 Kultivierung von *Streptococcus pneumoniae*

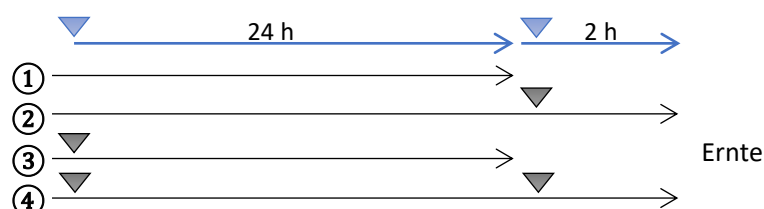
Tiefgefrorene (-80°C) Kryoröhrchen mit den Bakterien wurden auf Trockeneis unter eine sterile Werkbank transportiert. Mit einer sterilen Impföse wurde ein kleiner Teil des Eis-Bakterien-Gemischs entnommen und auf einer Columbia-Blutagar-Platte (BD Biosciences) ausgestrichen. Der Rest des Stocks wurde sofort wieder bei -80°C eingefroren, ohne dass die Bakterien zwischendurch antauten. Die ausgestrichenen Bakterien blieben über Nacht – jedoch nicht länger als 12 Stunden – bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Am nächsten Morgen wurden Einzelkolonien von der Agarplatte mithilfe eines sterilen Wattestäbchens in 10 ml flüssiges THY-Medium überführt, bis eine Start-OD<sub>600nm</sub> von 0,045-0,06 erreicht wurde. Anschließend inkubierten die Bakterien im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis sie auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,285 herangewachsen waren. Bei dieser OD liegen die Bakterien in einer Konzentration von 1x10<sup>8</sup> cfu/ml vor. Sobald die OD erreicht wurde, wurden die Bakterien 5 Minuten bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte ein Waschschriff mit PBS, bevor sie in der gewünschten Menge Medium resuspendiert und zur Stimulation genutzt wurden.

### 5.4.2 Kultivierung von *Staphylococcus aureus*

Die gefrorenen *S. aureus* wurden auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Einzelkolonie in flüssiges BHI-Medium überführt und 16 Stunden bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 4800 rpm zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS bevor die Bakterien in der gewünschten Menge PBS aufgenommen wurden. Die vorliegende Suspension wurde auf OD<sub>600nm</sub>=1 verdünnt. Ein Teil der Suspension wurde erneut 1:10<sup>6</sup> und 1:10<sup>7</sup> verdünnt und jeweils 10 µl der Verdünnung auf Columbia-Blutagar ausgestrichen um die Bakterienkonzentration der Stocklösung zu bestimmen.

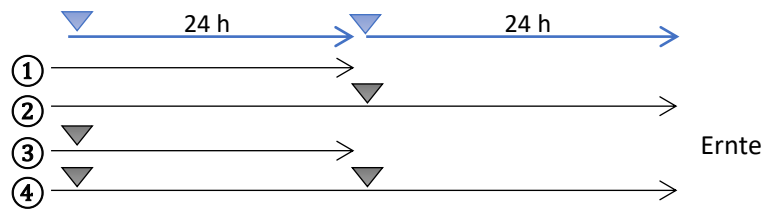
### 5.4.3 Stimulationsschema für die qPCR-Analyse der Toleranzinduktion

Die RAW 264.7-Zellen wurden 4 Stunden vor der Stimulation ausplattiert um adhärent zu werden. Anschließend wurden sie mit diversen Stimulanzen nach dem folgenden Schema inkubiert (Abb. 5.2, 5.3):



**Abb. 5.2: Stimulationsschema für Experimente der Toleranzinduktion mittels qPCR:** Die Zellen wurden wie folgt behandelt: ① Kontrolle ohne Stimulation für 24h, ② 24h ohne Stimulation mit darauffolgender zweistündiger Stimulation zur Induktion der Proinflammation ③ Stimulation für 24h ④ Toleranzinduktion mit Prestimulation für 24h und Restimulation für 2h.

#### 5.4.4 Stimulationsschema für die ELISA-Analyse der Toleranzinduktion



**Abb. 5.3: Stimulationsschema für Experimente der Toleranzinduktion mittels ELISA:** Die Zellen wurden wie folgt behandelt: ① Kontrolle ohne Stimulation für 24h, ② 24h ohne Stimulation mit darauffolgender 24-stündiger Stimulation zur Induktion der Proinflammation ③ Stimulation für 24h mit anschließenden 24h Ruhe ④ Toleranzinduktion mit Prestimulation für 24h und Restimulation für 24h.

### 5.5 Molekularbiologische Methoden

#### 5.5.1 RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA aus den RAW 264.7-Zellen wurde das innuPREP RNA Mini Kit von Analytik Jena verwendet. Die adhärenenten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 2 Minuten mit 400 µl des mitgelieferten Lysepuffers bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen im Lysepuffer von der Platte abgeschabt und 50-100 Mal auf- und abpipettiert um die Viskosität zu verringern. Nach weiterer dreiminütiger Inkubation im Lysepuffer wurde die Suspension auf einen im Kit enthaltenen Vorfilter überführt und zentrifugiert (2 min | 10000g | RT). Dieser hält genomische DNA zurück während die RNA ihn vollständig passiert. Dadurch konnte auf einen DNase I Verdau verzichtet werden. Das Filtrat wurde mit 400 µl 70%igem Ethanol versetzt (Verhältnis 1:1), gut gemischt und auf den RNA-Filter überführt. Die weiteren Schritte erfolgten nach beigelegtem Protokoll. Abschließend wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration am NanoDrop 1000 mittels UV-Spektrometrie nach Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Die Reinheit der gewonnenen RNA wurde durch die Verhältnisse  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  gemessen. Während Nukleinsäuren bei 260 nm absorbieren, absorbieren Verunreinigungen bei 230 nm bzw 280 nm. Ein Verhältnis von 1,8-2,1 entspricht laut Hersteller der durchschnittlichen Reinheit. Im Falle einer Kontamination durch Proteine oder andere Substanzen liegt das Verhältnis unter dem Zielbereich.

#### 5.5.2 cDNA-Synthese

Mithilfe der reversen Transkriptase kann aus der isolierten RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Anschließend wird der synthetisierte DNA-Strang durch Polymerase-Ketten-Reaktion exponentiell vervielfältigt. Für die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) wurden neben der gewonnenen RNA auch Synthesepriemer, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), die Reverse Transkriptase sowie ein adäquater Puffer benötigt. Ein optionaler RNase-Inhibitor wurde hinzugefügt. Die nötigen Reagenzien wurden dem High Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) entnommen und wurden vom Pipettierroboter (CAS-1200, Qiagen, Germany) nach dem in Tab. 5.10 dargestellten Schema pipettiert. Anschließend fand die cDNA-Synthese im Thermocycler unter dem in Tab. 5.11 dargestellten Programm statt. Für die folgenden Versuche wurde eine negative Kontrolle (Kontrolle auf genomische DNA) geschaffen, welche bei diesem Schritt nur Wasser an Stelle des Master-Mixes enthielt.

**Tabelle 5.10: Reagenzien für die cDNA-Synthese**

Komponente		Menge pro Probe	Hersteller
Master-Mix (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit)	10x reaction buffer	2 µl	Applied Biosystems, Littauen
	dNTP Mix	0,8 µl	
	10x RT Random Primers	2 µl	
	RNase Inhibitor	1 µl	
	MultiScribe® Reverse Transkriptase	1 µl	
RNA		2 µg	
RNase-freies Wasser		Rest	
Gesamtvolumen		20 µl	

**Tabelle 5.11: Programm für die cDNA-Synthese im Thermocycler**

Schritt		Thermocyclerbedingungen	
		Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Binden der Primer	25	10:00
2	Reverse Transkription	37	120:00
3	Enzyminaktivierung	85	5:00
4	Kühlung	4	∞

### 5.5.3 Semiquantitative PCR

Die synthetisierte cDNA wird hierbei an einer gewünschten Stelle durch spezifische Primer exponentiell vervielfacht, sodass spezielle Gene vervielfältigt werden können. Neben den Primern wurden hierfür die Taq-Polymerase, dNTPs und ein adäquater Puffer benötigt (vgl. Tab. 5.12). Die 3 typischen Schritte der PCR sind Denaturierung, Binden der Primer und die Elongation. Sie laufen bei spezifischen Temperaturen ab (vgl. Tab. 5.13). Die Menge des synthetisierten DNA-Abschnitts hängt von der Anzahl der Zyklen ab. Mit jedem Zyklus wird die hergestellte DNA theoretisch verdoppelt.

Diese Methode diene vorrangig zum Nachweis, ob bestimmte Gene im Genom der RAW-Zellen vorhanden sind. Über die Stärke der Expression können durch sqPCR jedoch keine zuverlässigen Aussagen getroffen werden.

**Tabelle 5.12: Reagenzien für die sq-PCR**

Komponente		Menge pro Probe	Hersteller
Master-Mix	Nuclease-freies Wasser	18,875 µl	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, USA
	10x Taq reaction buffer	2,5 µl	Jena BioScience, Deutschland
	dNTP Mix	0,5 µl	
	Taq-Polymerase	0,125 µl	
Primer F (Forward) [100 pmol/µl]		0,5 µl	Eurofins MWG Operon, Deutschland
Primer R (Reverse) [100 pmol/µl]		0,5 µl	Eurofins MWG Operon, Deutschland
cDNA [1,5 µg in 30 µl]		2 µl	
Gesamtvolumen		25 µl	

**Tabelle 5.13: Programm für die sq-PCR**

Schritt		Thermocyclerbedingungen		
		Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	Initialisierung	94	2:00	34 Zyklen
2	Denaturierung	94	0:30	
3	Binden der Primer	60	0:30	
4	Elongation	72	0:20	
5	Letzte Verlängerung	72	2:00	
6	Kühlung	10	∞	

#### 5.5.4 Agarose Gelelektrophorese

Die Auswertung der sqPCR erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese. Diese Methode ermöglicht u.a. die Trennung von Nukleinsäuren nach ihrer Länge bzw. Masse, indem diese entlang eines elektrischen Gradienten vom Minus- zum Pluspol durch das Gel bewegt werden. Dabei laufen kurze und leichte DNA-Segmente schneller und weiter durch das Gel als lange und schwere. Anhand standardisierter

Marker kann dann von der zurückgelegten Strecke auf die Molekülmasse bzw. auf die Anzahl der Basenpaare geschlossen werden. Nach der sqPCR wurde das Produkt mit DNA Gel Loading Dye (enthält Bromphenolblau und Xylencyanol FF) versetzt, um die DNA-Migration mit bloßem Auge beurteilen zu können. Um die DNA selbst sichtbar zu machen wurde GelRed™ – ein Fluoreszenzfarbstoff – zum 2%igen Agarosegel hinzugefügt (vgl. Tab. 5.14). Die Elektrophorese lief eine Stunde bei 130V. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Multi-Imaging-Systems Fusion FX7™.

**Tabelle 5.14: Reagenzien für die Gelelektrophorese**

Komponente		Menge pro Probe	Hersteller
Gel	1x TAE-Puffer	Tris-HCl [ph 8,5]	0,04 M Roth, Deutschland
		Essigsäure	0,1% Sigma-Aldrich, Deutschland
		EDTA	2 mM Serva, Deutschland
			120 ml
	Biozym LE Agarose	1,9g Biozym, Österreich	
	GelRed™	12 µl Biotium, USA	
Probe	sqPCR Produkt	25 µl -	
	6x Loading Dye	5 µl ThermoFisher Scientific, Deutschland	
	Gesamtvolumen	30 µl	

### 5.5.5 quantitative PCR (qPCR)

Im Gegensatz zur sqPCR ermöglicht diese Methode, Aussagen zum Expressionslevel bestimmter Gene zu treffen. Hierbei wird die PCR mit Fluoreszenztechniken kombiniert. Bei dem Gerät, welches für diese Arbeit genutzt wurde, korrelierte die Stärke der Fluoreszenz mit der Produktkonzentration der PCR. Das Expressionslevel der untersuchten Gene wurde dann mit dem Expressionslevel eines Housekeeping-Gens verglichen. Dadurch konnten Veränderungen festgestellt werden, die nur auf besondere Stimuli zurückzuführen sind. Für den Vorgang wurde ein vorgefertigter Master-Mix mit den gewünschten Primern und der cDNA nach dem in Tab. 5.15 dargestellten Schema vom Pipettierroboter (CAS-1200, Qiagen) pipettiert. Eine Probe, die zuvor während der cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase enthielt, diente als negative Kontrolle. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das Programm des Thermocyclers (Corbett-Rotor Gene 6000, Qiagen) ist Tab. 5.16 zu entnehmen.

**Tabelle 5.15: Reagenzien für die qPCR**

Komponente	Menge pro Probe	Company
2X SensiMix™ SYBR® No-ROX Kit	10 µl	Bioline, Großbritannien
Primer F [0.2 µM]	0,4 µl	Eurofins MWG Operon, Deutschland
Primer R [0.2 µM]	0,4 µl	Eurofins MWG Operon, Deutschland
cDNA	4 µl	-
Nuclease-freies Wasser	Rest	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, USA
Gesamtvolumen	20 µl	

**Tabelle 5.16: Programm der qPCR**

Schritt	Thermocyclerbedingung		
	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	95	10:00	40 Zyklen
2	95	0:15	
3	60	0:20	
4	72	0:20	

Als Housekeeping-Gen wurde die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1) verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-green war im vorgefertigten Master-Mix enthalten. Die relative Genexpression wurde nach einer Methode nach Pfaffl bestimmt. Hierbei wird das relative Expressionslevel anhand der Primereffizienz und des Schwellenzyklus berechnet. Die Ergebnisse wurden anhand des Housekeeping-Gens normalisiert und anschließend logarithmiert analysiert. Hierzu diente die Software GraphPad PRISM v5.0.

### 5.5.6 Primer-Design

Primer sind kurze Nukleinsäuren mit bestimmter Basensequenz, die an die zugehörigen komplementären Abschnitte von DNA oder RNA binden können, und dadurch den Startpunkt der Polymerasen festlegen. Dadurch kann ein gewünschter Abschnitt innerhalb des Genoms gezielt repliziert werden. Die Primer dienen dabei als Begrenzung der gewünschten Sequenz an beiden Enden. Aus diesem Grund werden immer 2 Primer pro Zielsequenz benötigt, jeweils einer in 5'-3'- und einer in 3'-5'-Richtung. Zusätzlich muss sichergestellt sein, dass die Primersequenz nur an einer bestimmten Stelle der gesamten DNA bindet, um ungewollte Amplifikate auszuschließen. Das Primerpaar muss außerdem eine nahezu identische

Schmelztemperatur besitzen, welche zwischen 58°C und 60°C liegt. Um Amplifikate genomischer DNA zu vermeiden, können die Primer an Exon-Exon-Übergängen platziert werden. Für das Primerdesign wurden der Genom-Browser Ensembl sowie die Software Primer-Blast verwendet. Die spezifischen Kriterien hierfür waren:

[1] Länge der Primersequenz: ca. 20 Basenpaare

[2] Guanin/Cytosin-Anteil: 40-60 %

[3] Selbstkomplementarität: < 5,0

[4] spezifische Bindungsstellen

Tabelle 5.17 zeigt eine Übersicht der verwendeten forward and reverse Primer.

**Tabelle 5.17: Mausprimer für sqPCR und qPCR**

Primer	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge	Hersteller
mHPRT1	F.: TTCTTTGCTGACCTGCTGGA R.: TATGTCCCCCGTTGACTGAT	123	Eurofins MWG Operon, Germany
IL-37	F.: GGAAGTCCGATTCTCCTGGGGGT R.: GGCCGGCGTGCTGATTCCTT	143	
mTNF-α	F.: GGCCTCCCTCTCATCAGTTC R.: TTTGCTACGACGTGGGCTAC	95	
mSIGIRR	F.: TTTGGTGAACCTGAGTCGCT R.: CTCTGGCCCTCAAAGGTGAT	153	
mIL18Rα	F.: CTCCCTGTCTGTTGTCACAGT R.: GGTATCTCTTGTTCAGGATCGTT	224	
mTLR2	F.: TTGCTGGGCTGACTTCTCTC R.: CTTCATCTACGGGCAGTGGT	231	
mGdf15	F.: AGCCGAGAGGACTCGAACT R.: AGGGGCCTAGTGATGTCCC	206	
mMmp9	F.: CAGCCGACTTTTGTGGTCTTC R.: CCTTTAGTGTCTGGCTGTCCA	208	
mClec2d	F.: ATTGGCCTGCACAGAGAGTC R.: ACTGCTGATCCCGTTGTTGT	126	



mIL-27	F.: CTGCTACCCTTGCTTCTGGT R.: CAGGAGGTCCAGGTTCACTC	186	
mSlamf1	F.: CAGCATCTACAACCTGCACCG R.: ATTGCCGTGAAAACCAGGATG	171	
mLypd2	F.: CCTGTGCGAATCCTGTGAGT R.: CATCCACATCCGAAGGCTCA	171	
mCcl22	F.: CTACATCCGTCACCCTCTGC R.: CTTCTTCACCCAGACCTGCC	142	
mPdcd1	F.: GCCCGCTTCCAGATCATACA R.: ATGCCTTGAAACCGGCCTT	230	

### 5.5.7 Transkriptomanalyse / Next-Generation-Sequencing (NGS): RNA-AmpliSeq

Diese hochsensitive Methode ermöglicht die Quantifizierung von mehreren tausend Transkripten in einem Lauf, wobei nur eine äußerst geringe Menge RNA bzw. cDNA gebraucht wird. Hierbei wird eine PCR-Amplifikation mit einer darauffolgenden Sequenzierung kombiniert. Die aus RNA synthetisierte cDNA wird über eine Multiplex-PCR in wenigen Zyklen amplifiziert und die entstandenen Fragmente anschließend für die Identifikation und Quantifizierung sequenziert. Die Ion Torrent™-Technologie übersetzt mithilfe eines Halbleiterchips die Informationen der Nukleotide (A, C, T, G) in digitale Daten (0, 1). Um spezifische Regionen zu amplifizieren wurde ein spezieller Primer Pool hergestellt und über Invitrogen/Thermo Fisher bezogen. Dieser Pool besteht aus 1822 Primern für 911 Zielgene, die für das Immunsystem und besonders für die Funktionalität von Monozyten und Makrophagen von Bedeutung sind. Zur späteren Identifizierung wird an jede Probe ein Barcode-Adapter geheftet. Dieses Konstrukt wird als Library bezeichnet. Danach wird eine Emulsions-PCR durchgeführt, bei der die Fragmente der Library auf die Oberfläche von Nanokügelchen (Ion-Sphere-Beads) in Öl umgeben von Wasser amplifiziert werden. Dieses Bead-Library-Konstrukt wird auf einem Chip mit 160 Millionen Wells sequenziert. Der pH-sensitive Feldeffekttransistor (pHFET) detektiert Wasserstoff-Ionen (H<sup>+</sup>) und ordnet durch pH-Wertänderungen die zugehörige Nukleinbase zu.

Die Konzentration der durch RT-PCR synthetisierten cDNA wurde am Spektrophotometer (NanoDrop 1000) gemessen. Für die Herstellung der Library wurden 100ng cDNA pro Probe als Ausgangsmaterial verwendet. Den ersten Schritt stellt die Amplifikation der Zielgene dar. Die benötigte Menge an cDNA wurde zum vorgefertigten Master-Mix und dem Primer-Pool (Tab. 5.18) hinzugefügt und unter speziellen Bedingungen (Tab. 5.19) amplifiziert. Anschließend wurden 2 µl FuPa-Reagenz zugegeben um die Primersequenzen unter den in Tabelle 5.19 dargestellten Thermocyclerbedingungen zu entfernen. Für die Ligation der Barcodes wurde zunächst ein Mix aus Ion P1 Adaptern und den Ion Xpress™ Barcodes (vgl. Tab. 5.18)

hergestellt. 2 µl des Adaptermixes wurden anschließend mit 4 µl Switch-Lösung und 2 µl DNA-Ligase versetzt und zu der Probe (22 µl) gegeben (Tab. 5.18). Die Ligation der Adapter an die cDNA erfolgte erneut unter speziellen Thermocyclerbedingungen (vgl. Tab. 5.19). Die mit Barcodes behafteten DNA-Fragmente wurden mithilfe von Agencourt AMPure XP Kügelchen und einer Magnetplatte aufgereinigt, sodass DNA-Fragmente ohne Barcode beseitigt wurden. Die Library wurde anschließend mittels qPCR quantifiziert. Hierfür wurde das Ion Library TaqMan™ Quantification Kit verwendet. Eine *E. coli* DH10B Ion Kontroll-Library diente als Standard für verschiedene Konzentrationen an DNA. 10 µl 2xTaqMan® MasterMix wurden mit 1 µl 20xTaqMan® Assay gemischt, bevor 9 µl verdünnter Library (1:100) bzw. Standard zugegeben wurden. Anhand der qPCR wurde die Library-Konzentration ermittelt und auf 100 pM verdünnt. Anschließend wurden die Proben bis zur Sequenzierung auf -80°C gelagert.

**Tabelle 5.18: Reagenzien für die RNA-AmpliSeq**

Komponenten		Menge pro Probe
<b>Amplifikation der Zielgene</b>		
5x Ion Ampliseq™ HiFi Mix		4 µl
5x Ion Ampliseq™ RNA Panel (Ion AmpliSeq Designer, 911 primers*)		4 µl
cDNA		100 ng
Nuclease-freies Wasser		Rest
Gesamtvolumen		20 µl
<b>Anheften der Barcodes</b>		
Mastermix	Ion P1 Adapter	1,4 µl
	Ion Xpress Barcode	1,4 µl
	Nuclease-freies Wasser	2 µl
	Gesamtvolumen pro Well	2 µl
Switch Solution		4 µl
DNA ligase		2 µl
Gesamtvolumen		30 µl
<b>Quantifizierung der Library</b>		
Mastermix	2x TaqMan® MasterMix	10 µl
	20x Ion TaqMan® Assay	1 µl
Ion AmpliSeq™ Library (1:100) bzw. <i>E. coli</i> DH10B Ion Kontroll-Library [6.8 pM   0.68 pM   0.068 pM]		9 µl

Gesamtvolumen	20 µl
---------------	-------

**Tabelle 5.19: Thermocyclerbedingungen für die RNA-AmpliSeq:** Anzahl der Zyklen für 769-1.536 Primerpaare pro Pool = 15 Zyklen. \* 4 Minuten für ≤ 1536 Primerpaare pro Pool.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
<b>Amplifikation der Zielgene</b>			
1	99	2:00	15 Zyklen
2	99	0:15	
3	60	4:00*	
4	10	∞	
<b>Entfernen der Primersequenzen</b>			
1	50	10:00	
2	55	10:00	
3	60	20:00	
4	10	max 60:00	
<b>Anheften der Barcodes</b>			
1	22	30:00	
2	72	10:00	
3	10	max 60:00	

## 5.6 Proteinbiochemische Methoden

### 5.6.1 Solubilisierung der RAW 264.7-Zellen

Zur Lyse der Zellen wurde HBSM-Puffer (Hepes-buffered saline magnesium) hergestellt (vgl. Tab. 5.20). Die adhärenenten Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, anschließend in 300 µl Lyse-Puffer abgeschabt und 1h bei 4°C lysiert. Danach wurde das Lysat für 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die solubilierten Bestandteile. Die nichtlöslichen Bestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett verblieben im Pellet.

**Tabelle 5.20: Zusammensetzung Lyse-Puffer**

Komponente		Menge	Hersteller
HBSM	NaCl	150 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
	Hepes [ph 7,2]	20 mM	
Lyse-Puffer	HBSM	970 µl	
	Triton TX-100	10 µl	
	Protease-Inhibitor-Cocktail	10 µl	
	PMSF	10 µl	
	Gesamtvolumen	1 ml	

### 5.6.2 Immunpräzipitation IL-37

Durch Immunpräzipitation können sehr gering konzentrierte Stoffe im Western Blot nachgewiesen werden, indem sie durch Antikörperreaktionen vom Rest der Lösung getrennt und anschließend in geringerem Volumen aufkonzentriert werden. Zu Beginn wurden die Zellen auch hier 3x mit PBS gewaschen, in 700 µl Lyse-Puffer abgeschabt und eine Stunde bei 4°C lysiert. Währenddessen wurden je Probe 2 µg anti-KC14 in 50 µl 50%iger Protein-A-Sepharose gelöst und ebenfalls eine Stunde bei 4°C auf dem Rotor inkubiert, sodass der Fc-Teil des Antikörpers an das Protein-A binden konnte. Das Zelllysate wurde 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das dabei entstandene Pellet verworfen. Die Antikörper-Sepharose-Lösung wurde 3x in HBSM gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu beseitigen. Das Bead-Pellet wurde je nach Probenanzahl in gewünschter Menge HBSM aufgenommen, gut resuspendiert und anschließend je nach Probenanzahl zu gleichen Teilen auf neue Eppendorfgefäße verteilt. Danach wurden die Zelllysate zur Sepharose-Antikörper-Lösung hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Rotor inkubiert. Hier erfolgt die Bindung des gesuchten Antigens (IL-37) an den Antikörper (anti-KC14). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben 3x mit HBSM gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die verbleibende Flüssigkeit restlos entfernt, sodass nur noch die Sepharose-Kügelchen zu sehen waren. Nach Zugabe von 20 µl 2x Probenpuffer wurde die Probe für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, sodass sich die Sepharose vom Antikörper bzw. Antigen löst. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte mittels Western Blot

### 5.6.3 Bestimmung der Proteinmenge

Die Bestimmung der Protein Mengen erfolgte anhand des BCA-Assays (Bichinonin-4-Carbonsäure) der Firma Pierce. Hierfür wurden 4 µl pro Probe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mit jeweils 200 µl Working Reagenz, welches aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B aus dem Kit besteht, versetzt. Nach 30-

minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm im ELISA-Reader (TECAN Infinite® M200) gemessen. Mithilfe von Standard-Albumin-Lösungen mit bekannter Konzentration wurde eine Eichreihe erstellt, die zur Proteinbestimmung der unbekannt Proben diente.

#### 5.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Masse getrennt werden. Dafür wurden die Proben zunächst mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Durch das im Puffer enthaltene DTT werden Disulfidbrücken gelöst und hydrophobe Bereiche freigelegt. Anschließend wurden die Proben auf ein vorgefertigtes Gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, Biorad) pipettiert und eine Spannung von 130 Volt angeschlossen. Die Proteine bewegen sich durch das angelagerte SDS, welches negativ geladen ist, entlang des elektrischen Gradienten vom Minus- zum Pluspol. Da man davon ausgeht, dass die angelagerte Menge SDS nahezu linear proportional zur Größe des Proteins ist, bewegen sich die Proteine umso schneller, je kleiner ihre Masse ist. Durch den gleichzeitigen Lauf von Proteingrößen-Standards konnte anhand des zurückgelegten Weges auf die scheinbare Molekülmasse geschlossen werden. Verschiedene Proteine gleicher Masse konnten so jedoch nicht unterschieden werden. Die SDS-PAGE fand in der Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell) von Biorad statt.

#### 5.6.5 Western Blot

Von den zahlreichen nach Masse aufgetrennten Proteinen sollten einige spezifische durch Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür wurden sie mittels Western Blot vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dabei wurde das Gel zunächst der Elektrophorese-Apperatur entnommen und in Transferpuffer gelagert, während die Blot-Kammer (Mini Trans-Blot® Cell) nach dem folgenden Schema (vgl. Abb. 5.4) vorbereitet wurde. Der Transfer erfolgte auf Eis bei 280 mA für 90 Minuten. Anschließend wurde die Membran eine Minute mit Ponceau S gefärbt um die Übertragung der Proteine sicherzustellen. Ponceau S wurde mit 1%iger Essigsäure ausgewaschen bevor die Membran für mindestens eine Stunde bei 4°C in Blockpuffer geschwenkt wurde.

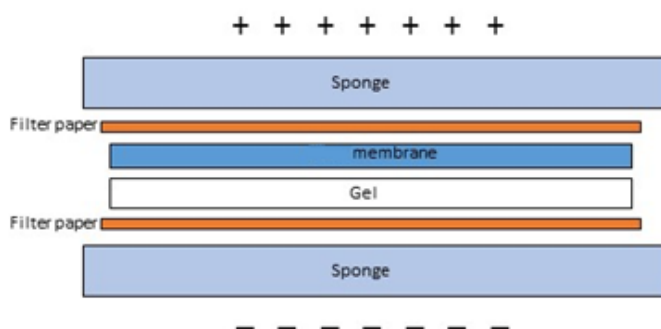


Abb. 5.4: Aufbau der Blotkammer für den Western Blot

Anschließend wurde die Membran 6x mit TBS-T (Tab. 5.5) gewaschen um den Blockpuffer zu entfernen. Nach Zugabe eines primären Antikörpers gegen das gesuchte Protein inkubierte der Blot über Nacht schwenkend bei 4°C. Am Folgetag wurde die Membran erneut 6x mit TBS-T gewaschen bevor sie für 2 Stunden mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (AK gegen den primären AK) versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte erneut schwenkend bei 4°C. Danach wurde die Membran weitere 3x mit TBS-T und 3x mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit Luminol versetzt, welches der an den sekundären Antikörper konjugierten Meerretichperoxidase als Substrat dient. Diese Reaktion, bei der Lichtquanten abgegeben werden, kann mithilfe eines Chemilumineszenz-Detektor (Multi-Imaging-System Fusion FX7™, PEQlab) sichtbar gemacht werden.

### **5.6.6 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Während der Western Blot zum qualitativen Nachweis und relativer Quantifizierung bestimmter Proteine diente, wurden ELISAs zur absoluten Quantifizierung von Zytokinen verwendet. Hierfür wurden Zellkulturüberstände unter den o.g. Bedingungen zur Toleranzinduktion abgenommen und analysiert. Dabei wurden als ELISA-Kit von eBioscience gegen TNF verwendet. Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Antigen beschichtet. Dabei wurde der Antikörper 1:250 im mitgelieferten Coating Buffer gelöst. Jedes Well der Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl der Antikörperlösung befüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte 3x mit PBS-Tween gewaschen, bevor die Wells für eine Stunde mit jeweils 200 µl der mitgelieferten Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Währenddessen wurde der lyophilisierte Standard des Kits vorbereitet. Zunächst wurde er in 1 ml Wasser gelöst bevor er weiter in Blocklösung verdünnt wurde um die Top-Standard-Konzentration herzustellen. Die nötige Verdünnung variierte hierbei je nach gesuchtem Antigen. Aus dem Top-Standard wurde eine Verdünnungsreihe aus 8 verdünnten Standards mit jeweils 1:2 Verdünnung zum Vorgänger hergestellt. Nach einstündiger Blockung der Mikrotiterplatte wurden je 100 µl der Proben in die beschichteten Wells gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bindet das gesuchte Antigen an die Antikörper auf der Platte und wird dadurch fixiert. Danach wurde die Platte 4 Mal mit PBS-Tween gewaschen, sodass alle nicht fixierten Proteine und andere Stoffe entfernt wurden. Der mitgelieferte biotinylierte Detektions-Antikörper wurde 1:250 in Blocklösung verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der hergestellten Lösung in die Wells gegeben. Die gelösten Antikörper binden nun an die fixierten Antigene. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten wieder 4 Waschschrte mit PBS-Tween um nichtgebundene Antikörper zu beseitigen. Danach wurde Avidin-HRP 1:250 in Blocklösung verdünnt und jeweils 100 µl der hergestellten Lösung in die Wells gegeben. Avidin bindet den zuvor zugegebenen biotinylierten Detektions-Antikörper, dessen Menge mit der des gesuchten Antigens korreliert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten 7 Waschschrte mit PBS-Tween um nichtgebundenes Avidin-HRP zu entfernen. Darauf folgte die Zugabe von je 100 µl im Kit enthaltener TMB-Lösung. Diese dient als Substrat für das Enzym. Je mehr Antigen vorhanden ist, desto mehr Enzym ist vorhanden, desto mehr Substrat wird pro Zeiteinheit umgesetzt. Die enzymatische Reaktion war mit bloßem Auge anhand eines

Farbumschlags zu erkennen und wurde durch Zugabe von je 50 µl konzentrierter Schwefelsäure beendet. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm im Mikroplatten-Photometer (TECAN Infinite® M200) gemessen. Anhand der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, von welcher man auf die Proteinkonzentration der Proben schließen kann. Eine Probe, die ausschließlich Medium enthielt diente als negative Kontrolle.

### 5.6.7 Zytotoxizitätsanalyse

Um zu überprüfen, wie gut bzw. wie schlecht die Zellen die Stimulationen, vor allem die Langzeitinkubation mit lebenden und UV-getöteten Bakterien (Abb. 2), vertragen, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay die 4 Stimulationen (sowohl mit *S. pneumoniae* als auch mit *S. aureus*) durchgeführt, bei dem die Enzymaktivität von LDH gemessen wird. Hierfür wurden die Zellen vorher in farblosem aber ansonsten identischem Medium ausplattiert. Der Überstand nichtstimulierter Zellen stellte die negative Kontrolle dar während Medium ohne Zellen als Background-Kontrolle verwendet wurde. Als Positivkontrolle wurden TX-100 lysierte Zellen gleicher Anzahl verwendet. Für den Assay wurde das Medium zu den bestimmten Zeitpunkten nach der Stimulation (Abb. 2) abgenommen und bei 16000 x g zentrifugiert. Nur der zellfreie Überstand wurde für die Versuche genutzt. Für jeden Versuch wurde das Assay-Medium aus einem Teil Katalysator und 45 Teilen Färbelösung frisch hergestellt. Anschließend wurden je 100 µl der Proben in eine 96-Well-Platte gegeben und mit 100 µl des hergestellten Assay-Mix versetzt. Danach inkubierte die Platte 10-30 Minuten im Dunkeln bevor die Absorption am Mikroplatten-Photometer (TECAN Infinite® M200) bei 492 nm gemessen wurde. Alle Messungen fanden als Doppelbestimmung statt. Für die Auswertung wurde die Differenz des Wertes der jeweiligen Probe zur Negativkontrolle durch die Differenz der Positivkontrolle zur Negativkontrolle geteilt:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Probe} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1. Expression des humanen IL-37B in murinen RAW 264.7 Zellen

Um eine funktionelle Rolle des IL-37 in Makrophagen zu untersuchen, wurde als Zellkulturmodell die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7 gewählt. Da das Genom der Maus keine Informationen für die Synthese von murinem IL-37 beinhaltet, wurde zur funktionellen Analyse des humanen IL-37 in Makrophagen zunächst eine cDNA kodierend für das humane IL37B in das Genom der murinen Makrophagenzelllinie RAW264.7 integriert. Dies geschah durch Transfektion des Plasmidvektors pIRES2-EGFP (vgl. Abb. 5.1, Methodik), in dessen MCS das Gen für IL-37B eingefügt wurde. Die neue Zelllinie, die das IL-37b exprimieren sollte, wurde als RAW-pIRES/IL-37 bezeichnet. Als Kontrolle für funktionale Untersuchungen dienten RAW-Zellen, die mit demselben Vektor transfiziert wurden, ohne dass dieser die Informationen für IL-37B in der MCS enthielt. Diese werden im folgenden RAW-pIRES/empty genannt.

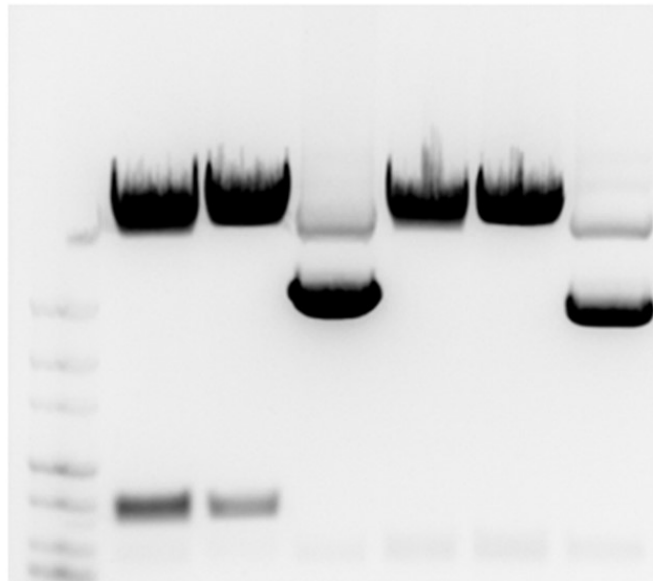
#### 6.1.1 Kontrolle der verwendeten Plasmide

Die Plasmidvektoren wurden von der AG P. Bufler MLU (Deutschland) bezogen und zunächst in kompetente *E. coli* transformiert. Die Transformanden wurden unter Verwendung von Kanamycin als Selektionsmarker auf LB-Platten kultiviert. Einzelne Kanamycin-resistente Klone wurden anschließend in einer 50 ml Kultur angezogen, um das Plasmid samt Information des Vektors amplifizieren und isolieren zu können. Mittels QIAGEN-MidiPrep-Plasmid-Kit wurde die Plasmid-DNA anschließend im reinen Zustand aus den *E. coli* isoliert. Um die Reinheit der Plasmide und die Existenz des Inserts zu überprüfen, wurden mittels Restriktionsendonuklease-Verdau und anschließender Agarosegelelektrophorese das Plasmid sowie das eingebrachte IL-37-Fragment nachgewiesen. Das IL37B-Gen wurde durch die AG Bufler an den Schnittstellen EcoR I und BamH I in der MCS des pIRES2 eingefügt. Es scheiterte jedoch zunächst der Versuch, es an diesen Stellen zu wieder herauszuschneiden, da eine der beiden Schnittstellen defekt war. Da die Restriktionsstelle BamH I bereits die äußerste C-terminale Schnittstelle in der MCS darstellt konnte hier kein weiteres Enzym verwendet werden. Es wurde nun N-terminal statt EcoR I mittels Nhe I bzw. Hind III geschnitten. Das IL-37-Protein besteht in der Isoform B aus 218 Aminosäuren, welche durch 654 Basenpaare codiert werden. Der Restriktionsverdau mit BamH I und Nhe I bzw. Hind III von zwei unterschiedlichen Plasmidpräparationen zeigte im Agarosegel (Abb. 6.1, Spuren 1 und 2) in den Spuren mit pIRES-/IL-37B-Vektoren das linearisierte Plasmid (5308 Bp) und eine weitere Bande knapp über 600 BP die der erwarteten Größe der IL37B cDNA entspricht. Die kleinere Bande, die das IL-37B-Insert darstellt, war in den Spuren mit Restriktionsendonuklease behandelten pIRES/empty-Vektoren nicht detektierbar (Abb. 6.1, Spuren 5 und 6). Obwohl Nhe I und Hind III 30 Basenpaare in der MCS voneinander entfernt liegen, konnte dieses recht kleine Fragment in der Agarosegelelektrophorese nach Verdau des Leervektors nicht festgestellt werden. Als negative Kontrolle für den erfolgreichen Restriktionsenzymverdau diente der gleiche Versuchsansatz ohne die Zugabe von Restriktionsenzymen. Aufgrund von Supercoiled-Strukturen zeigte der nicht-



linearisierte Vektor ein anderes Migrationsverhalten im Vergleich zu den linearisierten Proben (Spuren 3, 6).

Restriktionsenzym:	Nhe1	HindIII	-	Nhe1	HindIII	-
pIRES/IL-37:	+	+	+	-	-	-
pIRES/empty:	-	-	-	+	+	+



**Abb. 6.1: Kontrolle der Plasmidpräparationen mittels Restriktionsendonuklease-Verdau:** Nach Endonukleaseverdau mittels Nhe I bzw. Hind III N-terminal und BamH I C-terminal wurden die DNA-Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. IL-37-Gen zwischen 600 und 700 BP in beiden Restriktionen sichtbar (Spur 1, 2). pIRES/empty IL-37-negativ (Spur 4 – 6). DNA ladder 100-1000 BP. Spuren 3 und 6 zeigen supercoiled Strukturen des verwendeten Plasmids.

Die gereinigten Plasmide wurden nun in murine RAW-264.7-Zellen transfiziert. Nach der Transfektion mittels FuGENE HD-Reagenz wurden die Zellen mithilfe von G418 selektiert, sodass nur erfolgreich Vektor-transfizierte Zellen überlebten. Der Anteil überlebender Zellen lag bei ca. 5%. Das Medium wurde täglich gewechselt ohne die Zellen abzuschaben, um sie nicht weiterem Stress auszusetzen. Sichtbares Wachstum in Form einzelner entstehender Zellkolonien setzte 4 Tage nach der Transfektion ein. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen alle 2 Tage auf neue Platten mit frischem Medium überführt, wobei sie ohne Unterbrechung G418-Selektion ausgesetzt waren. Ein Teil der 4. Passage wurde für zukünftige Versuche im Stickstofftank eingelagert.

## 6.2 Charakterisierung der IL37B-Expression nach TLR-Aktivierung in RAW267.4 -Zellen

### 6.2.1 Charakterisierung der transfizierten Zelllinien RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37

Um die erfolgreiche Transfektion der RAW-Zellen zu überprüfen, wurde als nächster Schritt eine Analyse der induzierbaren IL-37B-Expression auf Genebene mittels RT-PCR (vgl. Abb. 6.2) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 2 Millionen RAW-pIRES/empty- (=Leervektorzellen) sowie RAW-pIRES/IL-37- Zellen (=IL-37B exprimierende Zellen) ausplattiert, 4h ruhen gelassen um adhärenz zu werden, und danach für 2h Pam3Csk und MDP (jeweils 100 ng/ml) ausgesetzt um eine proinflammatorische Antwort zu induzieren. Die Zellen wurden anschließend lysiert, die RNA mittels innuPREP RNA-Kit (Analytik Jena) gereinigt, in cDNA umgeschrieben und der für IL-37B-codierende Abschnitt mittels spezifischer Primer (vgl. 5.5.6) amplifiziert (vgl. 5.5.3). Eine RNA-Probe ohne Reverse Transkriptase im RT-Ansatz diente als Negativkontrolle in der PCR zur Bestimmung auf einen möglichen genomischen DNA-Gehalt (Kontamination) in den Proben. Genomische DNA in den RNA-Präparationen konnte jedoch mit den verwendeten Primern nicht nachgewiesen werden (Abb. 6.2, RT-). Während die RAW-pIRES/empty-Zellen (Spuren 1, 2) keine IL-37B-Expression im nicht-stimulierten und stimulierten Zustand zeigten, war in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen im unstimulierten und im stimulierten Zustand eine IL37B-spezifische Bande von 143 Bp nach PCR in der Gelelektrophorese darstellbar. Nach Stimulation der RAW-pIRES/IL-37-Zellen mit Pam3Csk/MDP für 2h (Spur 4) zeigte sich eine verstärkte IL-37B-mRNA-Expression im Vergleich zu den nicht-stimulierten IL-37B exprimierenden Zellen (Spur 3).



**Abb. 6.2: Nachweis der IL-37B-Expression mittel RT-PCR:** Nach zweistündiger Stimulation von 2 Mio. RAW-Zellen mit jeweils 100ng/ml Pam3Csk und MDP wurden RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37 lysiert, RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation von IL-37B mittels spezifischer Primer konnten Banden auf Höhe von 100 bis 200 Basenpaaren bei den IL-37B exprimierenden Zellen detektiert werden. RT- = neg. Kontrolle

Nachdem der IL-37B-Expressionsnachweis auf RNA-Ebene erfolgt war, wurde nun die Expression von IL-37B in RAW-Zellen auf Protein-Ebene untersucht. Hierfür wurden jeweils 10 Millionen RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen für 4h mit 100 ng/ml P3C und 100 ng/ml MDP stimuliert. Zum Nachweis von IL-37 auf Proteinebene

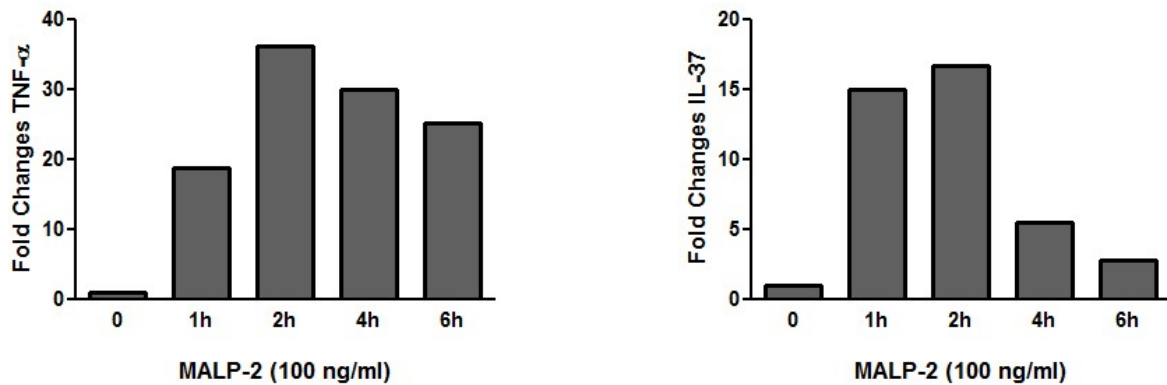
wurden 4 Antikörper getestet: der kommerziell erhältliche Antikörper anti-IL-37 von R&D, die polyklonalen Antiseren anti-KC 14 und anti-KC 15 (beide von Proteogenix SAS hergestellt für die AG Host Septomics) sowie der in der Literatur beschriebene anti-IL-1H4 gegen huIL-37B von P. Bufler. Dabei stellte sich der erstgenannte als unbrauchbar heraus, da er sehr viel Hintergrund in Western Blot Versuchen erzeugte und keine spezifischen Banden zu erkennen waren. Bei Verwendung der anderen drei Antikörper konnte das IL-37B im Zellysate nach Aufkonzentration durch Immunpräzipitation mit anti-KC 14 im Western Blot nachgewiesen werden. Da der Antikörper von P. Bufler den geringsten Hintergrund im Western Blot erzeugte, wurde ausschließlich dieser für die weiteren Versuche verwendet. Abbildung 6.3. zeigt einen repräsentativen Western Blot nach Immunpräzipitation für unstimulierte und stimulierte RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL37 Zellen. RAW-pIRES/empty-Zellen und unstimulierte RAW-pIRES/IL-37-Zellen zeigten keine detektierbare IL-37B-Expression auf Proteinebene. Dagegen konnte eine Bande bei 24 kDa in stimulierten RAW-pIRES/IL-37-Zellen nach Stimulation durch anti-IL-1H4 detektiert werden.



**Abb. 6.3: Nachweis der IL-37B-Proteinexpression im Western Blot:** Jeweils 10 Mio. RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen wurden für 4h mit 100 ng/ml P3C und MDP stimuliert und anschließend mit 700 µl Lyse-Puffer (s. Methodenteil) lysiert. IL-37B wurde mittels anti KC-14 immunpräzipitiert und anschließend mittels anti IL-1H4 von P. Bufler und anti-Maus-HRP-Antikörpern auf der Nitrozellulosemembran detektiert.

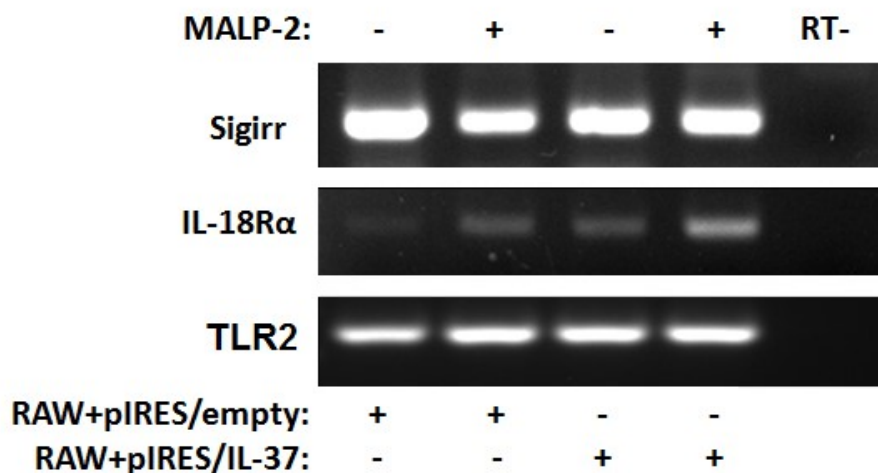
Im Folgenden wurde die IL37B-Expression nach Stimulation mit einem weiteren TLR2-Liganden untersucht. Da zu diesem Zeitpunkt die grundsätzlich mögliche IL-37-Expression in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen bestätigt war, war die Untersuchung der Expressionskinetik von IL-37B der nächste Schritt. Hierfür wurden 2 Mio. RAW-pIRES/IL-37-Zellen für 1, 2, 4 bzw. 6 Stunden mit 100ng/ml MALP-2 stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die RNA mittels innuPREP RNA-Kit (Analytik Jena) gereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die IL-37B-mRNA-Expression wurde nun mithilfe spezifischer Primer (s. 5.5.6) durch quantitative PCR (s. 5.5.5) analysiert. Hierbei zeigte sich ein Expressionsmaximum von IL-37B nach zweistündiger Stimulation mit MALP-2. Aber auch bereits nach einstündiger Stimulation zeigte sich eine deutliche Erhöhung der IL-37B mRNA Expression (Abb. 6.4 rechter Teil). Nach 4h und 6h zeigt sich bereits eine deutliche Abnahme der IL37B Expression, die nach 6h fast den Ausgangswert im unstimulierten Zustand erreichte. Im Vergleich zur IL-37B-Expressionskinetik wurde zusätzlich die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  auf mRNA-Ebene analysiert. Hier zeigte sich eine dem IL-37B

vergleichbare Kinetik (Abb. 6.4, linker Teil), jedoch war auch nach 6h die TNF $\alpha$ -Expression im Vergleich zum unstimulierten Zustand noch recht stark erhöht.



**Abb. 6.4: Expressionskinetiken von TNF $\alpha$ - und IL-37B-mRNAs in RAW-pIRES/IL-37-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml MALP-2:** 2 Mio. RAW-Zellen wurden für 1, 2, 4 und 6 Stunden mit MALP-2 (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen (0). Die RNA wurde isoliert und in der qPCR analysiert. Die relativen Expressionsmengenveränderungen wurden zum House-Keeping-Gen HPRT in Beziehung gesetzt und als Fold-Change ausgewertet. (n=1)

IL-37B bindet die humanen Rezeptoren IL-18R $\alpha$  und SIGIRR, um Signale in Zielzellen weiterzuleiten. Für das humane IL-37B konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass es auch die homologen murinen IL18Ra und SIGIRR binden und aktivieren kann (Nold-Petry et al., 2015). Die Expression der murinen IL37B-Rezeptoren SIGIRR und IL-18R $\alpha$  in RAW-pIRES/empty- sowie in RAW-pIRES/IL-37-Zellen wurde nun in unstimulierten und auch in MALP-2-stimulierten Zellen mittels RT-PCR untersucht. Hierfür wurden zwei Millionen Zellen beider Zelllinien für 2h mit 100ng/ml MALP-2 stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Beide Rezeptoren konnten in der PCR sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb 6.5). Hierbei war nur für IL-18R $\alpha$  ein leicht erhöhtes Expressionslevel nach MALP-2-Stimulation erkennbar. Die SIGIRR-Expression wurde durch die MALP-2-Stimulation nicht beeinflusst. Auch die TLR-2-Expression war in der Kinetik nicht verändert und zu allen Zeiten gut nachweisbar. Die Länge der Amplifikate ist Tab. 5.17 (Methodik) zu entnehmen.

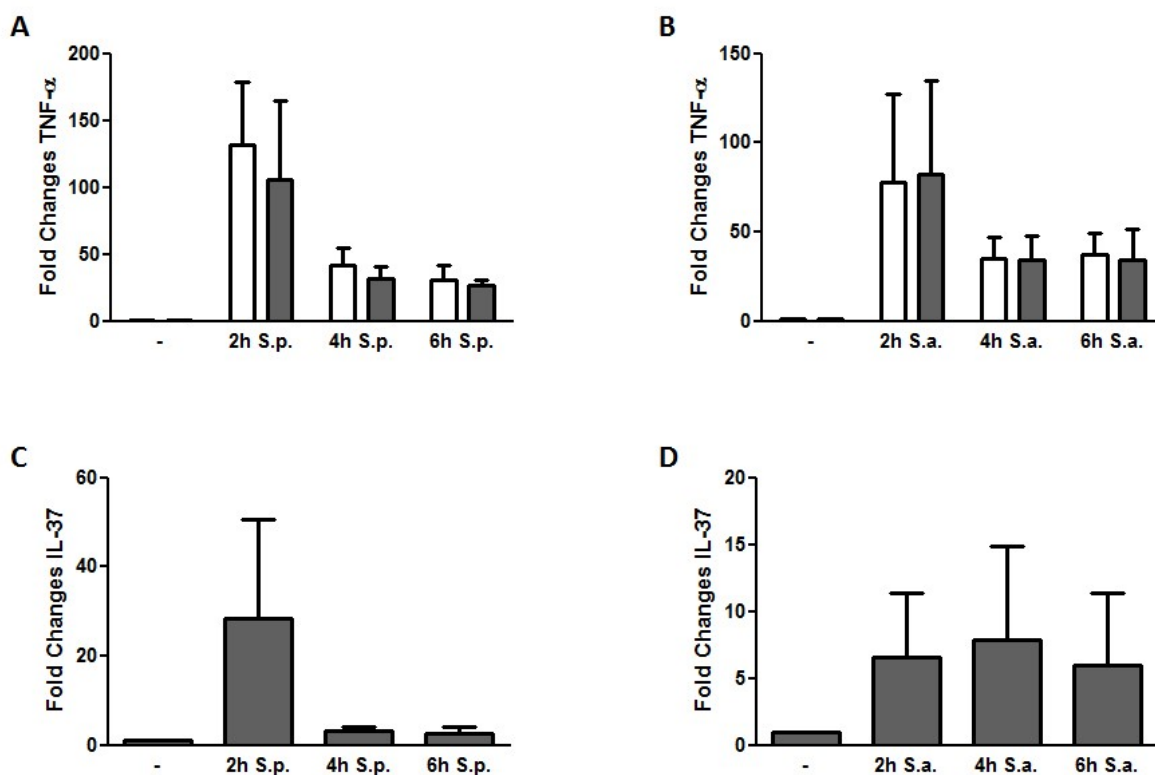


**Abb. 6.5:** mRNA-Expression von IL-18R $\alpha$ , SIGIRR und TLR-2 analysiert durch RT-PCR in transfizierten RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen mit und ohne TLR2-Stimulation durch MALP-2: 2 Mio. RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen wurden für 2h mit 100 ng/ml mit MALP-2 stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert, gereinigt und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. In der Elektrophorese war die Expression von Sigirr und TLR-2 nach PCR in allen Proben gleichermaßen nachweisbar. Die Expression von IL-18R $\alpha$  mRNA war ebenso in allen Proben nachweisbar, doch zusätzlich zeigte sich hier eine Zunahme der IL-18R $\alpha$ -Expression nach zweistündiger MALP-2-Stimulation sowie eine stärkere Expression in RAW-pIRES/IL-37-Zellen im Vergleich zu gleich stimulierten RAW-pIRES/empty-Zellen. RT- = RT-neg. Kontrolle.

## 6.2.2 Expressionsanalyse von inflammatorischen Markern nach Stimulation der RAW-Zellen mit *S. pneumoniae* D39 wt bzw. *S. aureus*

Makrophagen antworten auf den Kontakt mit Gram-negativen oder Gram-positiven Bakterien mit einer proinflammatorischen Immunantwort. So werden beispielsweise Zytokine, die eine Entzündungsreaktion vermitteln, und Chemoattractants, die für die Rekrutierung weiterer Immunzellen verantwortlich sind, verstärkt exprimiert und sezerniert. Für die RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen wurde nun im Folgenden ermittelt, wie die Expressionskinetik von IL-37B und von TNF $\alpha$  als stellvertretendes Zytokin der proinflammatorischen Immunantwort nach Stimulation mit den Gram-positiven Bakterien *S. pneumoniae* D39 wt und *S. aureus* erfolgt.

Die Ermittlung der Expressionskinetiken von TNF $\alpha$  und IL-37B erfolgte nach Stimulation beider Zelllinien mit den lebenden Bakterien nach 2h, 4h und 6h. Für die Stimulation wurden *S. pneumoniae* D39 wt (MOI: 5) und *S. aureus* (strain 6850, MOI: 5) verwendet. Die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene erfolgte durch qPCR nach RNA-Isolation und Umschreiben in cDNA (vgl. Abbildung 6.6).

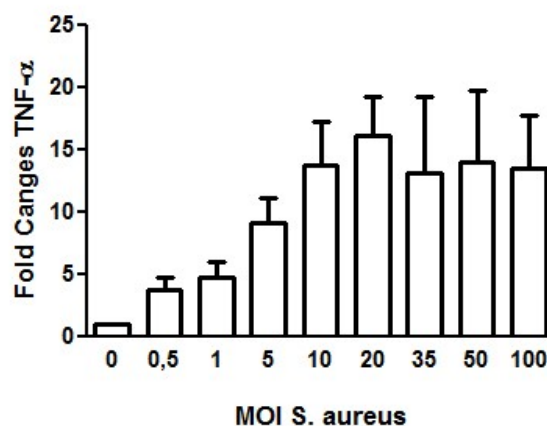


**Abb. 6.6: Expressionskinetiken von TNF $\alpha$ - und IL-37B-mRNAs in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37-Zellen (grau) nach Stimulation mit lebenden *S. pneumoniae* und *S. aureus*:** 2 Mio. RAW-Zellen wurden für 2, 4 und 6 Stunden mit *S. pneumoniae* (links) oder *S. aureus* (rechts) (MOI = 5) stimuliert. Die RNA wurde isoliert und in der qPCR analysiert. Die relativen Expressionsmengen wurden zum House-Keeping-Gen HPRT in Beziehung gesetzt und als Fold-Change ausgewertet. n=3.

Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Expression von TNF $\alpha$  und IL-37B im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die maximale Expression von TNF $\alpha$  war in beiden Zelllinien sowohl nach Stimulation mit *S. pneumoniae* (FC > 100) als auch mit *S. aureus* (FC > 75) nach 2h erreicht (Abb. 6.5, A, B). In beiden Zelllinien waren die TNF $\alpha$ -Expressionslevel zu allen Zeitpunkten vergleichbar. Auch die IL-37B-Expression war 2h nach Stimulation mit *S. pneumoniae* um das 28-fache und nach Stimulation mit *S. aureus* um das 7-fache erhöht. Mit Ausnahme von IL-37B nach *S. aureus*-Stimulation ging die Expression von TNF $\alpha$  und IL-37B zu späteren Zeitpunkten deutlich zurück. Die Stimulation mit *S. aureus* zeigte im Vergleich zu *S. pneumoniae* bei einer MOI von 5 leicht geringere TNF $\alpha$ - und IL-37B-Expressionlevel nach Stimulierung und bezüglich des IL-37B eine deutlich verlangsamte Abnahme im beobachteten Zeitraum.

### 6.2.3 Induktion der proinflammatorischen Antwort in Abhängigkeit von der MOI

Bei den Untersuchungen zur Expressionskinetik von TNF $\alpha$  und IL-37B wurde auffällig, dass die Stimulation mit *S. aureus* im Vergleich zur Stimulation mit *S. pneumoniae* geringere Induktionen der TNF $\alpha$ - und IL37B-mRNA-Level zur Folge hatte. Daraufhin wurde nun anhand einer MOI-Reihe ermittelt, ob die proinflammatorische Antwort der RAW-Zellen nach *S. aureus*-Stimulation auf das Level der *S. pneumoniae*-induzierten Antwort angeglichen werden konnte. Zu diesem Zweck wurde die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression in den stimulierten RAW-pIRES/empty-Zellen in der qPCR gemessen. Hierbei war zu erkennen, dass es mit steigender MOI zu einer Erhöhung der TNF $\alpha$ -Expression kam, jedoch ab einer MOI von  $\geq 10$  keine wesentliche Steigerung der TNF $\alpha$ -Expression bei weiter steigender MOI zu erzielen war (vgl. Abb. 6.7, gezeigt für RAW-pIRES/empty-Zellen).



**Abb. 6.7: TNF $\alpha$ -mRNA-Expression in RAW-pIRES/empty nach *S.aureus*-Stimulation bei steigender MOI:** 2 Millionen Zellen wurden für 2h mit *S. aureus* unter ansteigender MOI (0,5-100) stimuliert. Ab einer MOI von 10 war keine weitere Steigerung der TNF- $\alpha$ -Expression zu beobachten. n=3.

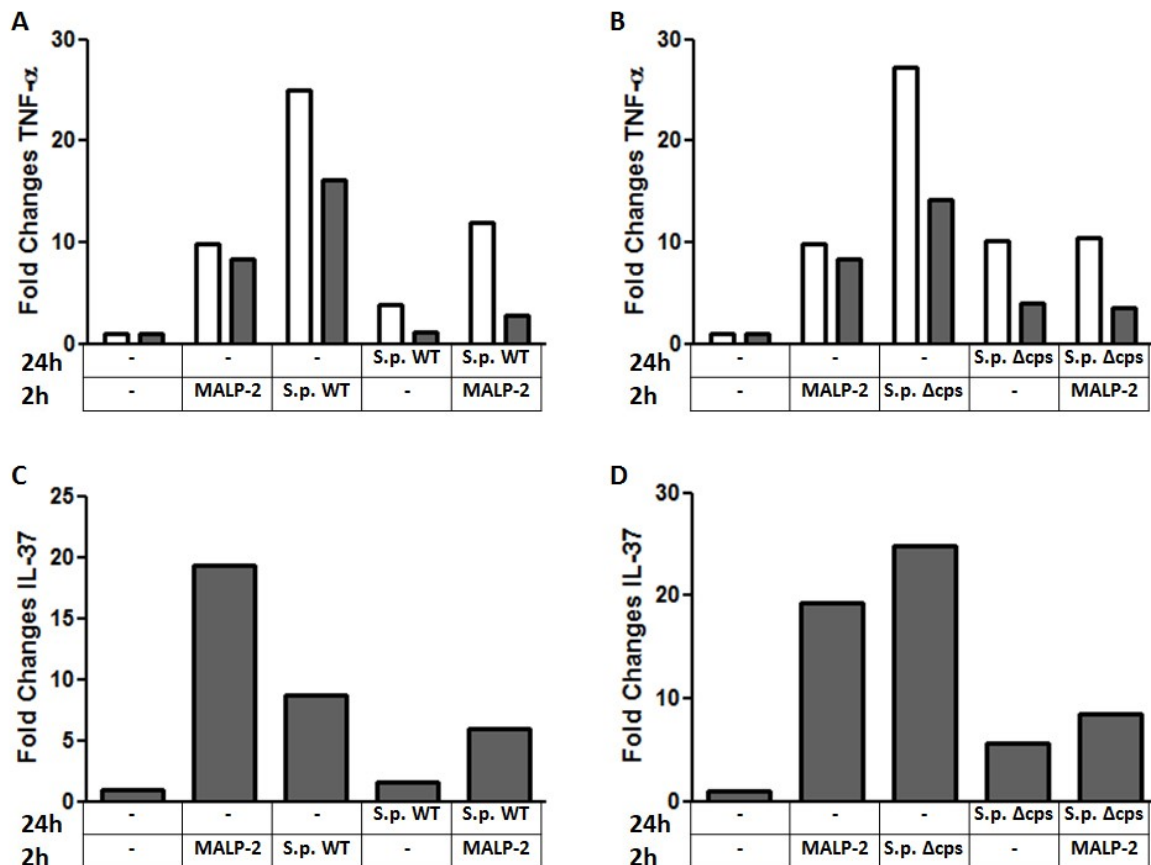
### 6.3 Toleranzinduktion durch *S. pneumoniae* und *S. aureus*

Nachdem Monozyten oder Makrophagen einem proinflammatorischen Reiz ausgesetzt werden, folgt eine immunsuppressive Phase, in der die Zellen und damit der gesamte Organismus nicht adäquat auf weitere Pathogene bzw. auf Stimulationen mit PAMPs reagieren. Diese immunsuppressive Phase der Immunantwort wird auch als Endotoxin-Toleranz bezeichnet und ist hauptsächlich durch eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine definiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob RAW264.7-Zellen sich ähnlich verhalten und ob IL37B eine funktionale Rolle bei der Toleranzinduktion spielt.

#### 6.3.1 Die proinflammatorische Antwort und Toleranzinduktion in RAW-Zellen bei Stimulation mit bekapselten und unbekapselten *S. pneumoniae* D39

Die Virulenz der Pneumokokken hängt hauptsächlich von ihrer Kapsel ab, welche auch die Serogruppe definiert. Sie erschwert die Opsonierung des Erregers durch das alternative Komplementsystem sowie die Phagozytose durch polymorphonukleäre Leukozyten (Kadioglu et al. 2008). Kapsellose Pneumokokken hingegen gelten als avirulent. Da in der vorgelegten Arbeit ausschließlich die Interaktion zwischen Pneumokokken und Makrophagen untersucht wurde, kamen zunächst sowohl bekapselte als auch kapsellose Erreger für die weiteren Versuche in Frage. Der verwendete Pneumokokken-Stamm D39 gehört im Wildtyp zum virulenten Serotyp 2. Nach Deletion der für die kapselkodierenden Gene in D39 konnte eine kapsellose Mutante (*S. pneumoniae* D39  $\Delta cps$ ) erzeugt werden. Beide Stämme wurden von Hester Bootsma (PhD, Laboratory of Pediatric Infectious Diseases Radboud University Nijmegen Medical Center, Niederlande) zur Verfügung gestellt und nun hinsichtlich ihrer proinflammatorischen Antwort sowie ihrer Toleranzinduktion in RAW/pIRES-empty und RAW-pIRES/IL-37B-Zellen untersucht. Dafür wurden 2 Millionen Zellen zunächst für 2 Stunden mit MALP-2, oder mit *S. pneumoniae* D39 *wt* oder mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta cps$  stimuliert. Die proinflammatorische Antwort der Zellen wurde mittels qPCR anhand des Expressionslevels von TNF $\alpha$ -mRNA nach 2h bestimmt. Des Weiteren wurde das Abklingen der TNF $\alpha$ -Expression nach 24h und, zusätzlich, die Expression nach erneuter zweistündiger Restimulation mittels MALP-2 analysiert, um eine mögliche Toleranzinduktion durch bakterielle Erststimulation zu ermitteln. Hier zeigte sowohl der kapsellose Stamm als auch der D39 *wt* eine im Vergleich zur MALP-2 Stimulation mit 100 ng/ml erhöhte TNF $\alpha$ -mRNA-Expression nach 2 Stunden (Abb. 6.8 A und B). Während die IL-37B exprimierenden Zellen (graue Balken) nach MALP-2 kaum veränderte TNF $\alpha$ -Expression aufwiesen, zeigte sich bei Verwendung der Bakterien eine leicht verringerte Expression von TNF $\alpha$  in IL-37B-positiven RAW-Zellen. Bei den verwendeten Bakterien und besonders bei der kapsellosen Mutante zeigte sich eine lang andauernde TNF $\alpha$ -Expression, die zwar im Vergleich zum Spitzenwert nach 2h deutlich abnahm, jedoch nach 24h nicht den Ausgangswert der unstimulierten Zellen erreichte. Wurden die D39 *wt* und D39  $\Delta cps$  prestimulierten Zellen nach 24h nun ein weiteres Mal mit MALP-2 stimuliert, um ihre proinflammatorische Genexpression nach Restimulation zu ermitteln, zeigte sich im Vergleich zur zweistündigen Exposition in der Proinflammation ein reduziertes Niveau der TNF $\alpha$ -Expression (vgl. Abb. 6.8 A und B). Während die mit bekapselten

Pneumokokken prestimulierten Zellen nach Restimulation nur noch einen leichten Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression zeigten, fehlte dieser erneute Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression bei den mit kapsellosen Pneumokokken prestimulierten Zellen nahezu komplett. Weiterhin trat dieser Effekt verstärkt in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen auf. Ein Ähnliches Bild zeigte sich für die *D39 wt* und *D39  $\Delta$ cps* induzierte IL37B-Expression in RAW-pIRES/IL-37- Zellen (vgl. Abb. 6.8 C und D). Während hier die Expressionslevel induziert durch MALP-2 und der Bakterien in etwa auf dem gleichen Level lagen, nahm auch hier die Expression nach 24h wieder deutlich ab und wurde auch nach erneuter zweistündiger Stimulation durch MALP-2 nicht erneut stark exprimiert. Viel mehr zeigte sich wie schon für TNF $\alpha$  eine verringerte Expression nach Restimulation. IL37B, exprimiert in murinen RAW264.7-Zellen, scheint - ähnlich anderen in der Proinflammation exprimierten Genen und obwohl es ein immun-suppressives Gen ist - tolerierbar zu sein. Aufgrund dieser Befunde wurden die nachfolgenden Stimulationen zur Toleranzinduktion mit *S. pneumoniae D39  $\Delta$ cps* durchgeführt.

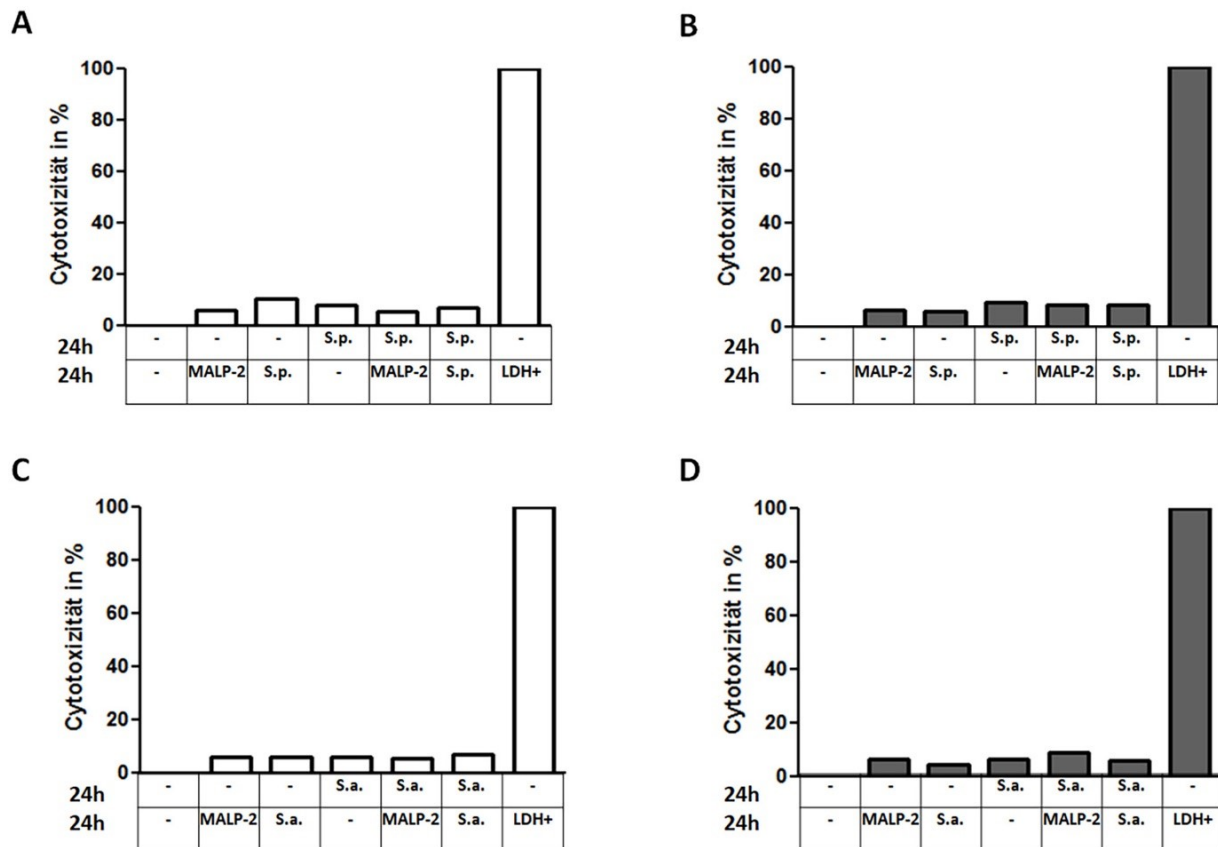


**Abb. 6.8:** TNF $\alpha$ - und IL-37-mRNA-Expression in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37-Zellen (grau) in proinflammatorischer und toleranter Phase unter Prestimulation mit bekapselten (*S.p. WT*) und kapsellosen (*S.p.  $\Delta$ cps*) *S. pneumoniae* und Restimulation mit MALP-2: 2 Mio. Zellen wurden wie in Abb. 5.3 (Methodenteil) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae D39 WT* (A, C) oder *S. pneumoniae D39  $\Delta$ cps* (B, D) statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. n = 1.

Bei Verwendung der *S. pneumoniae D39  $\Delta$ cps*-Mutante mit einer MOI von 5 in diesen initialen Versuchen zeigte sich bei mikroskopischer Betrachtung nach Stimulation der Zellen über Nacht ein vermehrter Zelltod. Daraufhin wurde überprüft, ob Zugabe von



Penicillin/Streptomycin den Zelltod bei längeren Inkubationen vermeiden kann. Hierzu wurde 2h nach Stimulation mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta cps$  Penicillin und Streptomycin dem Medium zugegeben und anschließend weiter inkubiert. Eine zytotoxische Wirkung der Pneumokokkeninfektion auf die stimulierten RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37-Zellen wurde nun in den Antibiotika-behandelten Zellen mittels LDH-ELISA nach 24h ermittelt. Dabei war der Anteil überlebender Zellen 24h nach Erststimulation (MALP-2 oder *S. pneumoniae*  $\Delta cps$ ) in allen Stimulationen stets größer als 90% (vgl. Abb. 6.9).



**Abb. 6.9: Zytotoxizitätsanalyse nach bakterieller Stimulation mit Antibiotika-Zugabe von RAW-pIRES/empty-Zellen (A, C) bzw. RAW-pIRES/IL-37-Zellen (B, D) durch LDH ELISA:** 2 Mio. RAW-Zellen wurden für 24h mit kapsellosen *S. pneumoniae*  $\Delta cps$  oder *S. aureus* prestimuliert. Nach 24h wurden die Zellen noch ein zweites Mal stimuliert. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2, sowie die o.g. Bakterien verwendet. Die Zytotoxizitätsanalyse erfolgte mittels Laktat-Dehydrogenase-Assay, der die Laktat-Dehydrogenase Aktivität im Zellkulturüberstand der Zellen misst, und nur bei Zelltod nachweisbar ist. Der zytotoxische Anteil war bei keiner Stimulation über 10%. LDH+ = Positivkontrolle nach Detergenz-vermittelter Lyse der Zellen. -/-: unstimulierte Zellen. n = 1

Ein Einfluss der Stimulation mit Bakterien auf das Überleben der RAW-Zellen konnte durch die Antibiotikagabe verhindert werden. Die IL-37B-Expression in den stimulierten RAW-Zellen hatte bezüglich der Toxizität keinen Einfluss. Stimulierte RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37-Zellen zeigten vergleichbare LDH Mengen im Überstand, unabhängig davon ob Bakterien oder MALP-2 zur Stimulation verwendet wurden.

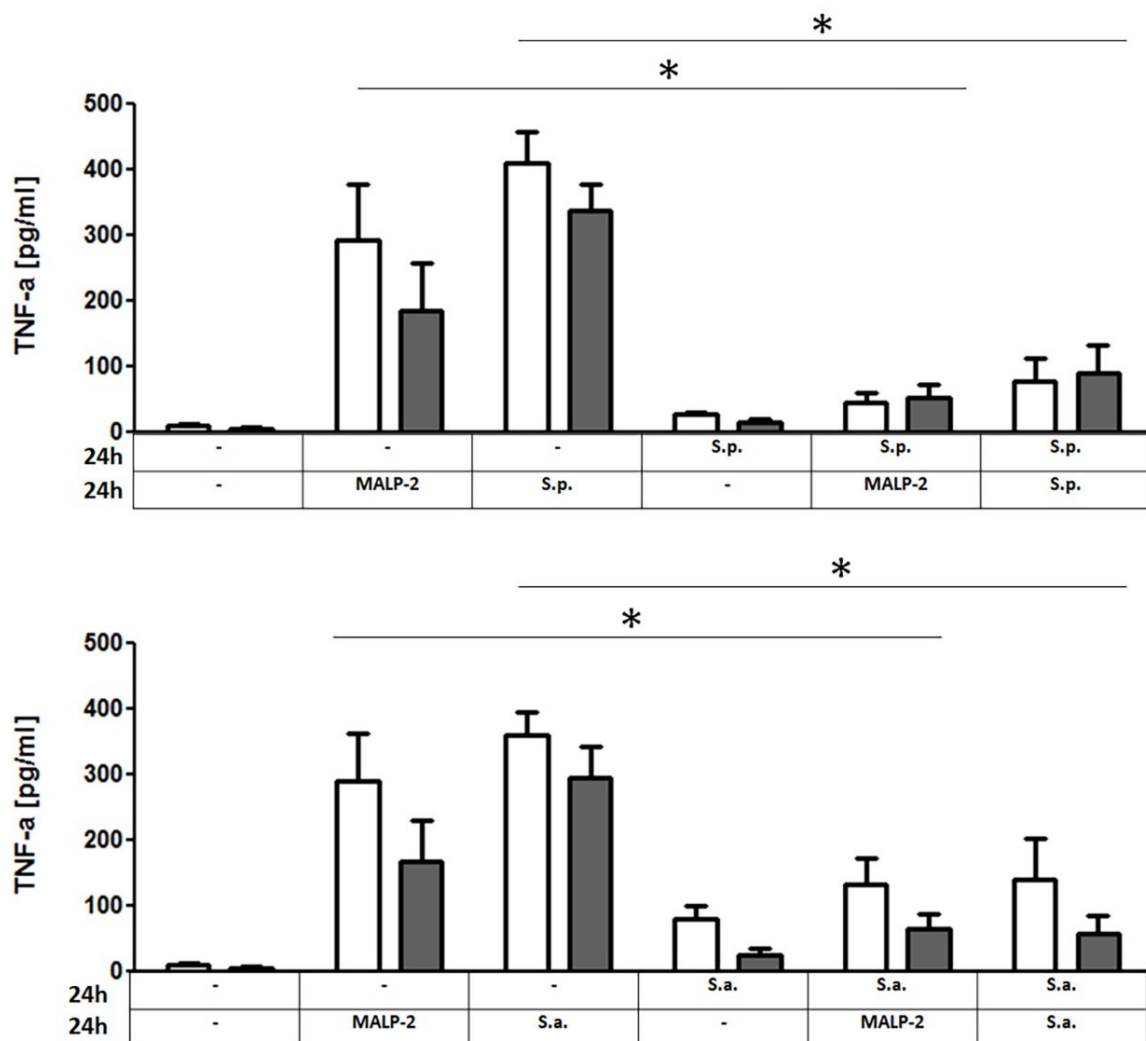
### 6.3.2 Vergleich der Toleranzinduktion nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen

Es wurde nun überprüft, ob IL-37B - exprimiert nach Aktivierung von RAW264.7-Makrophagen - eine Rolle bei der Toleranzinduktion bzw. der Ausprägung der Immunsuppression spielt. In den folgenden Versuchen wurden dazu 2 Mio. transfizierte RAW-pIRES/empty- bzw. RAW-pIRES/IL-37-Zellen mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps (MOI: 5) oder *S. aureus* (MOI: 10) für 24h prestimuliert. Um die tolerante Phase nachzuweisen, erfolgte anschließend ein Waschschriff mit PBS und eine zweistündige (qPCR) bzw. 24-stündige (ELISA) Restimulation mit demselben Pathogen oder mit MALP-2 (100 ng/ml). Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  ist in der Literatur als sogenanntes tolerierbares Gen (T-Gen) mit verminderter Expression im restimulierten (= toleranten) Zustand beschrieben. Daher wurde die TNF $\alpha$ -Expression auf mRNA-Ebene mittels qPCR und auf Proteinebene mittels ELISA ermittelt. Zum Toleranznachweis wurde in beiden Methoden die Zytokinexpression nach der Restimulation mit der Zytokinexpression nach der Proinflammation verglichen. Als Kontrolle dienten eine nichtstimulierte Probe sowie eine Probe im Zustand 24h nach der Vorstimulation.

#### 6.3.2.1 Toleranzinduktion auf Proteinebene

Mittels ELISA wurden die Zellkulturüberstände nach den im vorigen Abschnitt beschriebenen Stimulationen auf die TNF $\alpha$ -Sekretion der RAW-Zellen untersucht. Nach 24-stündiger Stimulation mit *S. pneumoniae*, *S. aureus* oder MALP-2 war eine signifikante Proinflammation und TNF $\alpha$ -Sekretion nachweisbar (siehe Abb. 6.10). Die sekretierten TNF $\alpha$ -Mengen nach 24h beliefen sich auf 300 pg/ml (RAW-pIRES/empty) bzw. 190 pg/ml (RAW-pIRES/IL-37) für MALP-2-Stimulation, 410 pg/ml (RAW-pIRES/empty) bzw. 335 pg/ml (RAW-pIRES/IL-37) für *S. pneumoniae*-Stimulation und 360 pg/ml (RAW-pIRES/empty) bzw. 300 pg/ml (RAW-pIRES/IL-37) für *S. aureus*-Stimulation (Abb. 6.10). Während die mit *S. pneumoniae* prestimulierten Proben ohne weitere Zweitstimulation innerhalb eines Tages nach der Stimulation mit 15 pg/ml (RAW-pIRES/empty) bzw. 10 pg/ml (RAW-pIRES/IL-37) wieder nahe an ihr Ausgangsniveau an TNF $\alpha$  kamen, zeigten die mit *S. aureus* prestimulierten Zellen eine länger anhaltende TNF $\alpha$ -Sekretion, die mit 120 pg/ml (RAW-pIRES/empty) bzw. 70 pg/ml (RAW-pIRES/IL-37) gemessen wurde. Im Vergleich zur proinflammatorischen TNF $\alpha$ -Sekretion war die TNF $\alpha$ -Produktion während der 24-stündigen Restimulation nach Erststimulation durch MALP-2 sowie durch die jeweiligen Gram-positiven Bakterien signifikant reduziert. Hier konnten in der toleranten Phase der Zellen nur geringe Mengen TNF $\alpha$  gemessen werden, die sich signifikant von den proinflammatorischen Mengen unterschieden: In den RAW-pIRES/empty-Zellkulturüberständen beläuft sich die TNF $\alpha$ -Konzentration nach Prestimulation mit *S. pneumoniae* und Restimulation mit MALP-2 auf 40 pg/ml. Bei Restimulation mit *S. pneumoniae* waren im Vergleich zu proinflammatorisch messbaren 410 pg/ml TNF $\alpha$  nur noch 85 pg/ml nachweisbar. Nach Prestimulation mit *S. aureus* lag die TNF $\alpha$ -Konzentration von den RAW-pIRES/empty-Zellkulturüberständen nach Restimulation mit MALP-2 bei 115 pg/ml (vgl. 300 pg/ml bei MALP-2-Proinflammation), und nach Restimulation mit *S. aureus* bei 120 pg/ml (vgl. 360 pg/ml bei *S. aureus*-Proinflammation). In den RAW-pIRES/IL-37-Zellkulturüberständen beläuft sich die TNF $\alpha$ -Konzentration nach Prestimulation mit *S. pneumoniae* und Restimulation mit

MALP-2 auf 50 pg/ml (vgl 190 pg/ml bei MALP-2-Proinflammation). Bei Restimulation mit *S. pneumoniae* waren im Vergleich zu proinflammatorischen 335 pg/ml TNF $\alpha$  nur noch 90 pg/ml messbar. Nach Prestimulation mit *S. aureus* lag die TNF $\alpha$ -Konzentration in den RAW-pIRES/IL-37-Zellkulturüberständen nach Restimulation mit MALP-2 bei 55 pg/ml (vgl 190 pg/ml bei MALP-2-Proinflammation), nach Restimulation mit *S. aureus* bei 50 pg/ml (vgl. 300 pg/ml bei *S. aureus*-Proinflammation). Zusammengefasst zeigen alle mit *S. pneumoniae* und *S. aureus* vorstimulierten Zellen eine deutliche und signifikante Verringerung der TNF $\alpha$ -Sekretion nach erneuter Restimulation durch MALP-2 oder durch wiederholte Stimulation mit den gleichen Bakterien.

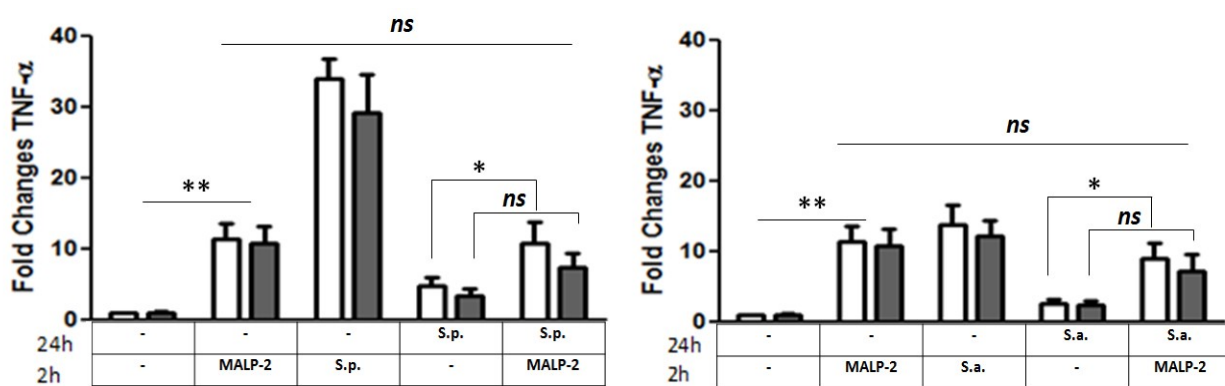


**Abb. 6.10: Nachweis der TNF $\alpha$ -Sekretion während der proinflammatorischen Phase und nach Restimulation im toleranten Zustand durch ELISA:** Die Zelllinien RAW-pIRES/empty (weiß) bzw. RAW pIRES/IL-37 (grau) wurden nach oben dargestelltem Schema stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae* (oben) oder *S. aureus* (unten) statt. Zur 24-stündigen Restimulation wurden entweder MALP-2 oder das jeweilige Bakterium der Prestimulation verwendet. Die synthetisierte Menge an TNF $\alpha$  nach der Restimulation (Spalten 5 + 6) wird mit der zugehörigen 24-stündigen Proinflammation (Spalten 2 + 3) verglichen. Die sezernierte Menge an TNF $\alpha$  ist nach der Restimulation in allen Proben signifikant verringert. \* p < 0,05. n=3

Dies deutet darauf hin, dass die RAW-Zellen nach Erststimulation in eine Phase der Toleranz eingetreten sind. Weiterhin zeigten die RAW-pIRES/IL-37-Zellen im Vergleich zu den RAW-pIRES/empty-Zellen eine geringfügig verminderte TNF $\alpha$ -Sekretion während der Proinflammation hervorgerufen durch MALP-2, *S. pneumoniae* oder *S. aureus* sowie während der Restimulation nach *S. aureus*-Prestimulation. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant.

### 6.3.2.2 Toleranzinduktion auf Genebene

Zum Nachweis der Toleranzinduktion nach *S. pneumoniae*- bzw. *S. aureus*-Prestimulation wurde nun auch die mRNA-Expression von TNF $\alpha$  in den RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen bestimmt. Hierzu wurden jeweils 2 Mio. Zellen für 24h mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps (MOI: 5) bzw. *S. aureus* 6850 (MOI: 10) prestimuliert, 1x mit PBS gewaschen und anschließend für 2h in frischem Medium mit 100 ng/ml MALP-2 restimuliert. Da die Bakterienstimulation nicht alle Zellen zu demselben Zeitpunkt aktiviert und deshalb durch Restimulation mit MALP-2 verlässlichere und reproduzierbare Messwerte erzielt werden konnten, wurde auf eine Restimulation mit dem gleichen Pathogen der Prestimulation verzichtet. Eine signifikante Proinflammation nach zweistündiger Stimulation mit MALP-2 oder *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps bzw. *S. aureus* war anhand der verstärkten TNF $\alpha$ -Expression detektierbar (Abb. 6.11). Diese stieg hierbei auf das 10-fache (MALP-2 und *S. aureus*), bzw. das - 30-fache (*S. pneumoniae*) der nicht stimulierten Zellen an. Ein leichter Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression war auch nach Restimulation mit MALP-2 detektierbar und gegenüber den 24h prestimulierten Zellen ohne Restimulation signifikant für RAW-pIRES/empty-Zellen. Dieser Anstieg an TNF $\alpha$ -mRNA war in beiden Zelllinien geringer ausgeprägt als während der durch MALP-2 ausgelösten Proinflammation, blieb jedoch ohne statistische Signifikanz (vgl Abb. 6.11).



**Abb. 6.11: Nachweis der TNF $\alpha$ -mRNA Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR:** Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps (links) oder *S. aureus* (rechts) statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. Die synthetisierte Menge an TNF $\alpha$  nach der Restimulation (Spalte 5) wird mit der zugehörigen zweistündigen Proinflammation durch MALP-2 (Spalte 2) verglichen.

Nach Medzhitov et al. wird die Toleranz anhand der Veränderung der Fold-Changes von unstimuliert/Proinflammation und nach 24h-Prestimulation/Restimulation ermittelt.

Betrachtet man die FC im ersten Zustand (Proinflammation) und die Fold-Changes im toleranten Zustand der Zellen (Restimulation im Vergleich zum 24h Wert), so zeigt sich eine signifikante Verringerung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression im toleranten (= mit *S. aureus* oder *S. pneumoniae* vorstimulierten und mit MALP-2 restimulierten) Zustand (vgl. Abb. 6.11). Die IL-37B-Expression in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen zeigte weiterhin einen geringen, jedoch, wie schon in den ELISA-Experimenten gezeigt, nicht-signifikanten inhibitorischen Effekt auf die TNF $\alpha$ -Expression in der proinflammatorischen und auch in der toleranten Phase nach bakterieller bzw. MALP-2-Stimulation, ist aber augenscheinlich nicht die alleinige Ursache der verringerten TNF $\alpha$ -Expression nach Pre- und Restimulation, d. h. der Toleranzinduktion.

## 6.4 Transkriptomanalyse

Zunächst konnte anhand des Beispiels von TNF $\alpha$  gezeigt werden, dass die Proteinsynthese eines proinflammatorischen Zytokins nach Erststimulation durch *S. aureus* oder *S. pneumoniae* und anschließender Restimulation durch MALP-2 in RAW-Makrophagen deutlich vermindert ist. Allerdings existieren zahlreiche proinflammatorische Entzündungsmediatoren, die während der Entzündungsreaktion eine Rolle spielen und im toleranten Zustand der Zellen eine verringerte Expression aufweisen sollten. Die weitere Untersuchung dieser Gene und Proteine mittels qPCR und ELISA wäre jedoch sehr zeit- und kostenintensiv. Modernere NGS-Methoden wie die RNA-AmpliSeq ermöglichen dagegen die Analyse und Quantifizierung aller exprimierten oder ausgewählter mRNA-Moleküle auf einem schnelleren und effizienteren Weg. Um einer möglichen Funktion von IL-37B während der inflammatorischen Phase oder beim Erlangen des toleranten Zustands, welcher sich durch die jeweils verringerte mRNA Produktion von TNF $\alpha$  in den oben beschriebenen Versuchen - wenn auch nicht signifikant veränderten Mengen - anzeigte, näherzukommen, wurden auf diese Weise händisch selektierte 911 Gene, welche mit der Immunantwort von Monozyten und Makrophagen assoziiert sind, genauer analysiert.

Für diese Analyse wurden sowohl die RAW-pIRES/IL-37-Zellen als auch die RAW-pIRES/empty-Zellen verschiedenen Stimulationen zu standardisierten Zeitpunkten (vgl. Abb. 5.3, Methodik) unterzogen. Hierdurch entstanden 12 Proben. Ein Sequenzierungszyklus mit anschließender Qualitätskontrolle der 12 Proben führte zu 1,8 bis 4,1 Millionen Reads pro Probe. Diese Reads dienten als Ausgangsdaten für den TMAP-Aligner, um sie dem hg19-AmpliSeq-Transkriptom (bereitgestellt von ThermoScientific) zuzuordnen. Letztendlich konnten in allen Proben über 99 % aller Reads eindeutig zugeordnet (= „gemapt“) werden. Die hieraus resultierenden Daten wurden mittels Partek Genomic Suite 6.6 analysiert. Hierdurch konnte für jedes Gen sowohl die Gesamtzahl der Reads ermittelt werden. Da längere Gene bei gleicher Expression mehr Reads verzeichnen als kürzere Gene, wird hieraus der standardisierte RPKM-Wert (Reads pro Kilobase pro Million gemapter Reads) gebildet.

Zunächst wurde anhand dieser RPKM-Werte die Gesamtheit der verändert exprimierten Gene (VEGs) betrachtet. Als VEG wurden Gene klassifiziert, die nach Stimulation mindestens doppelt bzw. halb so stark exprimiert wurden, wie in der

nichtstimulierten Kontrolle. Zunächst war erkennbar, dass in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen durchschnittlich 52 Gene pro Probe weniger verändert exprimiert wurden als in den RAW-pIRES/empty-Zellen (vgl. Tabelle 6.1). Auffällig war hierbei, dass die Anzahl hochregulierter Gene infolge der verschiedenen Stimuli in beiden Zelllinien nahezu identisch war, während bei Anwesenheit von IL-37B im Schnitt 47 Gene weniger herabreguliert wurden. Außerdem war die Anzahl hochregulierter Gene in der toleranten Phase stets kleiner als nach der zweistündigen Proinflammation mit MALP-2. Weiterhin war festzustellen, dass die *S. aureus*-Stimulation in beiden Zelllinien zu weniger VEGs führte als die *S. pneumoniae*-Stimulation. Die Differenz der VEGs zwischen *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation betrug hier im Schnitt 37 Gene und damit 33%. Nach Bakterienstimulation zeigten 50 Gene unabhängig vom zur Stimulation genutzten Bakterium eine gesteigerte Expression und 34 Gene eine verminderte Expression. Weiterhin fiel auf, dass es kein Gen gibt, welches nach *S. pneumoniae*-Stimulation hoch- und nach *S. aureus*-Stimulation herabreguliert wird bzw. andersherum. Dies führt zu der Annahme, dass die Genregulation nach Stimulation mit beiden grampositiven Bakterien ähnlich bzw. mit nur kleinen Unterschieden bezüglich der Fold-Changes verläuft. Diese Unterschiede können sich jedoch auf die Anzahl der VEGs auswirken, je nachdem ob ein Gen die für die Zählung eingeführte FC-Änderung  $\geq 2$  erreichte oder nicht.

**Tabelle 6.1: VEGs aller Proben im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle**

Stimulation vs. Kontrolle	VEGs	VEGs hochreguliert	VEGs herabreguliert
<b>RAW-pIRES/empty</b>			
2h MALP-2	267	122	145
24h <i>S. pneumoniae</i>	229	99	130
24h <i>S. pneumoniae</i> + 2h MALP-2	326	104	222
24h <i>S. aureus</i>	123	74	49
24h <i>S. aureus</i> + 2h MALP-2	229	81	148
<b>RAW-pIRES/IL-37</b>			
2h MALP-2	221	117	104
24h <i>S. pneumoniae</i>	179	91	88
24h <i>S. pneumoniae</i> + 2h MALP-2	228	105	123
24h <i>S. aureus</i>	128	70	58
24h <i>S. aureus</i> + 2h MALP-2	182	97	85

#### 6.4.1 Identifizierung tolerisierbarer Gene mittels RNA-AmpliSeq

Tolerisierbare Gene sollen nach ihrer Definition nach zweistündiger Proinflammation eine verstärkte Expression zeigen, erreichen nach zweistündiger Restimulation jedoch nicht wieder dasselbe erhöhte Expressionslevel. Zusätzlich sollte das Gen 24h nach der Vorstimulation seinem Ausgangsexpressionslevel wieder möglichst nahekommen und nicht anhaltend stark exprimiert werden. Anhand der AmpliSeq-Daten wurden nun alle Gene ermittelt, die diese Kriterien innerhalb einer der beiden Zelllinien, RAW-pIRES/empty oder RAW-pIRES/IL-37, für beide Stimulationen erfüllen. Hierfür wurde für alle zuvor identifizierten VEGs der Fold-Change-Quotient zwischen Prestimulation und Restimulation bestimmt. Im Zähler stand der Fold-Change nach der zweistündigen

Restimulation bezogen auf den Wert nach 24h, im Nenner der Fold-Change nach zweistündiger Proinflammation bezogen auf die unstimulierten Zellen. Foster et al. wählten in ihren Studien einen Quotienten von 0,33 als Schwellenwert für die Tolerierbarkeit. Da TNF $\alpha$ , dessen Tolerierbarkeit in den Vorversuchen gezeigt wurde, einen in den AmpliSEQ-Versuchen ermittelten Quotienten von 0,36 bzw. 0,6, also nur schwach toleriert, in RAW/empty- bzw. RAW/IL37B-Zellen aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein leicht erhöhter Quotient von 0,5 als Schwellenwert für die Tolerierbarkeit festgelegt. Das heißt, Gene, die Quotienten kleiner als 0,5 aufwiesen, werden als eindeutig tolerierbare Gene identifiziert, da diese Gene nach der Restimulation einen um die Hälfte geringeren FC als während der Proinflammation besaßen. Weiterhin bedeutet dieser Schwellenwert, dass die gefundenen Gene während der Toleranz in RAW264.7-Zellen stärker reprimiert werden als TNF $\alpha$ . Von allen VEGs mit Quotienten < 0,5 wurde dann der Fold-Change nach 24-stündiger Proinflammation (Langzeitexpressionsänderung) untersucht. War dieser im Vergleich zur Proinflammation nach 2h wieder gesunken, gilt das Gen weiterhin als T-Gen. Alle anderen Gene mit gleichbleibender hoher Expression oder noch verstärkter Expression nach 24 h wurden aussortiert. Von den verbleibenden als T-Gen identifizierten Genen wurde nun die absolute Expression anhand der RPKMs (reads per kilobase per million mapped reads) überprüft. Gene mit RPKM < 1 während der Proinflammation wurden aufgrund einer zu geringen Expression ausgeschlossen. Letztendlich erfüllten folgende Gene die o.g. Kriterien für T-Gene nach Stimulation der RAW-Zellen mit beiden Bakterien: Cd40, Ccl22, Mx2, Clec2d, Il27, Socs1, Chst11, Icosl, Cxcl11, Mmp14, Gpr84, Zyx, Sdc4, Hspa1b, Tnfaip3, Icam1, Pdgfa (Tabelle 6.2, 6.3; Abb 6.10, 6.11). Weiterhin konnten einzelne Gene identifiziert werden, die die o. g. Kriterien entweder nur nach *S. pneumoniae* oder nur nach *S. aureus*-Stimulation erfüllen. Nach *S. pneumoniae*-Stimulation gilt dies für Junb, nach *S. aureus*-Stimulation für Il1a, Il1b und Mtmr7. Tab. 6.2 stellt die 20 detektierten T-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation mit ihren RPKM-Werten und Fold-Changes dar.

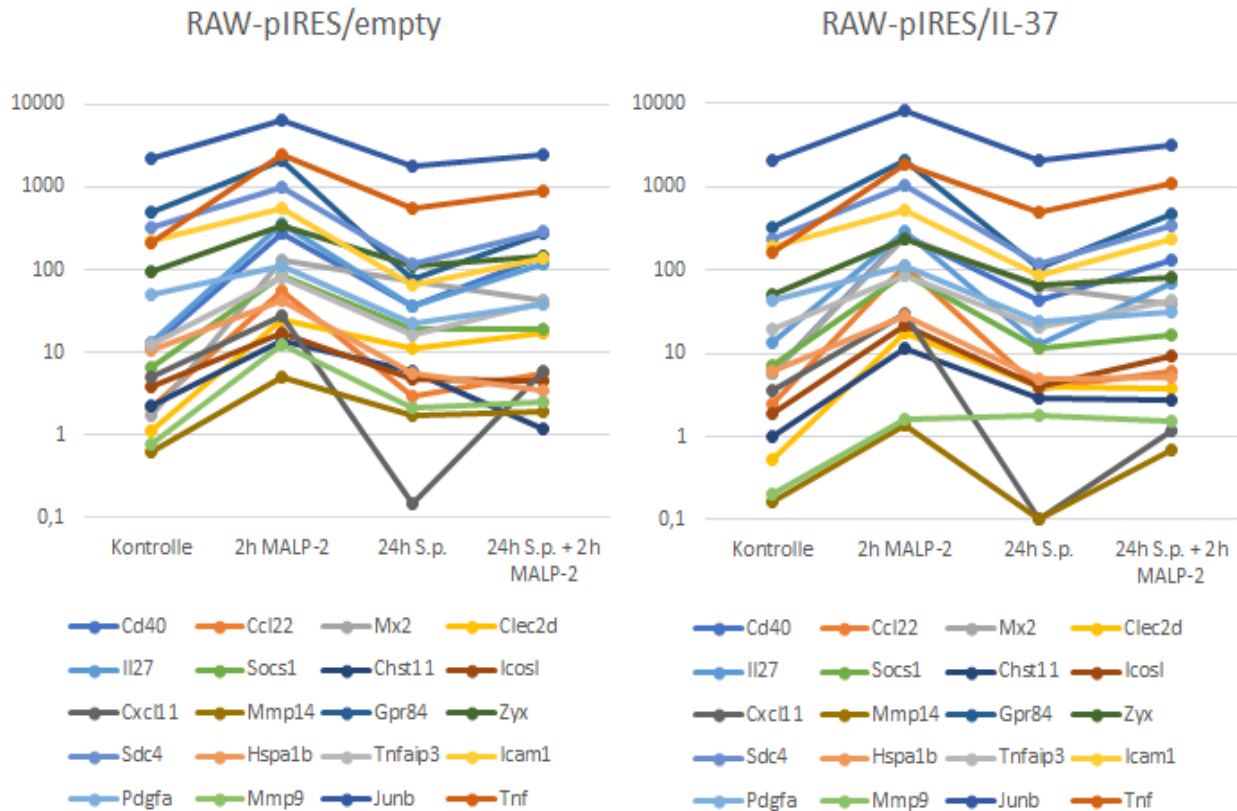
**Tabelle 6.2: RPKM und FC der T-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation**

Gen	RPKM	RPKM	FC	RPKM	FC	RPKM	FC	FC-Quotient
	Kontrolle	2h MALP-2	2h MALP-2	24h S.p.	24h S.p.	24h S.p. + 2h MALP-2	24h S.p. + 2h MALP-2	
<b>RAW-pIRES/empty</b>								
<b>Tnf</b>	211	2401	11	559	3	912	4	0,36
<b>Cd40</b>	12	280	24	36	3	143	12	0,5
<b>Ccl22</b>	2	55	26	3	1	6	3	0,12
<b>Mx2</b>	2	129	76	73	43	42	25	0,33
<b>Clec2d</b>	1	25	22	11	10	17	15	0,68
<b>Il27</b>	13	366	28	36	3	116	9	0,32
<b>Socs1</b>	7	87	13	19	3	19	3	0,23
<b>Chst11</b>	2	14	6	6	3	1	3	0,5
<b>Icosl</b>	4	17	4	5	1	5	1	0,25
<b>Cxcl11</b>	5	28	6	0	-32	6	1	0,17
<b>Mmp14</b>	1	5	8	2	3	2	3	0,38
<b>Gpr84</b>	503	2101	4	77	-7	277	-2	-0,5
<b>Zyx</b>	93	336	4	109	1	142	2	0,5
<b>Sdc4</b>	325	1004	3	116	-3	298	1	0,33
<b>Hspa1b</b>	11	42	4	5	-2	3	-3	-0,75

<b>Tnfaip3</b>	13	81	6	17	1	41	3	0,5
<b>Icam1</b>	220	561	3	64	-3	137	-2	-0,67
<b>Pdgfa</b>	49	108	2	23	-2	38	1	0,5
<b>Mmp9</b>	1	13	17	6	8	8	11	0,65
<b>Junb</b>	2268	6351	3	1774	1	2517	1	0,33
<b>RAW-pIRES/IL-37</b>								
<b>Tnf</b>	160	1877	11	490	3	1104	7	0,64
<b>Cd40</b>	6	262	47	42	8	130	23	0,49
<b>Ccl22</b>	2	113	46	4	2	6	2	0,04
<b>Mx2</b>	6	247	43	61	11	38	7	0,16
<b>Clec2d</b>	1	18	33	4	7	4	7	0,21
<b>Il27</b>	13	284	21	13	1	70	5	0,24
<b>Socs1</b>	7	89	12	12	2	17	2	0,17
<b>Chst11</b>	1	11	12	3	3	3	3	0,25
<b>Icosl</b>	2	21	11	4	2	9	5	0,45
<b>Cxcl11</b>	4	30	8	0	-36	1	-2	-0,25
<b>Mmp14</b>	0	1	8	0	-2	1	4	0,5
<b>Gpr84</b>	318	2097	7	108	-3	471	1	0,14
<b>Zyx</b>	50	237	5	65	1	83	2	0,4
<b>Sdc4</b>	230	1056	5	120	-2	333	1	0,2
<b>Hspa1b</b>	6	28	5	5	1	5	1	0,2
<b>Tnfaip3</b>	20	86	4	21	1	42	2	0,5
<b>Icam1</b>	187	526	3	87	-2	228	1	0,33
<b>Pdgfa</b>	44	111	3	24	-2	30	1	0,33
<b>Mmp9</b>	0	2	8	2	9	2	8	1
<b>Junb</b>	2016	7984	4	2078	1	3089	1,5	0,38

Der ähnliche Verlauf der Expression der 20 o. g. T-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation ist graphisch in Abbildung 6.12 dargestellt. Markant für die T-Gene ist ein im ersten Drittel des Graphen steilerer Anstieg im Vergleich im letzten Drittel sowie ein Expressionsmaximum nach der zweistündigen Proinflammation.





**Abb. 6.12: RPKM-Werte der 22 T-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation:** 22 T-Gen-Kandidaten zeigten eine Zunahme der RPKMs nach zweistündiger MALP-2-Stimulation, erreichten 24h nach *S. pneumoniae*-Stimulation nahezu ihr Ausgangsniveau und verzeichneten nach zweistündiger Restimulation mit MALP-2 deutlich niedrigere RPKM-Werte als nach der zweistündigen MALP-2-Proinflammation.

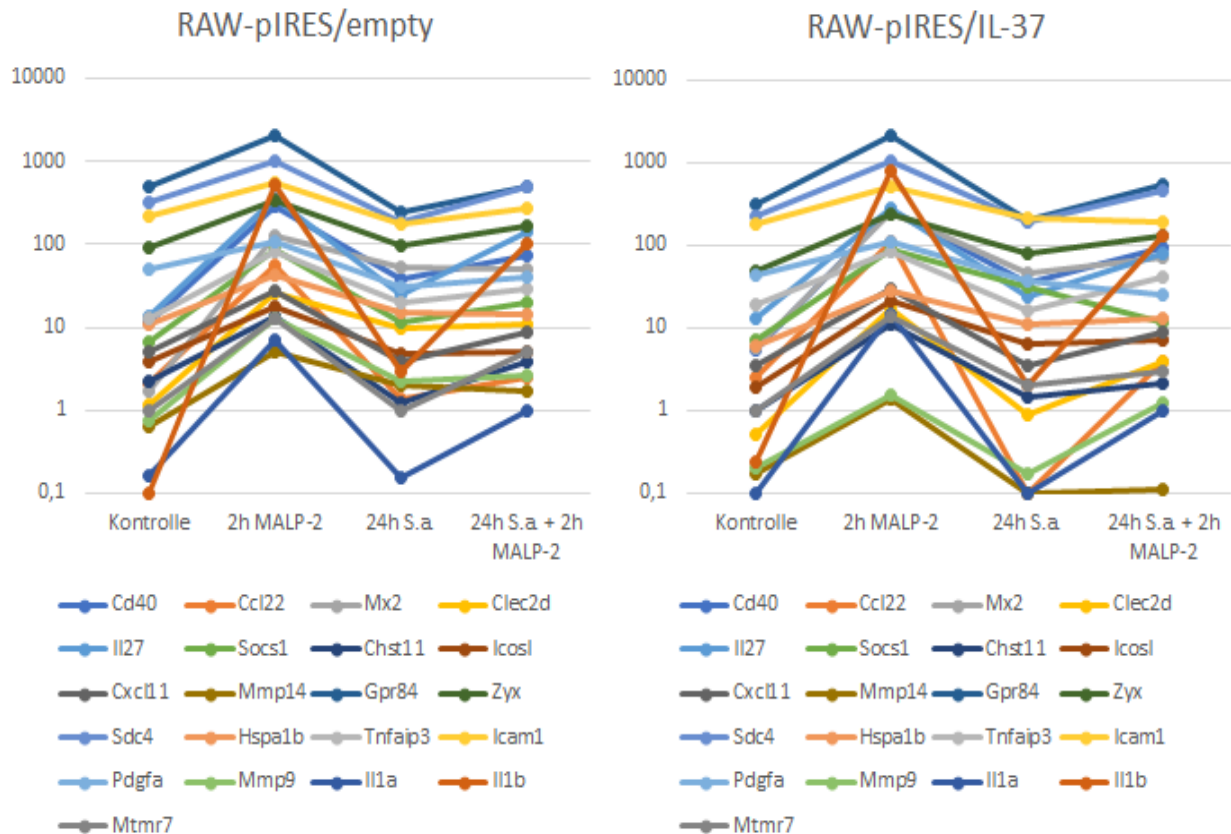
Nach Prestimulation mit *S. aureus* ließen sich die folgenden 22 T-Gene nachweisen (Tnf als Referenzgen mit aufgelistet):

**Tabelle 6.3: RPKM und FC der T-Gene nach *S. aureus*-Stimulation**

Gen	RPKM	RPKM	FC	RPKM	FC	RPKM	FC	FC-Quotient
	Kontrolle	2h MALP-2	2h MALP-2	24h S.a.	24h S.a.	24h S.a. + 2h MALP-2	24h S.a. + 2h MALP-2	
<b>RAW-pIRES/empty</b>								
Tnf	211	2401	11	545	3	1407	7	0,64
Cd40	12	280	24	39	3	73	6	0,25
Ccl22	2	55	26	1	-2	2	1	0,04
Mx2	2	129	76	52	31	51	30	0,39
Clec2d	1	25	22	10	9	11	9	0,41
Il27	13	366	28	25	2	140	11	0,39
Socs1	7	87	13	11	2	20	3	0,23
Chst11	2	14	6	1	-2	4	2	0,33
Icosl	4	17	4	5	1	5	1	0,25
Cxcl11	5	28	6	4	1	9	2	0,33
Mmp14	1	5	8	2	3	2	3	0,38
Gpr84	503	2101	4	240	-2	496	1	0,25

<b>Zyx</b>	93	336	4	98	1	170	2	0,50
<b>Sdc4</b>	325	1004	3	188	-2	489	2	0,67
<b>Hspa1b</b>	11	42	4	15	1	15	1	0,25
<b>Tnfaip3</b>	13	81	6	19	2	28	2	0,33
<b>Icam1</b>	220	561	3	177	1	279	1	0,33
<b>Pdgfa</b>	49	108	2	31	-2	40	1	0,50
<b>Mmp9</b>	1	13	17	2	3	3	3	0,18
<b>Il1a</b>	0	7	42	0	-2	1	6	0,14
<b>Il1b</b>	0	512	5123	3	26	101	1013	0,20
<b>Mtmr7</b>	1	13	17	1	1	5	7	0,41
<b>RAW-pIRES/IL-37</b>								
<b>Tnf</b>	160	1877	11	573	4	1578	10	0,91
<b>Cd40</b>	6	262	47	36	6	95	17	0,36
<b>Ccl22</b>	2	113	46	0	-25	4	2	0,04
<b>Mx2</b>	6	247	43	47	8	73	13	0,30
<b>Clec2d</b>	1	18	33	1	2	4	7	0,21
<b>Il27</b>	13	284	21	24	2	81	6	0,29
<b>Socs1</b>	7	89	12	32	4	12	2	0,17
<b>Chst11</b>	1	11	12	1	2	2	2	0,17
<b>Icosl</b>	2	21	11	6	3	7	4	0,36
<b>Cxcl11</b>	4	30	8	3	1	9	2	0,25
<b>Mmp14</b>	0	1	8	0	-2	0	-2	-0,25
<b>Gpr84</b>	318	2097	7	206	-2	547	2	0,29
<b>Zyx</b>	50	237	5	82	2	132	3	0,60
<b>Sdc4</b>	230	1056	5	196	1	471	2	0,40
<b>Hspa1b</b>	6	28	5	11	2	13	2	0,40
<b>Tnfaip3</b>	20	86	4	16	1	42	2	0,50
<b>Icam1</b>	187	526	3	217	1	193	1	0,33
<b>Pdgfa</b>	44	111	3	37	1	25	-2	-0,67
<b>Mmp9</b>	0	2	8	0	1	1	6	0,75
<b>Il1a</b>	0	15	155	0	1	1	11	0,07
<b>Il1b</b>	0	785	3287	2	7	131	547	0,17
<b>Mtmr7</b>	1	14	19	2	2	3	3	0,16

Der ähnliche Verlauf der Expression der 22 o. g. T-Gene nach *S. aureus*-Stimulation ist graphisch in Abbildung 6.13 dargestellt. Auch hier sind die oben genannten Merkmale für T-Gene nachweisbar.



**Abb. 6.13: RPKM-Werte der 22 T-Gen-Kandidaten nach *S. aureus*-Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation:** 22 T-Gen-Kandidaten zeigten verstärkte RPKMs nach zweistündiger MALP-2-Stimulation, erreichten 24h nach *S. aureus*-Stimulation nahezu ihr Ausgangsniveau und verzeichneten nach zweistündiger Restimulation mit MALP-2 deutlich niedrigere RPKM-Werte als nach der zweistündigen MALP-2-Proinflammation.

Bei der Analyse der Genexpression in der Toleranz in Abhängigkeit von der IL-37B-Expression zeigte sich, dass es kein Gen gibt, welches in Anwesenheit von IL-37B-zusätzlich die Kriterien der Toleranz erfüllt. Die IL37B-Expression beeinflusst die Genexpression nach Erststimulation hinsichtlich der Toleranzinduktion daher nicht. Geringfügige Unterschiede in den Quotienten der Pro- und Re-Inflammation traten zwar auf, d. h. die Toleranz unterschiedlicher Gene war in den beiden Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt, jedoch zeigten sich hier unterschiedliche Tendenzen ohne allgemeinen Trend. So war die Toleranzinduktion für TNF $\alpha$  nach Stimulation mit *S. pneumoniae* und *S. aureus* in RAW-pIRES/empty-Zellen z. B. stärker ausgeprägt als in RAW-pIRES/IL37-Zellen (Quotient 0,36 in RAW-pIRES/empty-Zellen gegenüber 0,64 in RAW-pIRES/IL37-Zellen für *S. pneumoniae*; vergleiche Tabelle 6.2 und 6.3), während für MX2 eine stärkere Toleranz nach Stimulation mit beiden Gram-positiven Bakterien in RAW-pIRES/IL37-Zellen gemessen werden konnte (Quotient 0,33 in RAW-pIRES/empty-Zellen gegenüber 0,16 in RAW-pIRES/IL37-Zellen in *S. pneumoniae*-Stimulationen).

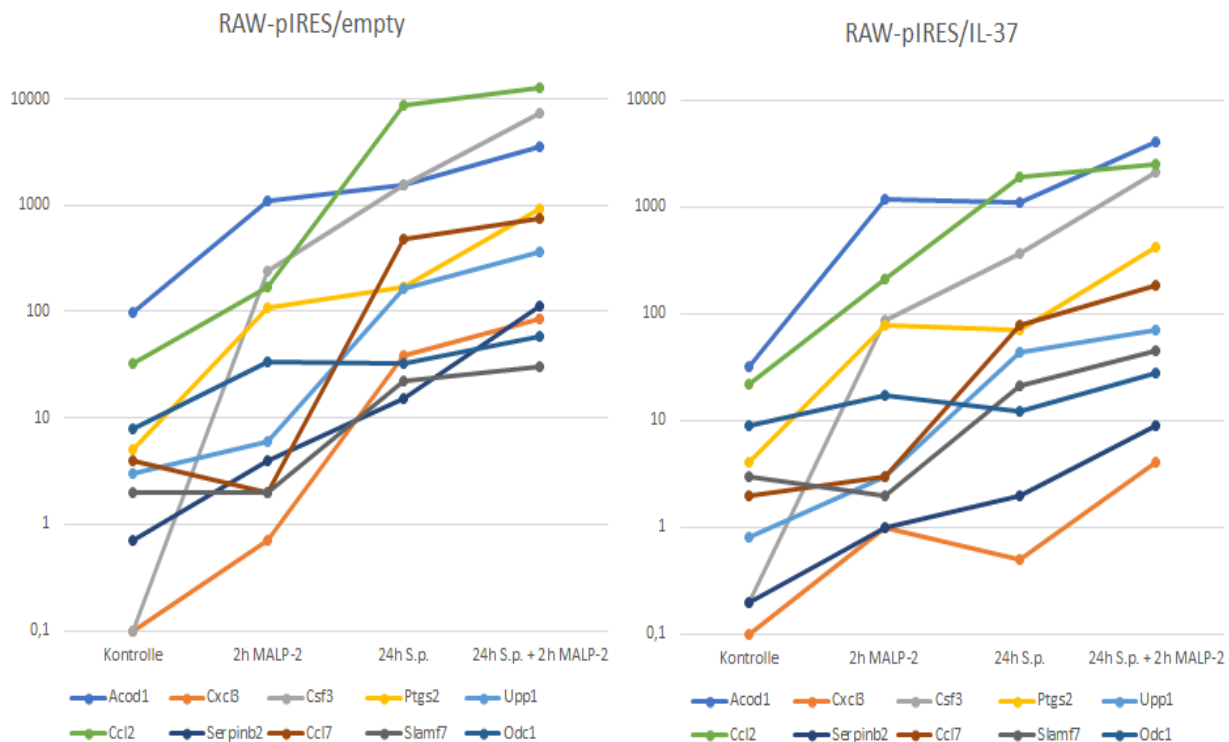
## 6.4.2 Identifizierung nicht-tolerisierbarer Gene mittels RNA-AmpliSeq

Die Untersuchung nicht-toleranter Gene erfolgte analog zur Untersuchung der T-Gene. Hierbei sollten die NT-Gene herausgefiltert werden, die im Vergleich zur Proinflammation nach der Restimulation eine erhöhte Expression ( $FC \geq 2$ ) zeigen. Anhand des Kontrollwertes nach 24-stündiger Bakterienstimulation wurden Gene mit verzögerter Expressionskinetik ausgeschlossen. Tab. 6.4 stellt die nach *S. pneumoniae*-Stimulation detektierten NT-Gene mit ihren RPKM-werten und Fold-Changes dar.

Tabelle 6.4: RPKM-Werte und FC der NT-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation

Gen	RPKM	RPKM	FC	RPKM	FC	RPKM	FC	FC-Quotient
	Kontrolle	2h MALP-2	2h MALP-2	24h S.p.	24h S.p.	24h S.p. + 2h MALP-2	24h S.p. + 2h MALP-2	
<b>RAW-pIRES/empty</b>								
<b>Acod1</b>	97	1109	11	1549	16	3543	37	3
<b>Cxcl3</b>	0,1	0,7	7	38	380	86	860	123
<b>Csf3</b>	0,1	237	2370	1576	15760	7417	74170	31
<b>Ptgs2</b>	5	110	22	169	34	914	183	8
<b>Upp1</b>	3	6	2	164	55	366	122	61
<b>Ccl2</b>	32	170	5	8787	275	12710	397	79
<b>Serpib2</b>	0,7	4	6	15	21	114	163	27
<b>Ccl7</b>	4	2	0,5	481	120	747	187	374
<b>Slamf7</b>	2	2	1	22	11	30	15	15
<b>Odc1</b>	8	34	4	33	4	58	7	2
<b>RAW-pIRES/IL-37</b>								
<b>Acod1</b>	32	1175	37	1087	34	4101	128	3
<b>Cxcl3</b>	0,1	1	10	0,5	5	4	40	4
<b>Csf3</b>	0,2	85	425	370	1850	2135	10675	25
<b>Ptgs2</b>	4	77	19	71	18	419	105	6
<b>Upp1</b>	0,8	3	4	43	54	71	89	22
<b>Ccl2</b>	22	211	10	1898	86	2499	114	11
<b>Serpib2</b>	0,2	1	5	2	10	9	45	9
<b>Ccl7</b>	2	3	2	79	40	187	94	57
<b>Slamf7</b>	3	2	1	21	7	45	15	15
<b>Odc1</b>	9	17	2	12	1	28	3	2

Analog zu den T-Genen lässt sich die Expression der NT-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation graphisch darstellen (vgl. Abb. 6.14). Hierbei zeichnen sich die NT-Gene durch einen tendenziell fortlaufenden Anstieg des Graphen sowie einer maximalen Expression nach der Restimulation aus.



**Abb. 6.14: RPKM-Werte der NT-Gene nach *S. pneumoniae*-Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation:** 10 NT-Gene zeigten eine Zunahme der RPKMs nach zweistündiger MALP-2-Stimulation und verzeichneten nach zweistündiger Restimulation mit MALP-2 erneut höhere RPKM-Werte als nach der zweistündigen MALP-2-Proinflammation.

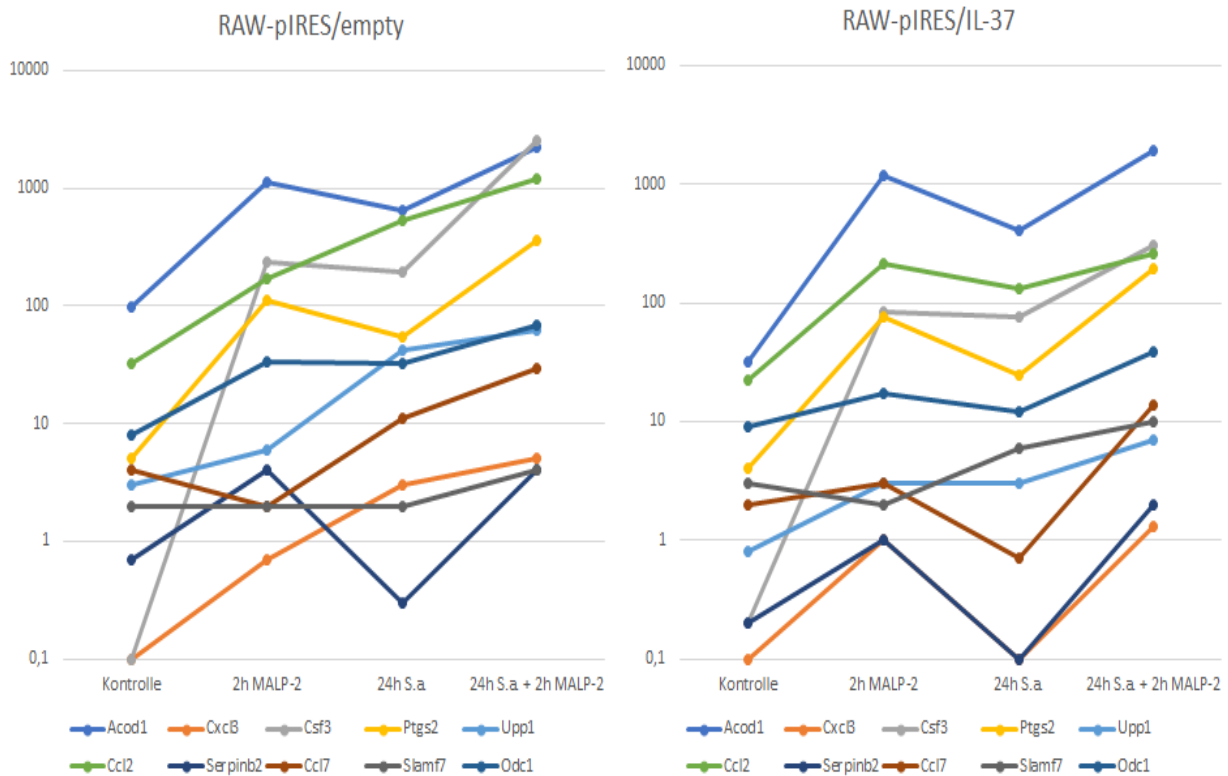
Die nach *S. aureus*-Prestimulation detektierten NT-Gene sind in Tab. 6.5 zusammengefasst.

**Tabelle 6.5: RPKM-Werte und FC der NT-Gene nach *S. aureus*-Stimulation**

Gen	RPKM	RPKM	FC	RPKM	FC	RPKM	FC	FC-Quotient
	Kontrolle	2h MALP-2	2h MALP-2	24h S.a.	24h S.a.	24h S.a. + 2h MALP-2	24h S.a. + 2h MALP-2	
<b>RAW-pIRES/empty</b>								
<b>Acod1</b>	97	1109	11	644	7	2223	23	2
<b>Cxcl3</b>	0,1	0,7	7	3	30	5	50	7
<b>Csf3</b>	0,1	237	2370	197	1970	2520	25200	11
<b>Ptgs2</b>	5	110	22	55	11	360	72	3
<b>Upp1</b>	3	6	2	42	14	63	21	11
<b>Ccl2</b>	32	170	5	532	17	1188	37	7
<b>Serpinb2</b>	0,7	4	6	0,3	0,4	4	6	1
<b>Ccl7</b>	4	2	0,5	11	3	29	7	14
<b>Slamf7</b>	2	2	1	2	1	4	2	2
<b>Odc1</b>	8	34	4	32	4	68	9	2
<b>RAW-pIRES/IL-37</b>								
<b>Acod1</b>	32	1175	37	414	13	1930	60	2
<b>Cxcl3</b>	0,1	0,7	10	0,1	1	1,3	13	1
<b>Csf3</b>	0,2	85	425	76	380	306	1530	4
<b>Ptgs2</b>	4	77	19	25	6	192	48	3
<b>Upp1</b>	0,8	3	4	3	4	7	9	2

<b>Ccl2</b>	22	211	10	132	6	256	12	1
<b>Serpib2</b>	0,2	1	5	0,1	0,5	2	10	2
<b>Ccl7</b>	2	3	2	0,7	0,35	14	7	4
<b>Slamf7</b>	3	2	1	6	2	10	3	3
<b>Odc1</b>	9	17	2	12	1	39	4	2

Graphisch stellt sich der Verlauf der RPKM-Werte in Abhängigkeit der Stimulation nach *S. aureus*-Stimulation wie folgt dar (vgl. Abb. 6.15):



**Abb. 6.15: RPKM-Werte der NT-Gene nach *S. aureus*-Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation:** 10 NT-Gene zeigten eine Zunahme der RPKMs nach zweistündiger MALP-2-Stimulation und verzeichneten nach zweistündiger Restimulation mit MALP-2 erneut höhere RPKM-Werte als nach der zweistündigen MALP-2-Proinflammation.

Insgesamt war auffällig, dass es keine NT-Gene gibt, welche diese Kriterien nur für eine der beiden Zelllinien bzw. für eines der beiden Bakterien erfüllen. In beiden Zelllinien - mit und ohne IL37B – sind die NT-Gene gleichermaßen detektierbar. Letztlich hat die IL37B-Expression in den RAW-Zellen also auch auf die NT-Gen-Expression keine allgemein gültige Auswirkung.

#### 6.4.2 Durch IL-37B veränderte Genexpression

Um einzelne Gene zu ermitteln, deren Expression möglicherweise von IL-37B moduliert wird, wurden die RPKM-Werte der RAW-pIRES/empty mit denen der RAW-pIRES/IL-37-Zellen in unstimulierten als auch in stimulierten und tolerierten Zellen verglichen, um IL37B-vermittelte Effekte auf die Genexpression aufzuzeigen. Dabei wurden alle Gene herausgefiltert, deren RPKM-Werte in den RAW-pIRES/IL37-Zellen

für alle Stimulationen um den Faktor 2 größer bzw. kleiner waren als in der entsprechenden Stimulation der RAW-pIRES/empty-Zellen. Hierbei wurden die unter Tab. 6.4 zusammengefassten Gene herausgefiltert, die während der Proinflammation eine einheitliche Tendenz zur verstärkten oder verringerten Expression unter IL-37B-Präsenz aufwiesen.

**Tabelle 6.6: Liste von Genen, die nach RNA-AmpliSeq abweichende Expression in RAW-pIRES/IL37-Zellen im Vergleich zu RAW-pIRES/empty-Zellen zeigten (RPKM-Quotient >2 oder <0,5 in allen Stimulationen)**

Gen-symbol	RAW-pIRES/empty RPKM				RAW-pIRES/IL-37 RPKM				Prozentuale Veränderung			
	Kontr.	2h MALP-2	24h S.p.	24h S.a.	Kontr.	2h MAL P-2	24h S.p.	24h S.a.	Kontr.	2h MALP -2	24h S.p.	24h S.a.
<b>Verstärkte Expression unter Anwesenheit von IL-37B</b>												
<b>Cd84</b>	1,6	0,6	2	1,7	5,5	1,2	5,6	3,1	<b>344%</b>	<b>200%</b>	<b>280%</b>	<b>182%</b>
<b>Cxcr4</b>	52,9	2,4	14,9	14,6	102,9	5	38,7	39,2	<b>195%</b>	<b>208%</b>	<b>260%</b>	<b>268%</b>
<b>Gdf15</b>	65,7	15,8	66	65,2	221,1	73,5	404,4	239,2	<b>337%</b>	<b>465%</b>	<b>613%</b>	<b>367%</b>
<b>Pdcd1</b>	7	61,9	13,3	17	11	82,7	47,4	40	<b>157%</b>	<b>134%</b>	<b>356%</b>	<b>235%</b>
<b>Rgs16</b>	34	69,5	55,6	59,1	77,2	230,6	61,5	84,8	<b>227%</b>	<b>332%</b>	<b>111%</b>	<b>143%</b>
<b>Verminderte Expression unter Anwesenheit von IL-37B</b>												
<b>Arhgap26</b>	13,4	11	6,9	16,1	6,3	6,7	3,2	7,6	47%	61%	46%	47%
<b>Cav1</b>	4	3,2	6,4	3,9	3,3	0,2	1,1	0,4	83%	6%	17%	10%
<b>Clec2d</b>	1,1	25,4	11,3	9,8	0,5	17,6	3,9	0,9	45%	69%	35%	9%
<b>Crlf2</b>	12,2	15,6	12,3	20,3	1,9	3,6	3,1	3,3	16%	23%	25%	16%
<b>Csf3</b>	0,1	237,5	1576	196,5	0,2	85,1	369,7	76,1	<b>200%</b>	36%	23%	39%
<b>Cxcl14</b>	67	13,1	5,2	9,3	16	1,6	0,6	1,8	24%	12%	12%	19%
<b>Entpd1</b>	2,8	2,3	5,2	3,7	3,2	0,4	1,2	0,8	<b>114%</b>	17%	23%	22%
<b>Gypc</b>	63,7	60,3	76,4	97,4	18,1	25,5	26,7	36,2	28%	42%	35%	37%
<b>Itgam</b>	218,1	422,2	1057,6	558,4	109,9	167,3	500,1	260	50%	40%	47%	47%
<b>Lypd2</b>	112,6	97,5	148,9	71,5	136	4,1	6,3	2,2	<b>121%</b>	4%	4%	3%
<b>Mmp14</b>	0,6	5	1,7	2	0,2	1,4	0,1	0,1	33%	28%	6%	5%
<b>Mmp9</b>	0,8	12,6	6,2	2,2	0,2	1,6	1,8	0,2	25%	13%	29%	9%
<b>Odc1</b>	8,2	33,9	32,8	32,3	9,5	16,6	12,2	12,1	<b>116%</b>	49%	37%	37%
<b>Plekha2</b>	23,3	21,2	18,7	19,1	15,4	4,1	3,5	4	66%	19%	19%	21%
<b>Ptgs2</b>	4,9	109,8	168,6	55,1	3,8	76,9	61,4	24,7	78%	70%	36%	45%
<b>Rnd1</b>	16,4	9,2	16,1	9,6	11,4	1,5	3,6	0,3	70%	16%	22%	3%
<b>Sell</b>	5,2	2,2	4,5	2,7	1	0,3	0,2	0,2	19%	14%	4%	7%
<b>Slamf1</b>	49,1	16,5	35,8	14,5	24,4	0,5	0,4	0,1	50%	3%	1%	1%
<b>Tarm1</b>	118,6	96	142,6	56,8	73	17,4	20,6	11,5	62%	18%	14%	20%
<b>Upp1</b>	2,9	6,2	164,2	42,3	0,8	2,6	43,4	2,9	28%	42%	26%	7%

Auffällig war hierbei, dass die als IL37-abhängig differentiell exprimiert identifizierten Gene (Tabelle 6.4) auf alle 3 Stimulationen (MALP-2, *S. pneumoniae* und *S. aureus*) in dieselbe Richtung reagierten, also mit ausschließlich gesteigerter oder verminderter Expression. Weiterhin waren die meisten Gene, die durch IL-37-Expression unterschiedliche RPKM-Werte und Fold-Changes aufwiesen, wie z. B. Gdf15 oder Mmp9, bereits im nichtstimulierten Zustand in IL-37B produzierenden Zellen verstärkt exprimiert bzw. supprimiert detektierbar. Bei Cav1, Entpd, Lypd2 oder Odc1 zeigte sich ein IL37-abhängiger Effekt dagegen erst nach der bakteriellen Stimulation. Die Gene Plekha2, Rnd, Slamf1 und Tarm1 zeigen zwar auch im nichtstimulierten Zustand in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen eine verminderte Expression, diese wird allerdings infolge der Stimulationen noch stärker gehemmt. Eine Sonderstellung nimmt Csf3 ein, welches im Grundzustand unter Anwesenheit von IL-37 doppelt so stark, nach Stimulation aber vermindert exprimiert wird.

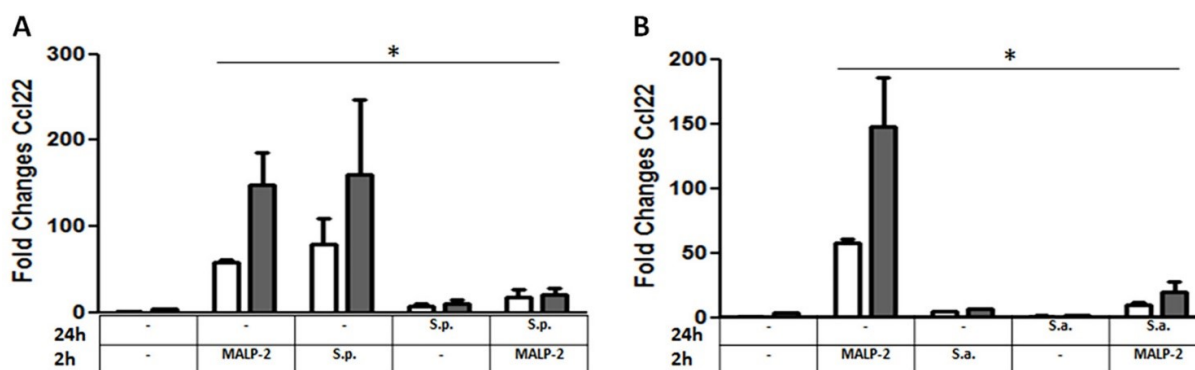
## 6.5 Verifikation der RNA-AmpliSeq Ergebnisse durch qPCR

In weiteren Experimenten wurde nun überprüft, ob die in der RNA-AmpliSeq ermittelten, in RAW-Zellen durch IL-37B-Expression verändert exprimierten Gene, in qPCR Versuchen bestätigt werden konnten. Anhand der Sequenzierungsdaten wurden einige Gene ausgewählt, die entweder als T-Gene in RAW-Zellen nach *S. aureus*- oder *S. pneumoniae*-Stimulation identifiziert wurden, oder durch IL-37B-Expression differentiell detektiert wurden. Neben den Sequenzierungsdaten spielten auch ihre möglichen funktionellen Einflüsse auf die Immunantwort der Makrophagen oder auf bakterielle Infektionen hin eine Rolle. Zu den ausgewählten und eingehender untersuchten Genen zählen *Gdf15*, *Pdcd1*, *Clec2d*, *Lypd2*, *Mmp9*, und *Slamf1*, die unter Anwesenheit von IL-37B in den RAW-Zellen ein deutlich verändertes Expressionsmuster offenbarten. Weiterhin wurde einerseits *Ccl22*, welches die stärkste Toleranz zeigte, und andererseits IL-27, welches sowohl Tolerierbarkeit als auch auf eine Modulation durch IL-37B während der Toleranz zeigte, genauer untersucht. Hierfür wurden die beiden Zelllinien RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37 analog zur Sequenzierung (vgl. Abb. 5.2 Methodenteil) stimuliert und anschließend die Expression der identifizierten Genkandidaten mittels qPCR analysiert.

### 6.5.1 *Ccl22* ist tolerisierbar

*Ccl22* wirkt extrazellulär chemotaktisch auf Monozyten, dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen. Weiterhin spielt es eine Rolle in der Physiologie aktivierter T-Lymphozyten und führt diese zu entzündetem Gewebe. Das Gen zeigte in der RNA-AmpliSeq in beiden Zelllinien eine verstärkte Expression nach zweistündiger MALP-2-Stimulation ( $FC > 26$ ). Nach 24-stündiger Bakterienstimulation war diese in allen Proben wieder auf Normalniveau ( $FC < 2$ ) und nach zweistündiger Restimulation mit MALP-2 blieb das Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert, d. h. stark reprimiert ( $FC < 3$ ). In der qPCR wurde diese Tendenz bestätigt (vgl. Abb. 6.16). Nach zweistündiger MALP-2 Stimulation war eine signifikante Zunahme der *Ccl22*-mRNA feststellbar. Erfolgte die MALP-2-Stimulation jedoch 24h nach Erststimulation mit Bakterien, stieg die *Ccl22*-Expression nach zweistündiger Restimulation nur marginal an (vgl. Abb. 6.16). Dabei befand sich die *Ccl22*-Expression nach der 24-stündigen Vorstimulation nahezu wieder auf Normalniveau (unstimulierte Kontrolle). In der toleranten Phase waren zwischen *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation kaum Unterschiede festzustellen. Allerdings zeigte sich nach zweistündiger *S. aureus*-Stimulation im Gegensatz zur *S. pneumoniae*-Stimulation keine gesteigerte Expression des *Ccl22*-Gens. Unter Anwesenheit von IL-37B war eine Tendenz zu gesteigerten *Ccl22*-Expressionen nach Erststimulation festzustellen, welche mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung, wo *Ccl22* in RAW-pIRES/IL37-Zellen im Vergleich zu RAW-pIRES/empty-Zellen fast zweifach so stark exprimiert detektiert wurde, korreliert. Statistisch war dieser Effekt jedoch aufgrund hoher Varianzen nicht signifikant (ANOVA).



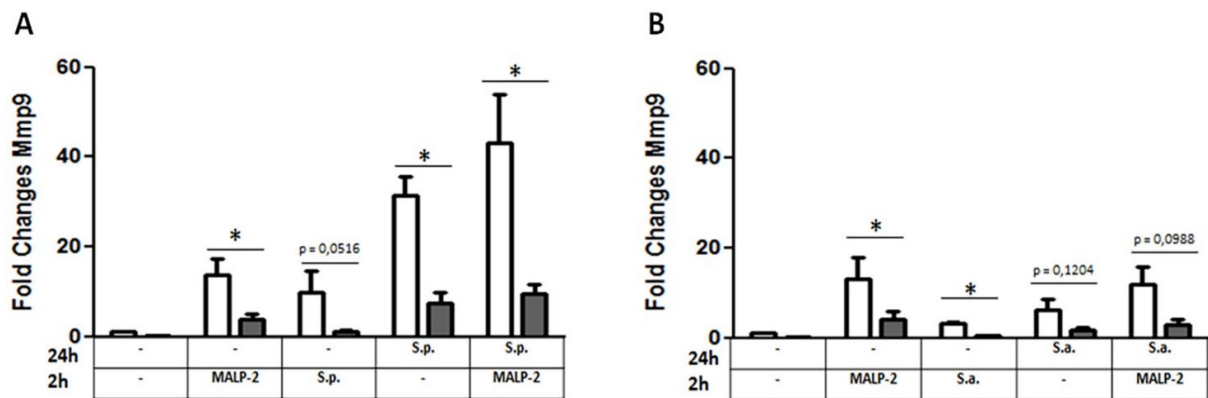


**Abb. 6.16: Nachweis der Ccl22-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37- (grau) Zellen durch qPCR:** Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae D39 Δcps* oder *S. aureus* statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. Zur Überprüfung der Toleranzinduktion wird die Expression von Ccl22 nach der Restimulation (Spalte 5) mit der zugehörigen zweistündigen Proinflammation durch MALP-2 (Spalte 2) verglichen. Die Expression von Ccl22 ist nach der Restimulation in beiden Proben signifikant verringert. \*  $p < 0,05$ .  $n=3$

### 6.5.2 Mmp9 und Slamf1 werden unter Anwesenheit von IL-37B vermindert exprimiert

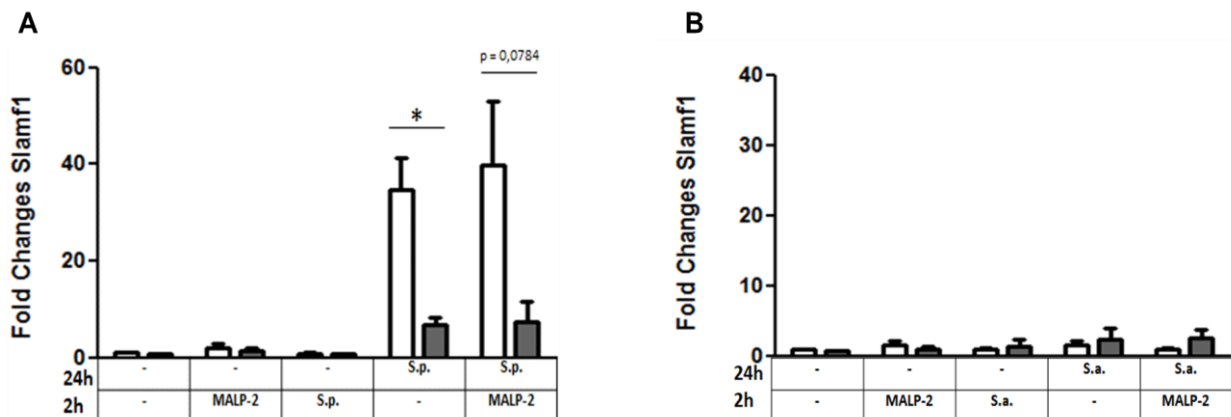
Mmp9 gehört zu den Zink-Metalloproteinasen und kommt u.a. in Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen vor. Seine Hauptaufgabe besteht als Enzym im Abbau der extrazellulären Matrix während physiologischer Prozesse wie z.B. Angiogenese, Knochenbildung oder Wundheilung.

In den Sequenzierungsdaten fiel Mmp9 als Gen auf, das zwar eine sehr geringe Grundexpression (RPKM < 1) aufwies, aber bei Anwesenheit von IL-37B dennoch vermindert exprimiert wurde. Trotz niedriger Expressionslevel im unstimulierten Zustand zeigte Mmp9 nach MALP-2-Stimulation unabhängig von IL-37B eine gesteigerte Expression nach bakterieller Stimulation (Proinflammation FC = 8). Im Vergleich zu den RAW-pIRES/empty-Zellen betrug das Expressionslevel des Gens in RAW-pIRES/IL-37-Zellen in allen Proben nur etwa ein Viertel bis ein Drittel des Expressionslevels. Diese Tendenz wurde nun in weiteren Experimenten mittels qPCR untersucht. Unabhängig von der Stimulation war die Mmp9-Expression in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen durchgehend verringert (vgl. Abb 6.17). Hinsichtlich der Tolerierbarkeit von Mmp9 waren die Ergebnisse der Sequenzierung und der qPCR nicht eindeutig. Betrachtete man die Fold-Change-Quotienten (Tab. 6.2, 6.3.), fiel auf, dass dieser unter Anwesenheit von IL-37B anstieg und die Tolerierbarkeit somit scheinbar abnahm. In den Ergebnissen der qPCR war jedoch generell keine Tolerierbarkeit für Mmp9 nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation nachweisbar. Im Unterschied dazu fiel deutlich auf, dass Mmp9 in RAW-pIRES/IL-37-Zellen nach allen Stimulationen deutlich vermindert exprimiert wird (vgl. Abb. 6.17).



**Abb. 6.17** Nachweis der Mmp9-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37- (grau) Zellen durch qPCR: Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps oder *S. aureus* statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. In allen Stimulationen zeigte sich eine verringerte Mmp9-Expression bei Anwesenheit von IL-37B; \*  $p < 0,05$ . Beim Vergleich der Expression von Mmp9 nach der Restimulation (Spalte 5) mit der zugehörigen zweistündigen Proinflammation durch MALP-2 (Spalte 2) war keine Toleranzinduktion festzustellen.

Rezeptoren der SLAM-Familie modulieren die Aktivierung und Differenzierung verschiedener Immunzellen und regulieren das Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immunantworten. Das Gen Slamf1 zeichnete sich in der Sequenzierung dadurch aus, dass es in den RAW-pIRES/IL-37 nahezu nicht nachweisbar war, während es in RAW-pIRES/empty-Zellen mit RPKM-Werten von bis zu 50 solide exprimiert war. Die geringe Expression von Slamf1 in RAW-pIRES/IL37-Zellen konnte in der qPCR bestätigt werden. Hier wurde Slamf1 in gut nachweisbarer Menge nach Stimulation über 24h exprimiert. Verglichen mit den RAW-pIRES/empty-Zellen zeigten die RAW-pIRES/IL-37- Zellen ein deutlich vermindertes Expressionsniveau, wodurch sich die Sequenzierungsdaten bestätigten. Nach Stimulation mit MALP-2 oder *S. aureus* war die Genexpression von Slamf1 auch nach 40 PCR-Zyklen nicht nachweisbar und folglich nicht mathematisch auswertbar (vgl. Abb. 6.18).



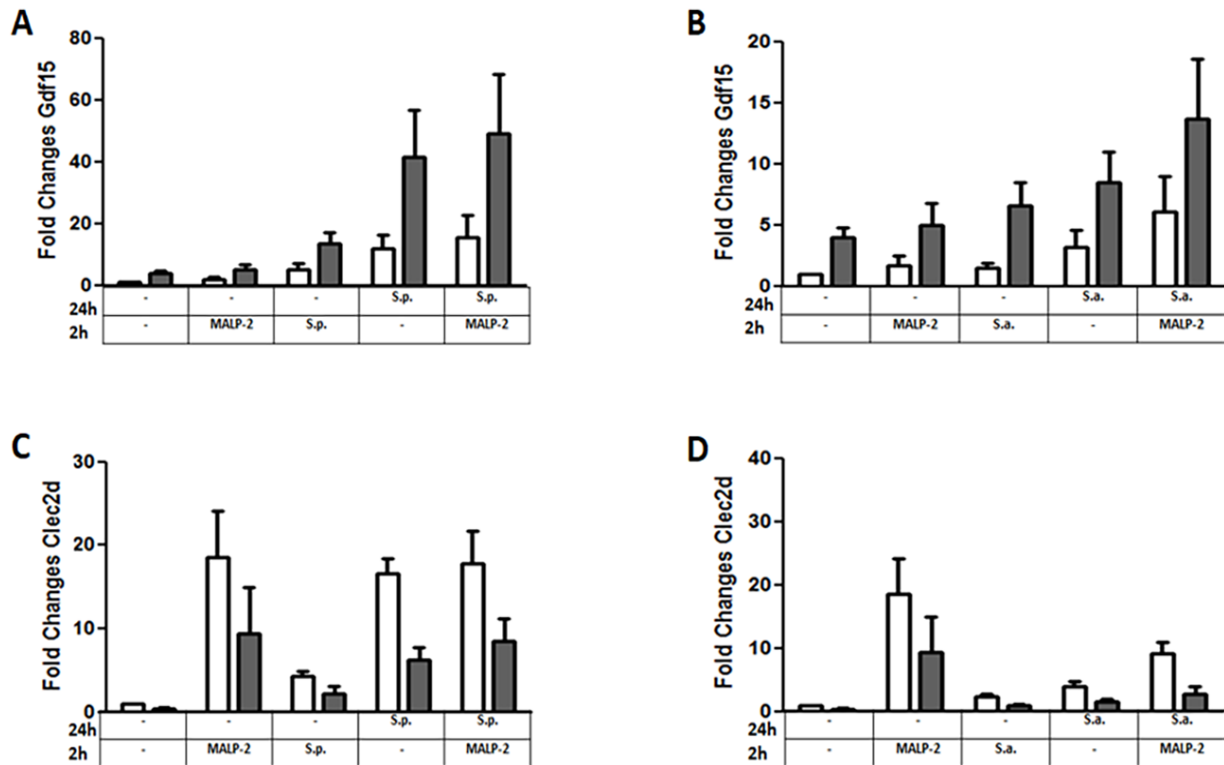
**Abb. 6.18:** Nachweis der Slamf1-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR: Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik)

dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. Slamf1 wurde in beiden Zelllinien nur nach Langzeitstimulation mit *S. pneumoniae* (A; Spalten 4, 5) nachweisbar. Dabei wurde es in den RAW-pIRES/empty-Zellen 6x stärker exprimiert als in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen. Nach *S. aureus*-Stimulation konnte keine relevante Expression von Slamf1 nachgewiesen werden (B). \*  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ .

### 6.5.3 IL-37B Effekte auf die Gdf15- und Clec2d-Expression

Gdf15, auch bekannt als Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), spielt in der Regulation inflammatorischer und apoptotischer Signalkaskaden in verletztem oder entzündetem Gewebe eine Rolle. Durch Bindung an TGF $\beta$ -Rezeptoren werden Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie rekrutiert und somit die Genexpression von Zellen reguliert. Clec2d codiert einen Liganden für einen NK-Zell-Rezeptor, welcher bei Bindung mit KLRB1 die Zielzelle vor NK-Zell-vermittelter Lyse schützt.

Die Gene Gdf15 und Clec2d zeigten in der Sequenzierung veränderte Expressionsmuster unter Anwesenheit von IL-37B. So war GDF-15 in IL37B Zellen stärker exprimiert (sowohl im Ruhezustand, als auch nach Stimulation) während Clec2d sowohl nach Stimulation als auch im Ruhezustand verringert exprimiert wurde. Clec2d wurde zuvor als T-Gen identifiziert, dessen Tolerisierbarkeit in RAW-pIRES/IL37-Zellen verstärkt ausgeprägt war (Tab. 6.2, 6.3). In den weiterführenden Experimenten mittels qPCR zeigte sich jedoch, dass Clec2d in der toleranten Phase nicht vermindert exprimiert wird (Abb 6.19 C, D). Der Verdacht auf eine verstärkte (Gdf15) bzw. verminderte Expression (Clec2d) unter Anwesenheit von IL-37 konnte dagegen durch die weiterführenden Experimente mittels qPCR verifiziert werden. In der Analyse der qPCR-Daten war zu detektieren, dass Gdf15 in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen zu allen Zeitpunkten mit und ohne Bakterien verstärkt exprimiert wurde (Abb. 6.19 A, B). Besonders nach 24-stündiger *S. pneumoniae*-Stimulation zeigten die RAW-pIRES/IL37-Zellen eine stark erhöhte Expression gegenüber den unstimulierten, den 2 h stimulierten und den RAW-pIRES/empty-Zellen. Dieser Effekt war ebenfalls, wenn auch weniger ausgeprägt nach *S. aureus*-Stimulation sichtbar. Umgekehrt verhielt es sich bei Clec2d (Abb. 6.19 C, D). Hier war die Expression nach allen Stimulationen sowohl mit *S. pneumoniae* als auch mit *S. aureus* in den RAW-pIRES/IL37-Zellen um ca. die Hälfte abgeschwächt.



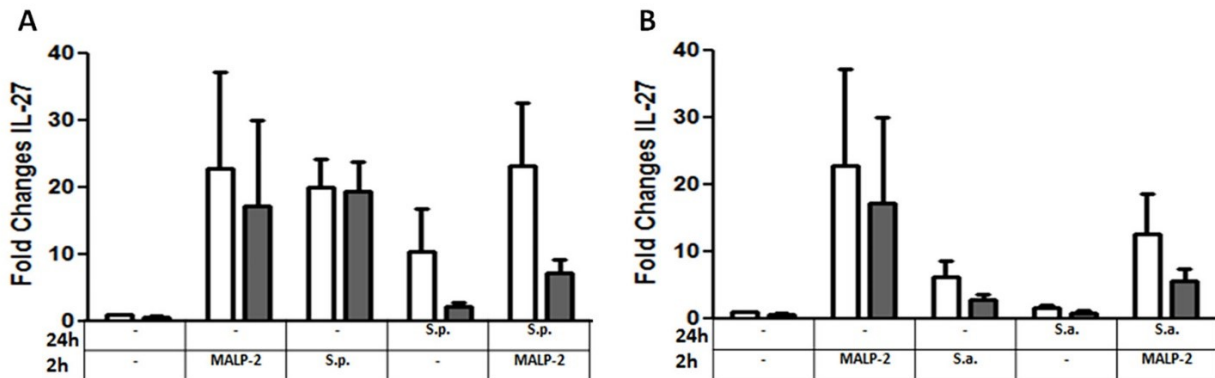
**Abb. 6.19: Nachweis der Gdf15- und Clec2d-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach bakterieller Stimulation in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37-Zellen (grau) durch qPCR:** Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta cps$  (A+C) oder *S. aureus* (B+D) statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. **A+B** Sowohl in Ruhe als auch nach zweistündiger sowie 24-stündiger Stimulation mit MALP-2 (A, B), *S. pneumoniae* (A) oder *S. aureus* (B) war die Expression von Gdf15 in RAW-pIRES/IL-37 zwei- bis dreifach verstärkt. **C+D** Sowohl in Ruhe als auch nach zweistündiger sowie 24-stündiger Stimulation mit MALP-2 (C, D), *S. pneumoniae* (C) oder *S. aureus* (D) war die Expression von Clec2d in RAW-pIRES/IL-37 verringert, jedoch ohne statistische Signifikanz. **A-D** Beim Vergleich der Expression von Gdf 15 und Clec2d nach der Restimulation (Spalte 5) mit der zugehörigen zweistündigen Proinflammation durch MALP-2 (Spalte 2) war keine Toleranzinduktion festzustellen. n=3

#### 6.5.4 IL-27-Expression in der qPCR

IL-27 ist ein Zytokin mit pro- und antiinflammatorischen Funktionen. Unter anderem reguliert es die Entwicklung von T-Helferzellen, unterdrückt die T-Zell-Proliferation, stimuliert zytotoxische T-Zell-Aktivität oder induziert einen Wechsel der B-Zell-Isoformen.

In der Sequenzierung wurde IL-27 als T-Gen identifiziert, das durch Anwesenheit von IL-37B in der Expression moduliert wurde. Die Expression von IL-27 in den RAW-Zellen zeigte eine hohe Varianz innerhalb der 3 Replikate auf, wodurch statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte. Auffällig ist jedoch die starke Expression nach 24-stündiger *S. pneumoniae*-Stimulation, die im Vergleich zur Expression nach *S. aureus*-Stimulation deutlich erhöht war. Weiterhin zeigten IL37B-transfizierte Zelleneinerseits Tendenzen zu einer leicht verringerten Expression, welche bereits

durch Nold et al. beschrieben wurden, und andererseits eine verstärkte Repression von IL-27 während der toleranten Phase (vgl. Abb. 6.20).

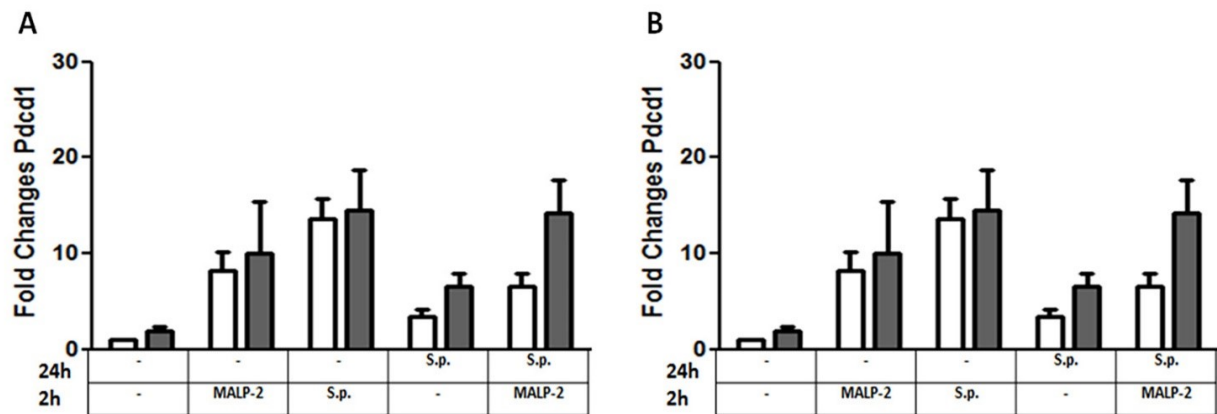


**Abb. 6.20 Nachweis der IL-27-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR:** Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae D39 Δcps* (A) oder *S. aureus* (B) statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. Zur Überprüfung der Toleranz wird die Expression von IL-27 nach der Restimulation (Spalte 5) mit der zugehörigen zweistündigen Proinflammation durch MALP-2 (Spalte 2) verglichen. Sowohl Toleranz als auch ein möglicher Effekt von IL-37B konnten aufgrund hoher Varianzen unter den Replikaten nicht nachgewiesen werden. n=3.

### 6.5.5 Kein Effekt von IL-37B auf Pdc1-Expression

Pdc1 ist ein inhibitorischer Rezeptor an der Zelloberfläche von Makrophagen, der in der Selbst-Toleranz durch Suppression von T-Zell-Antworten in der Immunantwort involviert ist. Nach Ligandenbindung werden T-Zell-Effektorfunktionen spezifisch inhibiert. Weiterhin gilt als möglicher Apoptoseauslöser.

Die Sequenzierung zeigte sich eine gesteigerte Expression von Pdc1 unter Anwesenheit von IL-37B (Tab. 6.4). Diese Beobachtung konnte durch weitere Untersuchungen mittels qPCR aber nicht bestätigt werden. In allen Proben war die Expressionsrate in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen nahezu identisch zu der in den RAW-pIRES/empty Zellen (vgl. Abb. 6.21). Nur in nach Restimulation der 24h mit *S. pneumoniae* vorstimulierten RAW-pIRES/IL-37-Zellen zeigte sich eine gesteigerte Expression, die jedoch nicht statistisch signifikant war.



**Abb. 6.21: Nachweis der Pdccl1-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR:** Beide Zelllinien wurden wie in Abb. 5.3 (Methodik) dargestellt stimuliert. Dabei fand die 24-stündige Prestimulation entweder mit *S. pneumoniae D39 Δcps* (A) oder *S. aureus* (B) statt. Zur zweistündigen Restimulation wurde MALP-2 verwendet. Zwischen beiden Zelllinien war in keiner Probe ein signifikanter Unterschied in der Pdccl1-Expression feststellbar. n=3.

## 7 DISKUSSION

Nach primärem Kontakt angeborener Immunzellen zu Endotoxinen kommt es bei einer kurz darauffolgenden erneuten Exposition zum Phänomen der Endotoxin-Toleranz. Hierbei handelt es sich eine verminderte Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden trotz wiederholter Endotoxin-Stimulation. Klinisch kommt es dadurch im Rahmen bakterieller Infektionen zu einer Dysregulation des Immunsystems bzw. unter Umständen auch zu einer Immunsuppression und damit einhergehend zu einer erhöhten Mortalität. Zur Toleranzentwicklung in Makrophagen bei Gram-positiven *S. aureus*- oder *S. pneumoniae*-Infektionen – insbesondere zu molekulargenetischen Veränderungen in diesem Stadium - gibt es bislang jedoch nur wenige Daten.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts verdichteten sich die Hinweise, dass IL-37 intrazellulär und extrazellulär als ein Suppressor des angeborenen und erworbenen Immunsystems fungiert (Nold et al. 2010, Boraschii et al. 2011). Dabei wird das Protein verstärkt in Makrophagen oder anderen Immunzellen exprimiert, nachdem diese Kontakt zum TLR4-Agonisten LPS oder TLR2-Agonisten MALP-2 hatten (Dinarello et al. 2016). Die Substanzen MALP-2 und insbesondere LPS wurden wiederum wiederholt mit dem Phänomen der Endotoxintoleranz in Makrophagen in Verbindung gebracht. Im Mittelpunkt der vorgelegten Arbeit steht daher die Frage, ob IL-37 einen Einfluss auf die Toleranzinduktion oder -ausprägung von Makrophagen bei Kontakt mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus* hat.

Hierfür wurde die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7 zunächst stabil mit dem Expressionsvektor pIRES-2-EGFP transfiziert. Die neu entstandenen Zelllinien RAW-pIRES/IL-37 und RAW-pIRES/empty wurden anschließend bezüglich der Expression bzw. Expressionskinetiken von IL-37 selbst, den Rezeptoren TLR2, SIGIRR und IL-18Ra sowie dem proinflammatorischen Zytokin TNF $\alpha$  charakterisiert, um die optimalen Stimulationszeiten für die Messung der Toleranz zu ermitteln. Im Ergebnis zeigte sich, dass beide Zelllinien die für die bakterielle Erkennung nötigen Rezeptoren TLR2 sowie die IL-37-Rezeptoren exprimieren. Hierbei war IL-37 trotz Verwendung des starken eukaryotischen CMV-Promotors zur Expression nur nach TLR-Aktivierung bzw. bakterieller Stimulation der RAW264.7-Zellen gut exprimiert nachweisbar, was sich durch eine Instabilitätssequenz in der für IL-37 codierenden Region der mRNA begründen lässt (Bufler et al., 2004). Die Expressionskinetik entsprach dabei der Hochregulation der TNF $\alpha$ -Expression.

Immunsuppression durch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 kann eine Rolle bei der Toleranzentwicklung spielen, jedoch können auch andere Mechanismen, z.B. Chromatinveränderungen nach Erststimulation, eine bedeutende Funktion einnehmen. Da IL-37 immunsuppressive Funktionen besitzt wurde die Möglichkeit einer funktionellen Beteiligung der IL37B-Expression in Restimulationsexperimenten mit Gram-positiven Bakterien auf die Toleranzinduktion in RAW264.7-Makrophagen näher untersucht.

Initial wurde die Toleranzinduktion durch qPCR und ELISA für TNF $\alpha$  untersucht, welches in der Literatur als tolerisierbares Gen beschrieben ist (Foster et al. 2007). Neben TNF $\alpha$  wurde auch IL-6, ein weiteres sog. T-Gen, untersucht. Es zeigte sich

aber, dass die IL-6-Expression in den RAW-Zellen erst spät und vor allem erst nach 24 h Stimulation gesteigert wurde (Daten nicht gezeigt) und daher nicht für die Toleranzentwicklung verwendet werden konnte. Um die Toleranzinduktion von Leervektor- und IL-37B-transfizierten Zellen auf globaler Ebene zu untersuchen, wurden anschließend mittels RNA-AmpliSeq Unterschiede in der Genexpressionsmenge spezifischer Gene von RAW264.7-Makrophagen untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl *S. pneumoniae* als auch *S. aureus* die RAW-Zellen nach Erststimulation in einen toleranten Zustand übergehen lassen, der durch verringerte Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene nach Zweitstimulation deutlich wurde. Durch die globale Erfassung der Expressionsänderungen von Genen konnten einerseits T- und NT-Gene, und andererseits Gene, deren Expression durch IL-37 beeinflusst wird, in dieser Arbeit ermittelt werden.

## 7.1 IL-37B-Expression in RAW-264.7-Zellen

Grundlage der Versuche waren die stabil transfizierten Zelllinien RAW-pIRES/IL-37 als humanes IL-37B exprimierende Zelllinie und RAW-pIRES/empty als Leervektor-Kontrolle. Im unstimulierten Zustand war in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen nicht das Protein, aber die IL-37B-mRNA mittels RT-PCR detektierbar. Unter Stimulation mit *S. pneumoniae*, *S. aureus*, MALP-2 oder Pam3CSK/MDP stieg die IL-37B-Expression signifikant an und war dann sowohl mittels Western Blot als auch mittels RT- und qPCR verstärkt nachweisbar. Ein ähnliches Expressionsverhalten von IL-37B in transfizierten RAW-Zellen beschrieben Bufler et al. für LPS-Stimulationen bereits 2004, allerdings konnte man es in dieser Arbeit im unstimulierten Zustand der Zellen auf mRNA-Ebene nicht detektieren. Dies wurde ebenfalls durch die Instabilitätssequenz im für IL-37 codierenden Abschnitt der mRNA erklärt, wodurch diese im nicht stimulierten Zustand beschleunigt abgebaut wird (Bufler et al. 2004, Boraschii et al. 2011). 2018 wurde ebenfalls eine gesteigerte IL-37-Expression in transfizierten RAW-Zellen nach Pneumokokkenkontakt bestätigt (Schauer et al. 2018). Die im Ruhezustand detektierbare mRNA, der in dieser Arbeit verwendeten RAW-Zellen, könnte daher auf einen leicht aktivierten Grundzustand der transfizierten RAW-Makrophagen hinweisen. Tatsächlich konnte in den RAW Zellen bereits unter unstimulierten Bedingungen eine recht hohe TNF $\alpha$ -mRNA-Produktion nachgewiesen werden, die sich durch CT-Werte im Bereich von 28 darstellte. Andererseits ist die Überexpression von IL-37B durch den CMV-Promotor im verwendeten Expressionssystem als recht stark anzusehen, wodurch auch die endogene Maschinerie, die für den mRNA-Abbau verantwortlich ist, überlastet sein könnte. Hierdurch kann eine geringe IL-37B-Expression auf Proteinebene unterhalb der Detektionsgrenze in diesem Zellsystem nicht ausgeschlossen werden. Detektierbare Mengen des IL-37B wurden auch nur nach bakteriellen oder TLR-Stimulationen und nach Immunpräzipitation des IL-37B aus Zelllysaten von RAW-Zellen gefunden.

RAW-Zellen sind eine Makrohagenzelllinie aus einer Präparation aus BAB/14 Mäusen, die aufgrund einer Infektion mit dem Abelson-Maus-Leukämievirus (AB-MLV) und einem ecotropen MLV Tumore entwickelt hatte. Damalige Tests auf Anwesenheit eines replikationskompetenten Virus waren negativ. Neuere Erkenntnisse zeigten aber, dass die RAW-Zellen durchaus replikationskompetente Viruspartikel abgeben



können, wodurch diese Zellen als Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die Risikogruppe 2 eingestuft wurden. Ob die Abgabe von Viruspartikeln auch in den hier verwendeten Zellen zutrifft, wurde nicht untersucht, könnte aber die leicht erhöhten TNF $\alpha$ -Werte im Grundzustand und die Detektion von geringen Mengen IL37-mRNA erklären. Weiterhin verwendeten Bufler et al. auch einen anderen Expressionsvektor namens pTarget als IL-37-Vektor, was ebenfalls zu Unterschieden in der Expression führen kann.

Trotz bereits beschriebener extrazellulärer Effekte sowie Mechanismen zur Sekretion von IL-37, war im Überstand der RAW-Zellen kein IL-37B durch eine der o. g. Stimulationen nach Immunpräzipitation und WB nachweisbar. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass extrazelluläres IL-37 nur im Überstand peripherer humaner Monozyten beschrieben wurde (Dinarello et al. 2016). Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass das synthetisierte IL-37B in RAW-Zellen intrazellulär akkumuliert, wo es wahrscheinlich seiner Funktion als antiinflammatorisches Zytokin nachkommt. Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten Schauer et al. 2018, wo IL-37 nach Pneumokokkenstimulation transfizierter RAW-Zellen ebenfalls nicht extrazellulär nachgewiesen werden konnte. Allerdings könnten auch sehr geringe extrazelluläre Mengen unterhalb der Nachweisgrenze deutliche Signalkaskaden auslösen, weshalb der hauptsächliche Wirkort von IL-37B in RAW-Zellen nicht abschließend geklärt werden konnte. Intrazelluläre Effekte erscheinen aber wahrscheinlich.

## **7.2 IL-37B zeigt nach Stimulation von RAW264.7-Zellen mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus* nur geringe Auswirkungen auf die Proinflammation**

Zahlreiche vorangegangene Studien zeigten für IL-37-produzierende Zellen eine Reduktion der proinflammatorischen Immunantwort. Insbesondere Nold et al. beschrieben 2010 eine breit gefächerte Suppression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 nach LPS-Stimulation IL-37B überproduzierender RAW-264.7-Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stimulationen mit MALP-2, *S. pneumoniae* und *S. aureus* zeigten im ELISA sowie in der qPCR lediglich für TNF $\alpha$  leichte Tendenzen zur verminderten Expression unter Anwesenheit von IL-37B, jedoch nicht mit konstanter Ausprägung. Allerdings beschrieben auch Nold et al. für TNF $\alpha$  nur geringe Verminderungen der Expression. Auffällig waren die generell geringen Fold-Changes für TNF $\alpha$ , die unabhängig von der Stimulation mittels qPCR während der Proinflammation ermittelt wurden. In Verbindung mit der im Ruhezustand detektierbaren IL-37-mRNA mittels RT-PCR erscheint ein nach Transfektion leicht aktivierter Grundzustand beider Zelllinien als die plausibelste Ursache. Die zur Proteinsynthese und Sekretion aussagekräftigeren ELISA-Daten zeigten im Ruhezustand jedoch keine erhöhten Konzentrationen von TNF $\alpha$  oder IL-6 im Zellkulturüberstand.

Geht man nun davon aus, dass sich beide Zelllinien aufgrund der möglichen Virusreplikation oder durch die erfolgte Transfektion mit Fremd-DNA in einem leicht aktivierten Grundzustand befinden, fallen die messbaren Fold-Changes proinflammatorischer Zytokine für beide Zelllinien geringer aus, als in nichtaktivierten

Makrophagen. Dies wirkt sich insbesondere auf die Daten der RAW-pIRES/empty-Zellen aus, die dadurch nicht das maximale bzw. „normale“ Expressionsniveau wie in primären Makrophagen widerspiegeln. Für die Fragestellung, ob IL-37 einen Einfluss auf die Toleranzinduktion nimmt, spielt ein leicht aktivierter Grundzustand der RAW-Zellen allerdings keine tragende Rolle, da hier beim Auswerten die Fold-Changes derselben Zelllinie untereinander verglichen werden. Die Fold-Changes diverser Gene nach zweistündiger MALP-2-Stimulation ohne Prestimulation werden mit den Fold-Changes desselben Gens derselben Zelllinie nach zweistündiger MALP-2-Restimulation nach 24-stündiger bakterieller Prestimulation verglichen. Da sich alle Fold-Changes jeweils auf die unstimulierte Kontrolle derselben Zelllinie beziehen, ist das Ergebnis – sofern eine solide Proinflammation induzierbar ist - unabhängig vom Grundzustand der Zelle.

### **7.3 Toleranzinduktion in RAW264.7-Zellen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* am Beispiel der TNF $\alpha$ -Expression**

Ein Großteil der Untersuchungen zur Toleranzinduktion in Makrophagen wurde bislang mit dem TLR4-Agonisten LPS durchgeführt. Diese Studien zeigten trotz einer ausgeprägten Proinflammation bei nachfolgenden Stimulationen eine verminderte Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , aber auch eine verstärkte Expression und Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10. Zur Toleranzinduktion in Makrophagen über den TLR2-Signalweg gibt es bislang deutlich weniger Daten. Sato et al. beschrieben in 2 Studien die Toleranzinduktion in Peritonealmakrophagen der Maus durch MALP-2 (TLR2/6) gegenüber der Restimulation mit MALP-2 oder LPS (Sato et al. 2000, 2002). Die Kreuz-Toleranz von MALP-2 und LPS wurde 2003 von einer unabhängigen Gruppe bestätigt (Deiters et al. 2003). Zur Toleranzinduktion durch Bakterienstimulation gibt es hingegen wenige bis keine vergleichbaren Studien. Peck et al. zeigten für THP-1-Zellen anhand der TNF $\alpha$ -Produktion, dass *S. aureus*-Stimulation Toleranz gegenüber weiteren Stimulationen mit *S. aureus* induziert; Restimulationen mit LPS führten nach *S. aureus*-Prestimulation allerdings zu einer erhöhten TNF $\alpha$ -Produktion (Peck et al. 2004). Ähnlich verhielt es sich in einer Studie von Kreutz et al. bei humanen Monozyten (Kreutz et al. 1997). Für die Toleranzinduktion bei Makrophagen nach Pneumokokkenkontakt gibt es bislang keine vergleichbaren Studien.

Im Rahmen dieser Arbeit führten Stimulationen mit *S. pneumoniae* bei einer MOI von 5 zu einer zuverlässigen Proinflammation ohne dass die Zellen apoptotisch wurden oder nekrotisch starben. Für *S. aureus* wurde daraufhin in einer MOI-Reihe von 0,5 bis 100 initial die MOI ermittelt, die eine mit *S. pneumoniae* vergleichbare Proinflammation hervorruft. Hierbei wurde festgestellt, dass ab einer MOI  $\geq 10$  keine weitere Steigerung der TNF $\alpha$ -Expression zu erzielen war. Obwohl die Expressionslevel der TNF $\alpha$ -mRNA nach zweistündiger *S. aureus*-Stimulation bei einer MOI von 10 unter denen nach *S. pneumoniae*-Stimulation lagen, waren im Zellkulturüberstand sowohl nach *S. aureus*- als auch nach *S. pneumoniae*-Stimulation vergleichbare TNF $\alpha$ -Mengen nachweisbar, was auf kinetische Unterschiede der RAW-Zellaktivierung durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* hindeutet (im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht). Dieser Arbeit vorangegangene Versuche an

RAW-Zellen zeigten für MALP-2-Stimulation eine verlässliche Proinflammation bei einer Konzentration von 100 ng/ml, was sich für die beiden Zelllinien RAW-pIRES/IL-37 und RAW-pIRES/empty bestätigte.

Für die Untersuchung der toleranten Phase wurden beide Zelllinien für 24h mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus* stimuliert und nach einer Ruhephase von 24 h anschließend noch einmal für 2 h (qPCR) bzw. 24h (ELISA) mit MALP-2 restimuliert. Die Expressionslevel nach der Restimulation wurden dann mit dem Expressionslevel der MALP-2-Proinflammation innerhalb derselben Zelllinie verglichen. Trotz zuverlässiger Proinflammation fiel die Suppression proinflammatorischer Zytokine nach der Restimulation im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Gruppen, wie z. B. Ferdaus et al. (2009), in beiden Zelllinien gering aus. Insbesondere auf mRNA-Ebene zeigte sich für TNF $\alpha$  nur eine geringe Suppression infolge der bakteriellen Vorstimulation und der MALP-2-Restimulation. Diese Beobachtung lässt sich jedoch mit denen von Peck et al. vereinbaren, die nach LPS-Restimulation auf vorhergehende *S. aureus*-Stimulation sogar erhöhte TNF $\alpha$ -Werte feststellten. Eine Mögliche Begründung hierfür ist, dass es im Unterschied zur Stimulation mit reinen Liganden bei Verwendung von Bakterien zu einer verzögerten und verlängerten Aktivierung der Zellen kommt, die auch nach 24 Stunden nicht einhundertprozentig abklingt. Hierdurch sind möglicherweise – anders als bei den mit synthetischen Liganden stimulierten Zellen – 24 h nach Erststimulation auch noch nicht alle Zellen im Stadium der Toleranz. Für die generelle Toleranzinduktion, d. h. verminderte Expression proinflammatorischer Mediatoren, waren nur geringfügige Unterschiede zwischen *S. aureus*- und *S. pneumoniae*-Prestimulation feststellbar. Während anhand der mRNA-Expression von TNF $\alpha$  nur eine geringfügige Suppression des Gens in der toleranten Phase festgestellt werden konnte, zeigten die ELISAs der Zellkulturüberstände 24h nach Restimulation signifikant verminderte TNF $\alpha$ -Konzentrationen, und zwar unabhängig davon, ob die Zellen im Voraus mit *S. aureus* oder *S. pneumoniae* konfrontiert wurden. Zwischen RAW-pIRES/IL-37 und RAW-pIRES/empty konnte weder mittels qPCR noch mittels ELISA ein Unterschied in der TNF $\alpha$ -Expression während der Proinflammation und der Restimulation festgestellt werden, was noch einmal zeigt, dass IL-37B keinen Effekt auf die TNF $\alpha$ -Expression im verwendeten RAW264.7-Zellsystem besitzt.

#### **7.4 Toleranzinduktion in RAW264.7-Zellen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* ermittelt durch RNA-AmpliSeq**

Als Ergebnis der RNA-AmpliSeq-Sequenzierung ergaben sich Daten zu 622 Genen oberhalb der Nachweisgrenze. Zunächst wurde die Gesamtheit der verändert exprimierten Gene (VEGs) nach Stimulation der Zellen betrachtet. Ein VEG wurde als solches definiert, wenn es nach einer beliebigen Stimulation mindestens doppelt bzw. halb so stark exprimiert wird, wie in der nichtstimulierten Kontrolle. Hierbei war zunächst festzustellen, dass RAW-pIRES/IL-37-Zellen durchschnittlich 47 VEGs weniger verzeichnen als RAW-pIRES/empty-Zellen. Bei differenzierter Betrachtung fiel auf, dass diese Unterschiede hauptsächlich herabregulierte Gene betreffen und vom Stimulationszeitpunkt unabhängig sind. Einzig die 24-stündige *S. aureus*-Stimulation zeigt in beiden Zelllinien eine ähnliche Anzahl verändert exprimierter Gene. Diese ist

mit 123 (RAW-pIRES/empty) und 128 (RAW-pIRES/IL-37) VEGs jedoch auch die Probe, die in beiden Zelllinien die wenigsten Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu unstimulierten Zellen verzeichnet. Weiterhin war festzustellen, dass die Anzahl signifikant hochregulierter Gene nach MALP-2-Restimulation in allen Proben kleiner war als nach der zweistündigen Proinflammation mit MALP-2. In der toleranten Phase werden demnach mehr proinflammatorische Gene supprimiert als antiinflammatorische neu induziert. Die Tatsache, dass die *S. aureus*-Stimulation in beiden Zelllinien zu weniger VEGs führte als die *S. pneumoniae*-Stimulation, lässt sich mit den Ergebnissen der Vorversuche vereinbaren, in denen *S. aureus*-Stimulationen jeweils bereits geringere proinflammatorische Fold-Changes für TNF $\alpha$  als *S. pneumoniae*-Stimulationen hervorriefen. Es zeigte sich aber, dass einzelne Gene, die nach *S. aureus*-Stimulationen nicht als VEG detektiert wurden, da sie die FC > 2 - Schwelle nicht erreicht haben, trotzdem ähnliche Tendenzen aufwiesen wie nach *S. pneumoniae*-Stimulationen, aber die Fold-Change-Schwelle nicht erreichten.

Zur Ermittlung einzelner T-Gene mussten zunächst Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt werden. Von entscheidender Bedeutung war hier der Quotient aus dem Fold-Change nach zweistündiger MALP-2-Restimulation und dem Fold-Change nach zweistündiger MALP-2- Proinflammation. Foster et al. beschrieben 2007, wie sich die Genexpression in Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus (BMDMs) während der toleranten Phase nach LPS-Stimulation verändert. Anhand der beobachteten Veränderung in der Expression wurden die Gene in 2 Klassen unterteilt, und zwar in T- (tolerisierbare) und NT- (nicht tolerisierbare) Gene. Die Klasse der T-Gene zeichnet sich durch eine stark unterdrückte Expression während der toleranten Phase aus und beinhaltete in den untersuchten BMDMs IL-6, IL-1 $\beta$ , Mmp13, Hdc, Serpine1, Edn1, Cspg2 und Lipg. NT-Gene wiederum zeigen in dieser Phase eine unveränderte oder verstärkte Expression. Hierzu zählen Cnlp, Lcn2, Fpr1, Saa3, Oasl1, Rantes, Bpil2 und Ptges. In der Studie von Foster et al. von 2007 wurde mit einem Quotienten von 0,33 als Schwellenwert zur Definition von T- und NT-Genen gearbeitet. Da in der Literatur beschriebene T-Gene wie IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  im Rahmen der vorgelegten Arbeit nur Quotienten bis 0,6 das heißt nur schwach tolerant wurden, wurden für die vorgelegte Studie ein Fold-Change-Quotient von 0,5 als oberer Grenzwert festgelegt. Quotienten, die kleiner als 0,5 waren, wurden somit als positiv definiert, und drücken aus, dass diese Gene nach der Restimulation einen im Vergleich zur Proinflammation um die Hälfte verminderten Anstieg der Expression aufwiesen und in der vorliegenden Arbeit als T-Gene identifiziert wurden. Zusätzlich musste das Gen 24h nach der Vorstimulation eine im Vergleich zur Proinflammation rückläufige Expression verzeichnen. Diese Kriterien für T-Gene erfüllten 19 Gene sowohl nach *S. pneumoniae*- als auch nach *S. aureus*-Stimulation. Bakterienspezifisch konnten 4 weitere T-Gene durch die RNA-AmpliSeq ermittelt werden (siehe auch Tab 6.2, Tab 6.3). Bei den ermittelten T-Genen handelt es sich interessanterweise bis auf die Matrix-Metallo-Proteasen um Gene, die in der von Foster et al. publizierten Studie von 2007 nicht beschrieben wurden. Für die beobachteten Unterschiede können mehrere Faktoren verantwortlich sein. Zunächst verwendeten Foster et al. Knochenmarksmakrophagen der Maus, während es sich bei RAW-Zellen um eine Zelllinie aus einem Tumor des murinen Leukämievirus männlicher Mäuse handelt. Weiterhin unterscheidet sich der inflammatorische Stimulus, da in der vorgelegten Arbeit grampositive Bakterien und der TLR-2-Agonist MALP-2 anstelle des TLR-4-

Agonisten LPS aus gramnegativen Bakterien verwendet wurden. Ein dritter wichtiger Punkt, der Unterschiede in der Genexpression begründet, sind die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte nach Pre- und Restimulation. Während Foster et al. die Expression 4h nach Stimulation untersuchten, erwiesen Vorversuche für die Arbeit mit MALP-2 einen Zeitraum von 2h nach Stimulation als optimal für die Analyse. Folglich können anhand der Sequenzierung nur Aussagen zum Zeitpunkt 2h nach (Re-)Stimulation getroffen werden. Mögliche Gene mit abweichenden Expressionskinetiken während Erst- und Zweitstimulation konnten deshalb nicht erfasst werden. Dabei könnten verlängerte Stimulationszeiten für Proinflammation und/oder Restimulation zur Identifikation weiterer durch IL-37 in ihrer Expression modifizierter Gene sowie deren Tolerierbarkeit führen. Auch die ELISA-Methodik könnte auf weitere Proteine angewendet werden, jedoch erscheint dies aufgrund der Menge an zu testenden Faktoren sehr kostspielig. Vielmehr könnte man durch die Erfassung des Sekretoms mittels proteomischer Methoden einen globalen Überblick über die Veränderungen des Zytokinmusters im toleranten Zustand gewinnen. Dieser Ansatz wurde aber aufgrund von Zeitbeschränkungen in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

## **7.5 Veränderungen der Genexpression in RAW264.7-Zellen durch IL-37B bleiben ohne Einfluss auf den generellen toleranten Zustand**

Zur Auffindung von durch IL-37 differenziell regulierten Genen wurden die Reads (RPKMs) der einzelnen Gene zwischen den beiden Zelllinien RAW-pIRES/empty und RAW-pIRES/IL-37 verglichen. Um mögliche späte proinflammatorische Gene zu erfassen, wurde neben der zweistündigen MALP-2-Proinflammation auch der Zustand 24 Stunden nach Kontakt zu *S. aureus* oder *S. pneumoniae* berücksichtigt. Dadurch konnten 5 Gene mit gesteigerter und 20 Gene mit verminderter Expression bei gleichzeitiger IL-37-Expression in RAW-Zellen ermittelt werden (vgl. Ergebnisse Tab 6.4). Einen ähnlichen Versuchsansatz publizierten Nold et al. bereits 2010. In deren Studie wurden mit IL-37 transfizierte sowie Leervektor-transfizierte RAW-Zellen für 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert und anschließend die Konzentration zahlreicher Proteine (zumeist Zytokine) im Zellkulturüberstand mittels Protein-Array gemessen. Die in dieser Arbeit identifizierten Gene unterscheiden sich jedoch gänzlich von den 2010 publizierten Proteinen. Diese Unterschiede könnten einerseits auf die verschiedenen Stimuli (MALP-2/*S. aureus*/*S. pneumoniae* vs. LPS), andererseits auf eine gewisse Diskrepanz zwischen Gen- und Proteinexpression zurückgeführt werden. Letzteres war bereits in den Versuchen zur TNF $\alpha$ -Expression festzustellen, welche ausschließlich im ELISA, nicht aber in der qPCR der RAW-pIRES/IL-37-Zellen signifikant verringert war. Da im Rahmen dieser Arbeit jeweils nur ein Zeitpunkt der Pre- bzw. Restimulation auf transkriptioneller Ebene untersucht wurde, können unterschiedliche Expressionskinetiken zu den im Vergleich zu Nold et al. publizierten Daten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Versuche auf Proteinebene wie ELISAs, welche eine über längere Zeit akkumulierte Menge des Proteins messen, könnten wiederum zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie durch Nold et al. beschrieben wurden, führen. Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch der von Nold et al.

publizierte Einfluss von IL-37 auf die Zytokinexpression in keinem Fall auf RNA-Ebene in der AmpliSeq reproduziert werden.

Mithilfe der durchgeführten AmpliSeq-Sequenzierung ließen sich 2 Möglichkeiten, wie IL-37 auf die Immunsuppression oder die Toleranzinduktion Einfluss nehmen könnte, überprüfen. Einerseits könnte IL-37 für die Suppression oder Aktivierung eines oder mehrerer Gene verantwortlich sein, welches bzw. welche wiederum die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hemmen (indirekter Einfluss) könnten. Andererseits könnte IL-37 die Expression proinflammatorischer Zytokine direkt hemmen. Nold et al. postulierten u.a. einen solchen Effekt durch die direkte Bindung von intrazellulärem IL-37 an SMAD3, wodurch Mäuse vor dem LPS-induzierten Schock geschützt seien (Nold et al. 2010). Ein indirekter Einfluss auf die Toleranzinduktion wäre durch alle in Tab 6.4 identifizierten Gene möglich, da deren Expression und Anwesenheit von IL-37 konstant gesteigert oder vermindert war. Wenn IL-37 einen Einfluss über bestimmte Genexpressionen auf die Toleranzinduktion bzw. die Immunsuppression nimmt, müssen zwischen den beiden Zelllinien RAW-pIRES/IL-37 und RAW-pIRES/empty für bestimmte Gene Unterschiede in der Tolerisierbarkeit festgestellt werden können. Das heißt, es müssen sich Gene finden lassen, die nur bei Anwesenheit von IL-37 - also nur in RAW-pIRES/IL-37-Zellen und nicht in RAW-pIRES/empty Zellen - die Eigenschaften eines T-Gens aufweisen. Lediglich die Gene Il-27 und Clec2d zeigten in der AmpliSeq für die RAW-pIRES/empty-Zellen im Vergleich zu den RAW-pIRES/IL-37-Zellen eine verminderte Tolerisierbarkeit, die dennoch nicht komplett aufgehoben war. Weiterführende Untersuchungen mittels qPCR bestätigten zwar die verringerte Expression in IL-37-positiven Zellen, zeigten allerdings keine Veränderungen in der Tolerisierbarkeit dieser Gene. Folglich kann angenommen werden, dass alle in Tab. 6.2 und 6.3 identifizierten T-Gene unabhängig von der IL-37 Expression in RAW264.7-Zellen tolerisierbar sind. Für Ccl22 konnte diese Annahme mittels qPCR verifiziert werden. Obwohl in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen während der Proinflammation vermehrt Ccl22 exprimiert wurde, wurde das Gen in der toleranten Phase allerdings vermindert exprimiert und seine Tolerisierbarkeit damit nicht von IL-37 beeinflusst. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass IL-37 keinen Einfluss auf die generelle Toleranzinduktion nimmt, sondern als Zytokin mit antiinflammatorischen Wirkungen funktionell anders fungiert. Betrachtet man die Tatsache, dass RAW-Zellen, die kein IL-37 besitzen, trotzdem tolerant werden können (Rajaiah et al. 2013; Ferdaus et al. 2009), erscheint dieses Ergebnis nicht überraschend. Nichtsdestotrotz erschweren kontinuierliche Veränderungen der Expressionslevel verschiedener Gene die Etablierung eines optimalen Untersuchungszeitpunktes.

Trotz des nicht nachweisbaren Effekts von IL-37 auf die Tolerisierbarkeit, taten sich in der AmpliSeq einzelne Gene hervor, die durch besonders starke Toleranzinduktion (Ccl22) bzw. Suppression oder Induktion durch IL-37-Präsenz (Gdf15, Slamf1, Mmp9, Pdcd1) auffielen. Diese Beobachtung konnte für all diese Gene bis auf Pdcd1 durch qPCR bestätigt werden (Ergebnisse, Abb. 6.16 – 6.21). So konnte bestätigt werden, dass die Expression von Gdf15 unter Anwesenheit von IL-37 gesteigert ist. Weiterhin zeigte das Gen Eigenschaften eines NT-Gens mit noch gesteigerter Expression im toleranten Zustand. Über die Bindung von Rezeptoren der TGF- $\beta$  Familie aktiviert GDF15 Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie. Im Zusammenhang mit der von Nold et al. beschriebenen Bindung von IL-37 an SMAD3 könnte GDF15 von den

gefundenen Genen am ehesten einen Einfluss auf IL-37-vermittelte supprimierende Prozesse ausüben. Hierzu passt die bereits 1999 beschriebene Suppression der TNF $\alpha$ -Sekretion von Makrophagen bei GDF15-Anwesenheit, wodurch der ebenfalls geläufige Name MIC1 (Macrophage Inhibitory Cytokine-1) für das Protein entstand (Fairlie et al. 1999). Weiterhin gilt GDF15 als prognostisch ungünstiger Marker für die „All-Cause“-Mortalität im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen (Verhamme et al. 2019). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von GDF15 über TGF- $\beta$  und SMAD1/5-Signalwege bei der NK-Zell-Dysfunktion im Rahmen nosokomialer Infektionen mit *S. aureus* beschrieben (Kleinertz et al. 2019). Die Rolle von GDF15 bei *S. pneumoniae*-Infektionen wurde bislang noch nicht untersucht, jedoch konnte nachgewiesen, dass eine erhöhte Gdf15-Expression entzündliche Lungenerkrankungen fördert (Wu et al. 2018, Verhamme et al. 2017). Ein ähnliches Outcome zeigten IL-37-transgene Mäuse nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* (Schauer et al. 2018). Nach den vorliegenden Erkenntnissen ist hier auch ein Zusammenspiel von Gdf15 und IL-37 bei der Aktivierung der Immunsuppression von Makrophagen denkbar.

Das Gen *Ccl22*, welches in der Sequenzierung durch seine starke Tolerisierbarkeit imponierte, wurde anschließend mittels qPCR genauer untersucht. Hierbei bestätigte es sich einerseits als T-Gen, andererseits zeigte sich nur nach Stimulation mit MALP-2 oder *S. pneumoniae* eine gesteigerte Expression. Nach Stimulation mit *S. aureus* dagegen war weder nach 2, noch nach 24 Stunden eine gesteigerte Aktivität messbar. Nichtsdestotrotz zeigte sich die Tolerisierbarkeit von *Ccl22* sowohl nach Prestimulation mit *S. aureus* als auch mit *S. pneumoniae* in vergleichbarer Ausprägung. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass T-Gene nicht zwangsläufig zuvor aktiviert worden sein müssen, sondern vom Gesamtzustand der Zelle abhängig sind.

*Mmp9* und *Mmp14* zeigten in der Sequenzierung beide eine deutliche Suppression unter Anwesenheit von IL-37. Nold et al. beschrieben eine Suppression von *Mmp13* bereits 2010. Stellvertretend für die Gruppe der Matrix-Metallo-Proteasen wurde *Mmp9* durch Verifikation mittels qPCR in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht, wo sich die deutliche Suppression der Genexpression in den RAW-pIRES/IL-37-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bestätigte. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den beschriebenen Funktionen von IL-37 zum Gewebeschutz vereinbaren, da die MMPs zum Abbau der extrazellulären Matrix dienen und durch den Gewebeumbau die Wundheilung fördern.

Das Gen *Slamf1* zeichnete sich in der Sequenzierung dadurch aus, dass es in den RAW-pIRES/IL-37 nahezu nicht nachweisbar war. In der anschließenden qPCR-Analyse bestätigte sich diese verringerte Genexpression in den IL-37 exprimierenden Zellen. Da Rezeptoren der SLAM-Familie zur Aktivierung weiterer Immunzellen benötigt werden (Meinke et al. 2010), passt auch diese Beobachtung in das antiinflammatorische Profil von IL-37 bei Infektionen.

Insgesamt konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit kein Effekt von IL-37 auf die Toleranzinduktion nachgewiesen werden. Dennoch wurden einige neue Gene identifiziert, die durch IL-37 verstärkt bzw. vermindert exprimiert werden. Diese sind *Gdf15*, *Clec2d*, *Mmp9* und *Slamf1*. Weitere Kandidaten sind Tab. 6.4 zu entnehmen. Die Funktionen der jeweils verändert exprimierten Gene passen dabei gut zu dem bisher beschriebenen antiinflammatorische Wirkspektrum von IL-37, welches im

Mausmodell nach Pneumokokkeninfektion zu fatalen Verläufen mit höherer Bakterienlast, größeren Gewebeschäden und erhöhter Sterblichkeit führte (Schauer et al. 2018).



## 8 SCHLUSSFOLGERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine stabile Expression von IL-37B in RAW264.7-Zellen keine direkte Auswirkung auf die Tolerierbarkeit einzelner Gene hat. Viel mehr zeigte sich diesbezüglich eine Abhängigkeit vom Stimulus der Makrophagen durch *S. pneumoniae* oder *S. aureus*. Die Abhängigkeit vom Stimulus erscheint umso ausgeprägter, wenn man die verschiedenen Ergebnisse anderer Studien zur Toleranzinduktion mit einbezieht (Sato et al. 2002, Deiters et al. 2003, Peck et al. 2014). Neben unterschiedlichen Stimuli führen studienübergreifend allerdings auch unterschiedliche verwendete Zelltypen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Insgesamt lässt die Zusammenschau dieser Ergebnisse den Schluss zu, dass das Phänomen der Toleranz eine sehr heterogene Ausprägung zwischen den verschiedenen Zelltypen in Abhängigkeit von der jeweiligen Stimulation annimmt.

Hinsichtlich der Rolle von IL-37B konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden, dass einzelne Gene in ihrer Expression verstärkt oder gehemmt werden. Insbesondere eine verstärkte Expression von Gdf15 durch IL-37B könnte für den Verlauf von Lungenerkrankungen von Bedeutung sein (Wu et al. 2018, Verhamme et al. 2017, Schauer et al. 2018). Die typische immunsuppressive Wirkung auf proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 konnte jedoch nicht auf RNA-Ebene und nur bedingt für TNF $\alpha$  auf Proteinebene reproduziert werden.

In Zusammenschau der bislang vorliegenden Erkenntnisse zur Rolle von IL-37 bei bakteriellen Infektionen muss die initial postulierte protektive Wirkung überdacht werden. Im Gegensatz zur Konfrontation mit PAMPs wie LPS bedarf es bei Infektionen mit *S. aureus*, *S. pneumoniae* oder anderen Erregern einer adäquaten Immunantwort, um einer Ausbreitung der Erreger entgegenzuwirken. Insgesamt verdichten sich jedoch die Hinweise, dass eine gesteigerte IL-37-Expression hierfür eher von Nachteil für den Organismus ist. Im nächsten Schritt sollten die gefundenen Ergebnisse in einem von Natur aus IL-37-exprimierendem Zellsystem validiert werden, da es sich bei den IL-37 exprimierenden RAW-Zellen um eine entartete Tumorzelllinie handelt, und eine Beeinflussung der globalen Genexpression durch die Transfektion und Klonierung der Zellen hierbei nicht auszuschließen ist.

## 9 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Alberts. 2011. Molekularbiologie der Zelle. 5., vollst. überarb. Aufl.

Ballak DB, van Diepen JA, Moschen AR, Jansen HJ, Hijmans A, Groenhof GJ, Leenders F, Bufler P, Boekschoten MV, Muller M, Kersten S, Li S, Kim S, Eini H, Lewis EC, Joosten LA, Tilg H, Netea MG, Tack CJ, Dinarello CA, Stienstra R. 2014. IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun*, 5:4711.

Ballak DB, van Diepen JA, Moschen AR, Jansen HJ, Hijmans A, Groenhof GJ, Leenders F, Bufler P, Boekschoten MV, Muller M, Kersten S, Li S, Kim S, Eini H, Lewis EC, Joosten LA, Tilg H, Netea MG, Tack CJ, Dinarello CA, Stienstra R. 2015. Corrigendum: IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun*, 6:6039.

Biswas SK, Lopez-Collazo E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*, 30 (10):475-487.

Biswas SK, Mantovani A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 11 (10):889-896.

Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, Oostingh GJ, Pfaller T, Pixner C, Posselt G, Italiani P, Nold MF, Nold-Petry CA, Bufler P, Dinarello CA. 2011. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw*, 22 (3):127-147.

Bufler P, Gamboni-Robertson F, Azam T, Kim SH, Dinarello CA. 2004. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *Biochem J*, 381 (Pt 2):503-510.

Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. 2002. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (21):13723-13728.

Bulau AM, Nold MF, Li S, Nold-Petry CA, Fink M, Mansell A, Schwerd T, Hong J, Rubartelli A, Dinarello CA, Bufler P. 2014. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (7):2650-2655.

Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, Chickering TW, Smutko JS, Zhou H, Leiby KR, Holmgren LM, Gearing DP, Pan Y. 2000. Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics*, 66 (2):213-216.

C. S. Goodyear GJS. 2003. Death by a B-cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B-cell deletion by a staphylococcal toxin.

Cavalli G, Koenders M, Kalabokis V, Kim J, Tan AC, Garlanda C, Mantovani A, Dagna L, Joosten LA, Dinarello CA. 2016. Treating experimental arthritis with the

- innate immune inhibitor interleukin-37 reduces joint and systemic inflammation. *Rheumatology (Oxford)*, 55 (12):2220-2229.
- Chai M, Ji Q, Zhang H, Zhou Y, Yang Q, Zhou Y, Guo G, Liu W, Han W, Yang L, Zhang L, Liang J, Liu Y, Shi D, Zhao Y. 2015. The Protective Effect of Interleukin-37 on Vascular Calcification and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice with Diabetes. *J Interferon Cytokine Res*, 35 (7):530-539.
- Coll-Miro M, Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Torres-Espin A, Bufler P, Dinarello CA, Lopez-Vales R. 2016. Beneficial effects of IL-37 after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (5):1411-1416.
- Das U. 2014. HLA-DR expression, cytokines and bioactive lipids in sepsis. *Arch Med Sci*, 10 (2):325-335.
- Deiters U, Gumenscheimer M, Galanos C, Muhlradt PF. 2003. Toll-like receptor 2- and 6-mediated stimulation by macrophage-activating lipopeptide 2 induces lipopolysaccharide (LPS) cross tolerance in mice, which results in protection from tumor necrosis factor alpha but in only partial protection from lethal LPS doses. *Infect Immun*, 71 (8):4456-4462.
- DeLeo FR, Diep BA, Otto M. 2009. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am*, 23 (1):17-34.
- Dinarello CA, Nold-Petry C, Nold M, Fujita M, Li S, Kim S, Bufler P. 2016. Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37. *Eur J Immunol*, 46 (5):1067-1081.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang HP, Breit SN. 1999. MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 65 (1):2-5.
- Foster SL, Medzhitov R. 2009. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol*, 130 (1):7-15.
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 447 (7147):972-978.
- Fournier B. 2012. The function of TLR2 during staphylococcal diseases. *Front Cell Infect Microbiol*, 2:167.
- Fournier B, Philpott DJ. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev*, 18 (3):521-540.

- Garzoni C, Kelley WL. 2009. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol*, 17 (2):59-65.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327 (5966):656-661.
- Geng YJ, Hansson GK. 1992. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest*, 89 (4):1322-1330.
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. 2015. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*, 28 (3):871-899.
- Goerdts S, Orfanos CE. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 10 (2):137-142.
- Gong J, Wei T, Stark RW, Jamitzky F, Heckl WM, Anders HJ, Lech M, Rossle SC. 2010. Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach. *J Struct Biol*, 169 (3):323-330.
- Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3 (1):23-35.
- Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32 (5):593-604.
- Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. 2000. Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol*, 164 (7):3713-3722.
- Grimsby S, Jaensson H, Dubrovskaya A, Lomnytska M, Hellman U, Souchelnytskyi S. 2004. Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 577 (1-2):93-100.
- Groß. 2013. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 3. Auflage Thieme.
- Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol*, 25 (6):1113-1124.
- Hassan F, Islam S, Tumorkhuu G, Dagvadorj J, Naiki Y, Komatsu T, Koide N, Yoshida T, Yokochi T. 2009. Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M in toll-like receptor (TLR) 7-mediated tolerance in RAW 264.7 macrophage-like cells. *Cell Immunol*, 256 (1-2):99-103.
- Henriques-Normark B, Tuomanen EI. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3 (7).

- Hibbert DB, James AM, Davies CW. 1984. Dictionary of electrochemistry. 2nd Aufl. New York: Wiley.
- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, Beutler B. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, 433 (7025):523-527.
- Hof D. 2004. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage Thieme.
- Huang Z, Zhao GW, Gao CH, Chi XW, Zeng T, Hu YW, Zheng L, Wang Q. 2015. Mannose-capped Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces IL-37 production via upregulating ERK1/2 and p38 in human type II alveolar epithelial cells. *Int J Clin Exp Med*, 8 (5):7279-7287.
- Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrenner P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. 2015. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *mBio*, 6 (1):e02272-02214.
- Ji Q, Zeng Q, Huang Y, Shi Y, Lin Y, Lu Z, Meng K, Wu B, Yu K, Chai M, Liu Y, Zhou Y. 2014. Elevated plasma IL-37, IL-18, and IL-18BP concentrations in patients with acute coronary syndrome. *Mediators Inflamm*, 2014:165742.
- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130 (6):1071-1082.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*, 6 (4):288-301.
- Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. 2009. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, 31 (6):873-884.
- Kato A, Tanaka H, Kawaguchi T, Kanazawa H, Iwasa M, Sakaida I, Moriwaki H, Murawaki Y, Suzuki K, Okita K. 2013. Nutritional management contributes to improvement in minimal hepatic encephalopathy and quality of life in patients with liver cirrhosis: A preliminary, prospective, open-label study. *Hepatol Res*, 43 (5):452-458.
- Kleinertz H, Hepner-Schefczyk M, Ehnert S, Claus M, Halbgebauer R, Boller L, Huber-Lang M, Cinelli P, Kirschning C, Flohe S, Sander A, Waydhas C, Vonderhagen S, Jager M, Dudda M, Watzl C, Flohe SB. 2019. Circulating growth/differentiation factor 15 is associated with human CD56(bright) natural killer cell dysfunction and nosocomial infection in severe systemic inflammation. *EBioMedicine*, 43:380-391.
- Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. 2016. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 99 (Pt B):180-185.
- Königshoff B. 2012. Kurzlehrbuch Biochemie. 3. Auflage Thieme.

- Kreutz M, Ackermann U, Hauschildt S, Krause SW, Riedel D, Bessler W, Andreesen R. 1997. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology*, 92 (3):396-401.
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 3 (1):e1409.
- Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, Capper EA, Tal-Singer R, Wells GI, Doyle ML, Young PR. 2000. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*, 275 (14):10308-10314.
- Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, Rieman DJ, Lehr R, Khandekar S, Kirkpatrick RB, Scott GF, Lee JC, Lynch FJ, Gao W, Gambotto A, Lotze MT. 2002. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine*, 18 (2):61-71.
- Lawrence T, Natoli G. 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*, 11 (11):750-761.
- Li S, Neff CP, Barber K, Hong J, Luo Y, Azam T, Palmer BE, Fujita M, Garlanda C, Mantovani A, Kim S, Dinarello CA. 2015. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (8):2497-2502.
- Longmore. 2010. *Oxford Handbook of Clinical Medicine*. 8. Auflage Oxford University Press.
- Lunding L, Schroder A, Wegmann M. 2015a. Allergic airway inflammation: unravelling the relationship between IL-37, IL-18 $\alpha$  and Tir8/SIGIRR. *Expert Rev Respir Med*, 9 (6):739-750.
- Lunding L, Webering S, Vock C, Schroder A, Raedler D, Schaub B, Fehrenbach H, Wegmann M. 2015b. IL-37 requires IL-18 $\alpha$  and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy*, 70 (4):366-373.
- Mackaness GB. 1964. THE IMMUNOLOGICAL BASIS OF ACQUIRED CELLULAR RESISTANCE. *J Exp Med*, 120:105-120.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25 (12):677-686.
- Martinez FO, Gordon S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6:13.

- McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, McManus M, Grenz A, Collins CB, Nold MF, Nold-Petry C, Bufler P, Dinarello CA, Rivera-Nieves J. 2011. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (40):16711-16716.
- Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. 2000. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol*, 164 (11):5564-5574.
- Meinke. 2010. Regulation of human lymphocytes by SLAM-related receptors.
- Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Ronnlund D, Blom H, Widengren J, Normark S, Henriques-Normark B. 2012. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J Biol Chem*, 287 (14):11018-11029.
- Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Biennu J, Lepape A. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett*, 95 (2):193-198.
- Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, Renga G, Casagrande A, Iannitti RG, Puccetti M, Garlanda C, Kim S, Li S, van de Veerdonk FL, Dinarello CA, Romani L. 2014. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *PLoS Pathog*, 10 (11):e1004462.
- Mosser DM, Handman E. 1992. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol*, 52 (4):369-376.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8 (12):958-969.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol*, 160 (11):5347-5354.
- Musher. 2009. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7. Auflage.
- Nilsen NJ, Deininger S, Nonstad U, Skjeldal F, Husebye H, Rodionov D, von Aulock S, Hartung T, Lien E, Bakke O, Espevik T. 2008. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol*, 84 (1):280-291.
- Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, Lotz-Havla AS, Gersting SW, Cho SX, Lao JC, Ellisdon AM, Rotter B, Azam T, Mangan NE, Rossello FJ, Whisstock JC, Bufler P, Garlanda C, Mantovani A, Dinarello CA, Nold MF. 2015. IL-37 requires the receptors IL-18R $\alpha$  and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its

- multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol*, 16 (4):354-365.
- Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. 2010. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*, 11 (11):1014-1022.
- Oehler JR, Herberman RB, Campbell DA, Jr., Djeu JY. 1977. Inhibition of rat mixed lymphocyte cultures by suppressor macrophages. *Cell Immunol*, 29 (2):238-250.
- Olivier AC, Lemaire S, Van Bambeke F, Tulkens PM, Oldfield E. 2009. Role of rsbU and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J Infect Dis*, 200 (9):1367-1370.
- Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. 2015. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect*, 21 (4):313-322.
- Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala'Aldeen DA, Tuomanen EI. 2009. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest*, 119 (6):1638-1646.
- Otto M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*.
- Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, Yansura D, Lewis L, Eigenbrot C, Henzel WJ, Vandlen R. 2001. IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine*, 13 (1):1-7.
- Peck OM, Fan H, Tempel GE, Teti G, Halushka PV, Cook JA. 2004a. *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharide induce homologous tolerance but heterologous priming: role of interferon-gamma. *Shock*, 21 (3):254-260.
- Peck OM, Williams DL, Breuel KF, Kalbfleisch JH, Fan H, Tempel GE, Teti G, Cook JA. 2004b. Differential regulation of cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-induced tolerance and priming. *Cytokine*, 26 (5):202-208.
- Pezzuto. 2006. *Taschenatlas der Immunologie*. 2. Auflage Thieme.
- Pugin J. 1994. Bacteremia, sepsis and shock. *Intensive Care Med*, 20 (2):92-93.
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1994. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1 (6):509-516.
- Rahmatullah M, Ferdousi D, Mollik AH, Jahan R, Chowdhury MH, Haque WM. 2009. A survey of medicinal plants used by Kavirajes of Chalna area, Khulna district, Bangladesh. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 7 (2):91-97.



- Rajaiah R, Perkins DJ, Polumuri SK, Zhao A, Keegan AD, Vogel SN. 2013. Dissociation of endotoxin tolerance and differentiation of alternatively activated macrophages. *J Immunol*, 190 (9):4763-4772.
- Rigby KM, DeLeo FR. 2012. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol*, 34 (2):237-259.
- Sagy M, Al-Qaqa Y, Kim P. 2013. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 43 (10):260-263.
- Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. 2012. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 (10):1609-1616.
- Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. 2002. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int Immunol*, 14 (7):783-791.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. 2000. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol*, 165 (12):7096-7101.
- Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zahringer U, Gobel UB, Weber JR, Schumann RR. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem*, 278 (18):15587-15594.
- Shankar-Hari M, Ambler M, Mahalingasivam V, Jones A, Rowan K, Rubenfeld GD. 2016. Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: a systematic review of epidemiologic studies. *Crit Care*, 20:101.
- Sharaf N, Nicklin MJ, di Giovine FS. 2014. Long-range DNA interactions at the IL-1/IL-36/IL-37 gene cluster (2q13) are induced by activation of monocytes. *Cytokine*, 68 (1):16-22.
- Sharma S, Kulk N, Nold MF, Graf R, Kim SH, Reinhardt D, Dinarello CA, Bufler P. 2008. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol*, 180 (8):5477-5482.
- Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. 2000. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem*, 275 (2):1169-1175.
- Smithrithee R, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Ushio H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. 2015. Human beta-defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 77 (1):46-53.

- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, 176 (1):287-292.
- Steinman RM, Idoyaga J. 2010. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*, 234 (1):5-17.
- Suerbaum. 2016. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8. Auflage Springer.
- Takahashi H, Sakai R, Hattori Y, Ohshima R, Kuwabara H, Hagihara M, Enaka M, Nozawa A, Tomita N, Ishigatsubo Y, Fujisawa S. 2013. Successful disease control with L-asparaginase monotherapy for aggressive natural killer cell leukemia with severe hepatic failure. *Leuk Lymphoma*, 54 (3):662-664.
- Teng X, Hu Z, Wei X, Wang Z, Guan T, Liu N, Liu X, Ye N, Deng G, Luo C, Huang N, Sun C, Xu M, Zhou X, Deng H, Edwards CK, 3rd, Chen X, Wang X, Cui K, Wei Y, Li J. 2014. IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production. *J Immunol*, 192 (4):1815-1823.
- Tong HH, Blue LE, James MA, DeMaria TF. 2000. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun*, 68 (2):921-924.
- Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. 2014. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun*, 5:5340.
- Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 67 (9):4720-4724.
- van der Poll T, Opal SM. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374 (9700):1543-1556.
- Verhamme FM, Seys LJM, De Smet EG, Provoost S, Janssens W, Elewaut D, Joos GF, Brusselle GG, Bracke KR. 2017. Elevated GDF-15 contributes to pulmonary inflammation upon cigarette smoke exposure. *Mucosal Immunol*, 10 (6):1400-1411.
- Verhamme FM, Freeman CM, Brusselle GG, Bracke KR, Curtis JL. 2019. GDF-15 in Pulmonary and Critical Care Medicine. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 60 (6):621-628.
- Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said-Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR. 2005. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol*, 175 (6):3907-3919.

- Wardenburg JB, Patel R.J., Schneewind O. 2007. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia.:1040-1044.
- Werth BJ, Jain R, Hahn A, Cummings L, Weaver T, Waalkes A, Sengupta D, Salipante SJ, Rakita RM, Butler-Wu SM. 2018. Emergence of dalbavancin non-susceptible, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) after treatment of MRSA central line-associated bloodstream infection with a dalbavancin- and vancomycin-containing regimen. *Clin Microbiol Infect*, 24 (4):429 e421-429 e425.
- Wu Q, Jiang D, Schaefer NR, Harmacek L, O'Connor BP, Eling TE, Eickelberg O, Chu HW. 2018. Overproduction of growth differentiation factor 15 promotes human rhinovirus infection and virus-induced inflammation in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 314 (3):L514-l527.
- Xu D, Wang A, Jiang F, Hu J, Zhang X. 2015. Effects of interleukin-37 on cardiac function after myocardial infarction in mice. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (5):5247-5251.
- Ye L, Jiang B, Deng J, Du J, Xiong W, Guan Y, Wen Z, Huang K, Huang Z. 2015. IL-37 Alleviates Rheumatoid Arthritis by Suppressing IL-17 and IL-17-Triggering Cytokine Production and Limiting Th17 Cell Proliferation. *J Immunol*, 194 (11):5110-5119.
- Ye L, Ji L, Wen Z, Zhou Y, Hu D, Li Y, Yu T, Chen B, Zhang J, Ding L, Du J, Huang Z. 2014. IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *J Transl Med*, 12:69.
- Zeng M, Dang W, Chen B, Qing Y, Xie W, Zhao M, Zhou J. 2016. IL-37 inhibits the production of pro-inflammatory cytokines in MSU crystal-induced inflammatory response. *Clin Rheumatol*, 35 (9):2251-2258.
- Zeng Q, Song R, Fullerton DA, Ao L, Zhai Y, Li S, Ballak DB, Cleveland JC, Jr., Reece TB, McKinsey TA, Xu D, Dinarello CA, Meng X. 2017. Interleukin-37 suppresses the osteogenic responses of human aortic valve interstitial cells in vitro and alleviates valve lesions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 (7):1631-1636.
- Zhao PW, Jiang WG, Wang L, Jiang ZY, Shan YX, Jiang YF. 2014. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF-alpha, IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 9 (5):e95346.

## 10 ANHANG

### 10.1 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1:</b> Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>6</b>
<b>Tabelle 3.2:</b> Effekte von rekombinantem IL-37 in Wildtyp-Mäusen.....	<b>15</b>
<b>Tabelle 5.1:</b> Laborgeräte, deren Bezeichnung und Herstellung.....	<b>19</b>
<b>Tabelle 5.2:</b> Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.....	<b>20</b>
<b>Tabelle 5.3:</b> Genutzte Kits und deren Hersteller.....	<b>21</b>
<b>Tabelle 5.4:</b> Verwendete Software und Online-Datenbanken.....	<b>22</b>
<b>Tabelle 5.5:</b> Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.....	<b>22</b>
<b>Tabelle 5.6:</b> Verwendete Antikörper und deren Hersteller.....	<b>24</b>
<b>Tabelle 5.7:</b> Verwendete Medien für die Zellkultur.....	<b>25</b>
<b>Tabelle 5.8:</b> Zusammensetzung des Master-Mix für den Restriktionsendonuklease-Verdau	<b>27</b>
<b>Tabelle 5.9:</b> Stimulanzen zur Induktion von Proinflammation oder Toleranz.....	<b>28</b>
<b>Tabelle 5.10:</b> Reagenzien für die cDNA-Synthese.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 5.11:</b> Programm für die cDNA-Synthese im Thermocycler.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 5.12:</b> Reagenzien für die sq-PCR.....	<b>32</b>
<b>Tabelle 5.13:</b> Programm für die sq-PCR.....	<b>32</b>
<b>Tabelle 5.14:</b> Reagenzien für die Gelelektrophorese.....	<b>33</b>
<b>Tabelle 5.15:</b> Reagenzien für die qPCR.....	<b>34</b>
<b>Tabelle 5.16:</b> Programm der qPCR.....	<b>34</b>
<b>Tabelle 5.17:</b> Mausprimer für sqPCR und qPCR.....	<b>35</b>
<b>Tabelle 5.18:</b> Reagenzien für die RNA-AmpliSeq.....	<b>37</b>
<b>Tabelle 5.19:</b> Thermocyclerbedingungen für die RNA-AmpliSeq.....	<b>38</b>
<b>Tabelle 5.20:</b> Zusammensetzung Lyse-Puffer.....	<b>39</b>
<b>Tabelle 6.1:</b> VEGs aller Proben im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle.....	<b>57</b>
<b>Tabelle 6.2:</b> RPKM und FC der T-Gene nach <i>S. pneumoniae</i> -Stimulation.....	<b>58</b>
<b>Tabelle 6.3:</b> RPKM und FC der T-Gene nach <i>S. aureus</i> -Stimulation.....	<b>60</b>
<b>Tabelle 6.4:</b> RPKM-Werte und FC der NT-Gene nach <i>S. pneumoniae</i> -Stimulation.....	<b>63</b>
<b>Tabelle 6.5:</b> RPKM-Werte und FC der NT-Gene nach <i>S. aureus</i> -Stimulation.....	<b>64</b>
<b>Tabelle 6.6:</b> Liste von Genen, die nach RNA-AmpliSeq abweichende Expression in RAW-pIRES/IL37-Zellen im Vergleich zu RAW-pIRES/empty-Zellen zeigten.....	<b>66</b>

## 10.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 3.1</b> Vergleich von naiven mit toleranten Makrophagen bezüglich der Expression von T- und NT-Genen nach LPS-Stimulation.....	<b>13</b>
<b>Abb. 3.2:</b> Systemische Immunreaktion des Körpers bei Sepsis.....	<b>14</b>
<b>Abb. 5.1:</b> Restriction Map und Multiple Cloning Site (MCS) des Vektor pIRES2-EGFP.....	<b>26</b>
<b>Abb. 5.2:</b> Stimulationsschema für Experimente der Toleranzinduktion mittels qPCR.....	<b>29</b>
<b>Abb. 5.3:</b> Stimulationsschema für Experimente der Toleranzinduktion mittels ELISA.....	<b>30</b>
<b>Abb. 5.4:</b> Aufbau der Blotkammer für den Western Blot.....	<b>40</b>
<b>Abb. 6.1:</b> Kontrolle der Plasmidpräparationen mittels Restriktionsendonuklease-Verdau.....	<b>44</b>
<b>Abb. 6.2:</b> Nachweis der IL-37B-Expression mittel RT-PCR.....	<b>45</b>
<b>Abb. 6.3:</b> Nachweis der IL-37B-Proteinexpression im Western Blot.....	<b>46</b>
<b>Abb. 6.4:</b> Expressionskinetiken von TNF $\alpha$ - und IL-37B-mRNAs in RAW-pIRES/IL-37-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml MALP-2.....	<b>47</b>
<b>Abb. 6.5:</b> mRNA-Expression von IL-18R $\alpha$ , SIGIRR und TLR-2 analysiert durch RT-PCR in transfizierten RAW-pIRES/empty- und RAW-pIRES/IL-37-Zellen mit und ohne TLR2-Stimulation durch MALP-2.....	<b>47</b>
<b>Abb. 6.6:</b> Expressionskinetiken von TNF $\alpha$ - und IL-37B-mRNAs in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37-Zellen (grau) nach Stimulation mit lebenden <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. aureus</i> .....	<b>48</b>
<b>Abb. 6.7:</b> TNF $\alpha$ -mRNA-Expression in RAW-pIRES/empty nach <i>S.aureus</i> -Stimulation bei steigender MOI.....	<b>49</b>
<b>Abb. 6.8:</b> TNF $\alpha$ - und IL-37-mRNA-Expression in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37-Zellen (grau) in proinflammatorischer und toleranter Phase unter Prestimulation mit bekapselten und kapsellosen <i>S. pneumoniae</i> und Restimulation mit MALP-2.....	<b>51</b>
<b>Abb. 6.9:</b> Zytotoxizitätsanalyse nach bakterieller Stimulation mit Antibiotika-Zugabe von RAW-pIRES/empty-Zellen (A, C) bzw. RAW-pIRES/IL-37-Zellen (B, D) durch LDH ELISA.....	<b>52</b>
<b>Abb. 6.10:</b> Nachweis der TNF $\alpha$ -Sekretion während der proinflammatorischen Phase und nach Restimulation im toleranten Zustand durch ELISA.....	<b>54</b>
<b>Abb. 6.11:</b> Nachweis der TNF $\alpha$ -mRNA Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR... <b>55</b>	
<b>Abb. 6.12:</b> RPKM-Werte der 22 T-Gene nach <i>S. pneumoniae</i> -Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation.....	<b>60</b>
<b>Abb. 6.13:</b> RPKM-Werte der 22 T-Gen-Kandidaten nach <i>S. aureus</i> -Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation.....	<b>62</b>
<b>Abb. 6.14:</b> RPKM-Werte der NT-Gene nach <i>S. pneumoniae</i> -Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation.....	<b>64</b>
<b>Abb. 6.15:</b> RPKM-Werte der NT-Gene nach <i>S. aureus</i> -Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulation.....	<b>65</b>

- Abb. 6.16:** Nachweis der Ccl22-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37- (grau) Zellen durch qPCR.....**68**
- Abb. 6.17** Nachweis der Mmp9-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37- (grau) Zellen durch qPCR.....**69**
- Abb. 6.18:** Nachweis der Slamf1-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach *S. pneumoniae*- und *S. aureus*-Stimulation in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR.....**69**
- Abb. 6.19:** Nachweis der Gdf15- und Clec2d-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase nach bakterieller Stimulation in RAW-pIRES/empty- (weiß) und RAW-pIRES/IL-37-Zellen (grau) durch qPCR.....**71**
- Abb. 6.20** Nachweis der IL-27-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR...**72**
- Abb. 6.21:** Nachweis der Pdcd1-mRNA-Expression in der proinflammatorischen und der toleranten Phase in RAW-pIRES/empty (weiß) und RAW-pIRES/IL-37 (grau) durch qPCR...**73**

### **10.3 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen Personen bedanken, die mir im Verlauf der Promotion zur Seite standen.

Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Hortense Slevogt, Leiterin der Arbeitsgruppe Host Septomics, welche mir die Arbeit in diesem interessanten Forschungsfeld ermöglichte. Bei regelmäßigen Treffen führte sie meine Arbeit mit fachlichen und kritischen Anregungen in die richtige Richtung. Weiterhin möchte ich mich für die Bereitstellung aller finanziellen Mittel sowie für das uneingeschränkte Vertrauen bei der Nutzung der Labors bedanken.

Ebenfalls ein besonderer Dank geht an Dr. Mario Müller, der mir während der gesamten Zeit als Betreuer zur Seite stand. Durch seine kompetente, geduldige aber vor allem stets freundliche Art fiel mir das Erlernen der molekularbiologischen Methoden sehr leicht. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme und ließ mir viel Freiraum für eigene Ideen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima und die kollegialen Absprachen bei der Nutzung der Laborgeräte bedanken. Hervorheben möchte ich Dr. Tilman Klassert, der mich bei der Durchführung der RNA-AmpliSeq unterstützte, und Dr. Magdalena Stock, die mir mit der bioinformatischen Auswertung der Sequenzierungsdaten assistierte.

Auch für das Promotionsstipendium vom Center for Sepsis Control and Care, wodurch ich mich vollumfänglich der Laborarbeit widmen konnte, möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bedanken.

Abschließend bedanke ich mich herzlichst bei meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit sowohl finanziell als auch mit motivierenden Worten unterstützt hat.

## 10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Hortense Slevogt (Betreuung des Projekts), Dr. Mario Müller (Betreuung des Projekts, Korrekturlesen des Manuskripts), Dr. Tilman E. Klassert (Hilfestellung bei der Sequenzierung), Dr. Magdalena Stock (bioinformatische Auswertung),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift des Verfassers