

---

**miRNAs und bioreaktive Substanzen  
mit Einfluss auf *Legionella pneumophila*  
verursachte Infektionen**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

**Stephan Ringshandl**

Aus Regensburg

Marburg, 2022

Die vorliegende Dissertation wurde von Mai 2015 bis August 2022 am LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie in Marburg unter Leitung von Frau Prof. Dr. Anke Becker angefertigt. Die praktischen Arbeiten erfolgten vom Mai 2015 bis August 2020.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg  
(Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am \_\_\_\_\_

Erstgutachterin: Prof. Dr. Anke Becker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernd Schmeck

Tag der Disputation: \_\_\_\_\_

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>Summary</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>12</b> |
| 1.1 Makrophagen als elementarer Bestandteil des Immunsystems.....             | 12        |
| 1.1.1 Durch Hämatopoese generierte Zellen des Immunsystems.....               | 12        |
| 1.1.2 Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.....                   | 13        |
| 1.1.3 Funktionen von Makrophagen im Immunsystem .....                         | 15        |
| 1.1.4 Die Polarisation von Makrophagen .....                                  | 17        |
| 1.2 <i>Legionella pneumophila</i> als Krankheitserreger .....                 | 17        |
| 1.2.1 Die Gattung <i>Legionella</i> .....                                     | 17        |
| 1.2.2 Entdeckung als Krankheitserreger .....                                  | 18        |
| 1.2.3 <i>Legionella pneumophila</i> .....                                     | 18        |
| 1.2.4 Der intrazelluläre Lebenszyklus von <i>Legionella pneumophila</i> ..... | 20        |
| 1.2.5 Erkennung von <i>Legionella pneumophila</i> durch Makrophagen.....      | 22        |
| 1.3 microRNAs .....   | 23        |
| 1.3.1 Entdeckung und Einordnung von microRNAs .....                           | 23        |
| 1.3.2 Transkription und Prozessierung von miRNAs .....                        | 26        |
| 1.3.3 Auswirkungen von miRNAs auf adressierte mRNAs .....                     | 29        |
| 1.3.4 miRNA-Nomenklatur .....   | 29        |
| 1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit .....   | 30        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....  | <b>31</b> |
| 2.1 Material .....  | 31        |
| 2.1.1 Chemikalien und Stimulanzen .....                                       | 31        |
| 2.1.2 Puffer und Medien .....   | 36        |
| 2.1.3 Primer.....   | 38        |
| 2.1.4 Antikörper.....   | 39        |
| 2.1.5 Kits.....   | 40        |
| 2.1.6 Zelllinie und Bakterienstämme .....                                     | 40        |
| 2.1.7 Weitere Materialien .....   | 41        |
| 2.1.8 Geräte.....   | 43        |
| 2.1.9 Software .....  | 45        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2      | Methoden .....   | 46        |
| 2.2.1    | Kultivierung von THP-1 Zellen .....  | 46        |
| 2.2.2    | Transfektion von THP-1 Zellen mit miRNAs .....   | 47        |
| 2.2.3    | Anzucht von <i>Legionella pneumophila</i> Kulturen.....  | 47        |
| 2.2.4    | Stimulation von THP-1 Zellen.....  | 48        |
| 2.2.5    | Infektion von THP-1 Zellen mit <i>Legionella pneumophila</i> .....   | 48        |
| 2.2.6    | Fixierung und Färbung von THP-1 Zellen .....   | 48        |
| 2.2.7    | CFU-Assay.....   | 49        |
| 2.2.8    | Bakterielle Wachstumskurven .....  | 49        |
| 2.2.9    | Messen der Zellvitalität mittels Laktatdehydrogenase Assay.....  | 50        |
| 2.2.10   | Messen der Zellvitalität mittels MTT Assay .....   | 50        |
| 2.2.11   | RNA Isolierung.....  | 51        |
| 2.2.12   | Reverse Transkription und quantitative PCR (qPCR) .....  | 51        |
| 2.2.13   | Proteinisolierung.....   | 55        |
| 2.2.14   | Bestimmung einer Proteinkonzentration mittels BCA-Methode.....   | 55        |
| 2.2.15   | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....  | 55        |
| 2.2.16   | Western Blot .....   | 56        |
| 2.2.17   | Durchflusszytometrie infizierter THP-1 Zellen.....   | 56        |
| 2.2.18   | Markierungsfreie Massenspektrometrie .....   | 56        |
| 2.2.19   | Messung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität .....  | 57        |
| 2.2.20   | Automatisierte Prozesse am Tecan Freedom EVO.....  | 58        |
| 2.2.21   | Automatisierte Mikroskopie am Nikon Eclipse Ti2 Mikroskop .....  | 62        |
| 2.2.22   | Automatisierte Bildauswertung .....  | 63        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>64</b> |
| 3.1      | Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Identifizierung von <i>Legionella pneumophila</i> -Infektion beeinflussenden miRNAs und bioreaktiven Substanzen..... | 64        |
| 3.1.1    | Konzeptioneller Aufbau und durch Automatisierung bedingte Modifikationen.....  | 64        |
| 3.1.2    | Durchführung des ersten Teils des Screenings .....   | 68        |
| 3.1.3    | Identifizierung von positionsabhängigen Effekten bei Messungen.....  | 72        |
| 3.1.4    | Validierung der Ergebnisse anhand der miRNAs-101,106a und 107.....   | 75        |
| 3.1.5    | Durch Randeffekte und Validierung bedingter Fokuswechsel .....   | 80        |
| 3.2      | Funktionelle Analyse der miRNAs-101, 106a und 107 im Bezug auf die <i>Legionella pneumophila</i> -Replikation.....   | 81        |
| 3.2.1    | Identifizierung regulierter Ziele mittels qRT-PCR und Western Blots .....  | 82        |
| 3.2.2    | Identifizierung regulierter Ziele mittels Massenspektrometrie.....   | 86        |
| 3.2.3    | Zusammenfassung des miRNA-101, 106 und 107 Projekts .....  | 102       |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.3      | Identifikation von Inhibitoren mit Einfluss auf die intrazelluläre <i>Legionella pneumophila</i> -Replikation..... | 103        |
| 3.3.1    | Aufbau eines Substanz-Screenings .....   | 103        |
| 3.3.2    | Durchführung und Datengenerierung .....  | 108        |
| 3.3.3    | Validierung und Untersuchung signifikanter Inhibitoren .....   | 111        |
| 3.3.4    | Nachtestung von Benzotropin und Perhexilin .....   | 114        |
| 3.3.5    | Einfluss von ASMase auf die Infektion .....  | 116        |
| 3.3.6    | Zusammenfassung des Substanz-Screening Projekts .....  | 118        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>119</b> |
| 4.1      | Etablierung eines miRNA-Screening Verfahrens .....   | 119        |
| 4.2      | Einfluss der miRNAs-101, 106a und 107 auf die Legionellen-Replikation .....  | 122        |
| 4.2.1    | Detektion der validierten miRNAs .....   | 122        |
| 4.2.2    | Diskussion der Massenspektrometrie-Daten .....   | 125        |
| 4.3      | Einfluss von Inhibitoren auf die Infektion durch Legionellen .....   | 129        |
| 4.4      | Ausblick .....   | 133        |
|          | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>135</b> |
|          | <b>Anhang.....</b>   | <b>149</b> |
|          | <b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>   | <b>151</b> |
|          | <b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>  | <b>152</b> |
|          | <b>Danksagung.....</b>   | <b>153</b> |

### Zusammenfassung

*Legionella pneumophila* ist ein gramnegatives Bakterium, das sich als intrazelluläres Pathogen, neben Amöben als natürlichen Wirt, auch in alveolaren Makrophagen vermehren kann. Dort löst es das Pontiac-Fieber, oder in schwerwiegenderen Fällen die Legionärskrankheit aus, welche durch eine schwere Pneumonie charakterisiert ist.

Das Ziel dieser Arbeit war es ein Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln. Durch dieses sollte es ermöglicht werden, eine große Anzahl an Substanzen zu untersuchen und so eine erweiterte Einsicht in die Interaktion zwischen Legionellen und Makrophagen zu gewinnen. Mit dieser Methode wurden Proben einer miRNA-Library und Proben einer selbst zusammengestellten Sammlung aus bioreaktiven Substanzen untersucht. Dabei wurde das Verhältnis zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen sowie die Infektionsstärke abhängig von der Behandlung bestimmt. Als Versuchsmodell dienten differenzierte THP-1 Zellen um Makrophagen zu imitieren, die in Folge mit *Legionella pneumophila* des Stammes Corby infiziert wurden.

Obwohl die Analyse der miRNA-Library technische Schwierigkeiten offenbarte, konnten mit miRNA-101-3p, miRNA-106a-5p und miRNA-107, drei miRNAs identifiziert und validiert werden, die die Infektion der Makrophagen steigerten. Über Massenspektrometrie wurden, durch die miRNAs regulierte Proteine detektiert, um Aufschluss darüber zu geben, wodurch die Steigerung der Infektion bedingt ist. In Folge zeigten sich mehrere Proteinklassen sowie Signalwege, die durch die Transfektion der miRNAs, eine veränderte Proteinkonzentration aufwiesen und eine potentielle Beteiligung in dieser Infektion haben.

Durch die Analyse der bioreaktiven Substanzen wurden mit 25-hydroxy Cholesterol, H-89, Fluoxetin, Forskolin und W-7, fünf Substanzen gefunden, die in diesem Infektionskontext unbekannt waren. Da die Kontrolle Amitriptylin und Fluoxetin als Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase agieren, wurden mit Benzotropin und Perhexilin zwei weitere Substanzen getestet, die dieses Protein inhibieren. Erneut zeigte sich eine starke Reduktion der Infektionsrate, was auf die Relevanz dieses Protein während des Infektionsgeschehens hindeutet. Dies wird auch dadurch bestärkt, dass sowohl Makrophagen als auch Legionellen die Aktivität der sauren Sphingomyelinase zu regulieren scheinen.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit eine Screening-Methode etabliert die es, trotz Limitationen, erlaubt eine erhöhte Anzahl an Proben auf deren Einfluss auf die Legionellen-Makrophagen Interaktion zu testen. Die von den drei miRNAs sowie fünf Substanzen regulierten Proteinklassen und Signalwege geben Anhaltspunkte für die weitere Forschung.

### Summary

*Legionella pneumophila* is a gram-negative bacterium which acts as an intracellular pathogen. Its natural host are amoeba but it can also replicate in human alveolar macrophages. It causes the so called pontiac fever, or in severe cases the so called Legionnaires' disease. This disease is a form atypical pneumonia.

The aim of this work was to develop and establish a high-throughput method to facilitate the testing of a large number of biological and chemical samples within the scope of *Legionella* infection. With the analysis of these samples, it was the goal to increase the knowledge about the interaction between the *Legionella* bacteria and macrophages. Samples originated from a miRNA library as well as a self-created set of bioreactive substances. Dependent on the treatment the output of the high-throughput method was the ratio between infected and non-infected cells as well as the intensity of infection. As an experimental model, differentiated THP-1 cells were used to mimic alveolar macrophages that were subsequently infected with the *Legionella pneumophila* strain Corby.

Even though the analysis of the miRNA library displayed technical difficulties, miRNA-101-3p, miRNA-106a-5p and miRNA-107 could be identified and validated to have a stimulating effect on legionella infection. Mass spectrometry was performed to shed light on which proteins are regulated by these miRNAs and how this results in the increase of infection. Several classes of proteins and pathways could be identified to be regulated upon miRNA transfection and could be involved in the observed stimulating effect on infection.

The analysis of bioreactive substances revealed five novel substances that were previously not known in this infection context. These were 25-hydroxy cholesterol, H-89, fluoxetine, forskoline and W-7. As amitriptylin and fluoxetin act as inhibitors of acid sphingomyelinase two other inhibitors of this protein were subsequently tested. Benztropine as well as perhexiline showed a similar strong downregulation of infection, which highlights the potential relevance of this protein during infection. This is further reinforced as macrophages as well as bacteria seem to regulate the acid sphingomyelinase.

In summary, a high-throughput method was established that, with some limitations, facilitates testing of an increased number of samples on their effect on the *Legionella pneumophila* – macrophage interaction. Three miRNAs and five bioreactive substances were found to have an effect in this setting and regulated protein classes and pathways will be a substantial basis for further scientific work.

## Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| ADAR           | engl.: <i>adenosine deaminase acting on RNA</i>  |
| AFP            | Alpha-1-Fetoprotein  |
| AG             | Arbeitsgruppe  |
| Ago2           | Argonautenprotein 2  |
| AKT1           | engl.: <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>                                      |
| AKT2           | engl.: <i>RAC-beta serine/threonine-protein kinase</i>                                       |
| ALB            | Albumin  |
| ANOVA          | Varianzanalyse (engl.: <i>analysis of variance</i> )   |
| APOB           | Apolipoprotein B   |
| APP            | Amyloid-Precursor-Protein  |
| ARNT           | engl.: <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>                                 |
| ASC            | engl.: <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>                      |
| ASMase         | saure Sphingomyelinase (engl.: <i>acidic sphingomyelinase</i> )                              |
| ATCC           | engl.: <i>american type culture collection</i>   |
| ATM            | engl.: <i>ataxia telangiectasia mutated</i>  |
| ATOX1          | engl.: <i>antioxidant 1 copper chaperone</i>   |
| ATP            | Adenosin Tri-Phosphat  |
| C/EBP $\alpha$ | engl.: <i>CCAAT/Enhancer-Binding-Protein alpha</i>   |
| C3             | Komplementkomponente C3  |
| cAMP           | cyclisches Adenosinmonophosphat  |
| CD             | engl.: <i>cluster of differentiation</i>   |
| CDK6           | engl.: <i>cyclin-dependent kinase 6</i>  |
| CFU            | koloniebildende Einheit (engl.: <i>colony forming unit</i> )                                 |
| cGAMP          | engl.: <i>cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate</i>                         |
| cGAS           | engl.: <i>cyclic GMP-AMP synthase</i>  |
| CLR            | Typ-C Lektin Rezeptor (engl.: <i>C-type lectin receptor</i> )                                |
| CRISPR         | engl.: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>                      |
| DAMP           | Schadens-assoziierte molekulare Muster (engl.: <i>damage-associated molecular patterns</i> ) |
| DGCR8          | engl.: <i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>  |
| DIC            | Differentialinterferenzkontrast  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )                                |
| dot            | engl.: <i>defect in organelle trafficking</i>  |



## Abkürzungsverzeichnis

---

|             |  |
|-------------|--|
| dsRNA       | Doppelsträngige RNA  |
| dsRNA       | Doppelsträngige Ribonukleinsäure   |
| E2F1        | E2F Transkriptionsfaktor 1   |
| ER          | endoplasmatisches Retikulum  |
| et al.      | lat.: <i>et alia</i>   |
| EZH2        | engl.: <i>enhancer of zeste homolog 2</i>  |
| F2/F5       | Koagulationsfaktor 2/5   |
| FIASMA      | Inhibitor der sauren Sphingomyelinase (engl.: <i>functional inhibitor of acid sphingomyelinase</i> ) |
| GATA1       | engl.: <i>GATA-binding factor 1</i>  |
| GM-CSF      | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor  |
| GO          | engl.: <i>gene ontology</i>  |
| GOLGA1      | engl.: <i>golgin subfamily A member 1</i>  |
| GTP         | Guanosintriphosphat  |
| HBA1        | engl.: <i>hemoglobin subunit alpha 1</i>   |
| HIF1A       | engl.: <i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>   |
| HMGB1       | engl.: <i>high-mobility-group-protein B1</i>   |
| HRP         | Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horse raddish peroxidase</i> )                                      |
| hsa         | Mensch (lat.: <i>homo sapiens</i> )  |
| icm         | engl.: <i>intracellular multiplication</i>   |
| IFN         | Interferon   |
| IL          | Interleukin  |
| IPA         | Ingenuity Pathway Analysis   |
| IRAK        | engl.: <i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>   |
| IRF3        | engl.: <i>interferon regulatory factor 3</i>   |
| ITIH2       | engl.: <i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2</i>   |
| <i>L.p.</i> | <i>Legionella pneumophila</i>  |
| LEV         | Legionellen enthaltende Vakuole  |
| LPS         | Lipopolysaccharid  |
| M1 / M2     | Klassisch aktivierte / alternativ aktivierte Makrophagen   |
| MAPK        | engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>   |
| MAVS        | engl.: <i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>  |
| Mb          | Megabasen  |
| M-CSF       | Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                |   |
|----------------|---|
| MDA5           | engl.: <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>                                   |
| MHC            | Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )            |
| miRNA          | microRNA  |
| mmu            | Hausmaus (lat.: <i>mus musculus</i> )   |
| MOI            | engl.: <i>multiplicity of infection</i>   |
| mRNA           | engl.: <i>messenger RNA</i>   |
| mTOR           | engl.: <i>mechanistic target of Rapamycin</i>   |
| MX1            | engl.: <i>interferon-induced GTP-binding protein Mx1</i>                                      |
| MyD88          | engl.: <i>Myeloid differentiation primary response 88</i>                                     |
| NAIP           | engl.: <i>NLR family apoptosis inhibitory protein</i>   |
| NF1            | Neurofibromin 1   |
| NF- $\kappa$ B | engl.: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>                  |
| NLR            | NOD-ähnlicher Rezeptor (engl.: <i>NOD-like receptor</i> )                                     |
| NLRC4          | engl.: <i>NLR family CARD domain-containing protein 4</i>                                     |
| NOD            | engl.: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>                    |
| NOTCH1         | engl.: <i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>  |
| PACT           | engl.: <i>PKR activating protein</i>  |
| PAMP           | Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl.: <i>pathogen associated molecular pattern</i> ) |
| PCA            | Hauptkomponentenanalyse (engl.: <i>principal component analysis</i> )                         |
| PFS            | engl.: <i>perfect focus system</i>  |
| PI3K           | Phosphoinositid-3-Kinase  |
| PKA            | Proteinkinase A   |
| PLG            | Plasminogen   |
| PMA            | Phorbol-12-myristat-13-acetat   |
| PRR            | Mustererkennungsrezeptor (engl.: <i>pattern recognition receptor</i> )                        |
| PTEN           | engl.: <i>phosphatase and tensin homolog</i>  |
| ptr            | Gemeiner Schimpanse (lat.: <i>pan troglodytes</i> )   |
| qRT-PCR        | Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion   |
| Ran            | engl.: <i>RAs-related nuclear protein</i>   |
| RIG-I          | engl.: <i>retinoic acid-inducible gene I</i>  |
| RIP2           | engl.: <i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2</i>                          |
| RISC           | RNA-induzierter Silencing Komplex (engl.: <i>RNA-induced silencing complex</i> )              |
| RLC            | RISC-Lade-Komplex (engl.: <i>RISC-loading complex</i> )                                       |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                |  |
|----------------|--|
| RLR            | RIG-I-ähnlicher Rezeptor (engl.: <i>RIG-I-like receptor</i> )                      |
| RNA            | Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )                                 |
| RNAi           | RNA-Interferenz  |
| RNase          | Ribonuklease   |
| rRNA           | Ribosomale RNA   |
| RT             | Raumtemperatur bzw. reverse Transkription  |
| S100A8         | engl.: <i>S100 calcium-binding protein A8</i>                                      |
| SEM            | Standardfehler (engl.: <i>standard error of the mean</i> )                         |
| SERPINF2       | Alpha 2-antiplasmin  |
| siRNA          | kleine interferierende RNA (engl.: <i>small interfering RNAs</i> )                 |
| SMN            | engl.: <i>survival of motor neurons</i>  |
| snoRNA         | engl.: <i>small nucleolar ribonucleic acid</i>                                     |
| snRNA          | engl.: <i>small nuclear ribonucleic acid</i>                                       |
| ssc            | Wildschwein (lat.: <i>sus scrofa</i> )   |
| STING          | engl.: <i>Stimulator of interferon genes</i>                                       |
| stRNA          | kurze temporäre RNA (engl.: <i>small temporal RNA</i> )                            |
| T4SS           | Typ 4 Sekretionssystem   |
| TBK1           | engl.: <i>TANK-binding kinase 1</i>  |
| T <sub>H</sub> | T-Helfer Zelle   |
| THP-1          | humane Monozyten-Zelllinie   |
| TIMP1          | engl.: <i>tissue inhibitor of metalloproteinase inhibitor 1</i>                    |
| TLR            | Toll-ähnlicher Rezeptor (engl.: <i>toll-like receptor</i> )                        |
| TNF            | Tumornekrosefaktor   |
| TRBK           | engl.: <i>transactivation response element RNA-binding protein</i>                 |
| TRBP           | engl.: <i>RISC-loading complex subunit TARBP2</i>                                  |
| TREM2          | engl.: <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>                     |
| TRIF           | engl.: <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i> |
| tRNA           | Transfer-RNA   |
| US             | Vereinigte Staaten (engl.: <i>United States</i> )                                  |
| UTR            | Untranslatierte Region   |
| UV             | Ultraviolettstrahlung  |
| VE             | Vollentsalzt   |
| $\Delta$ dotA  | Legionellenmutante mit deaktiviertem dot/icm Sekretionssystem                      |

# 1 Einleitung

## 1.1 Makrophagen als elementarer Bestandteil des Immunsystems

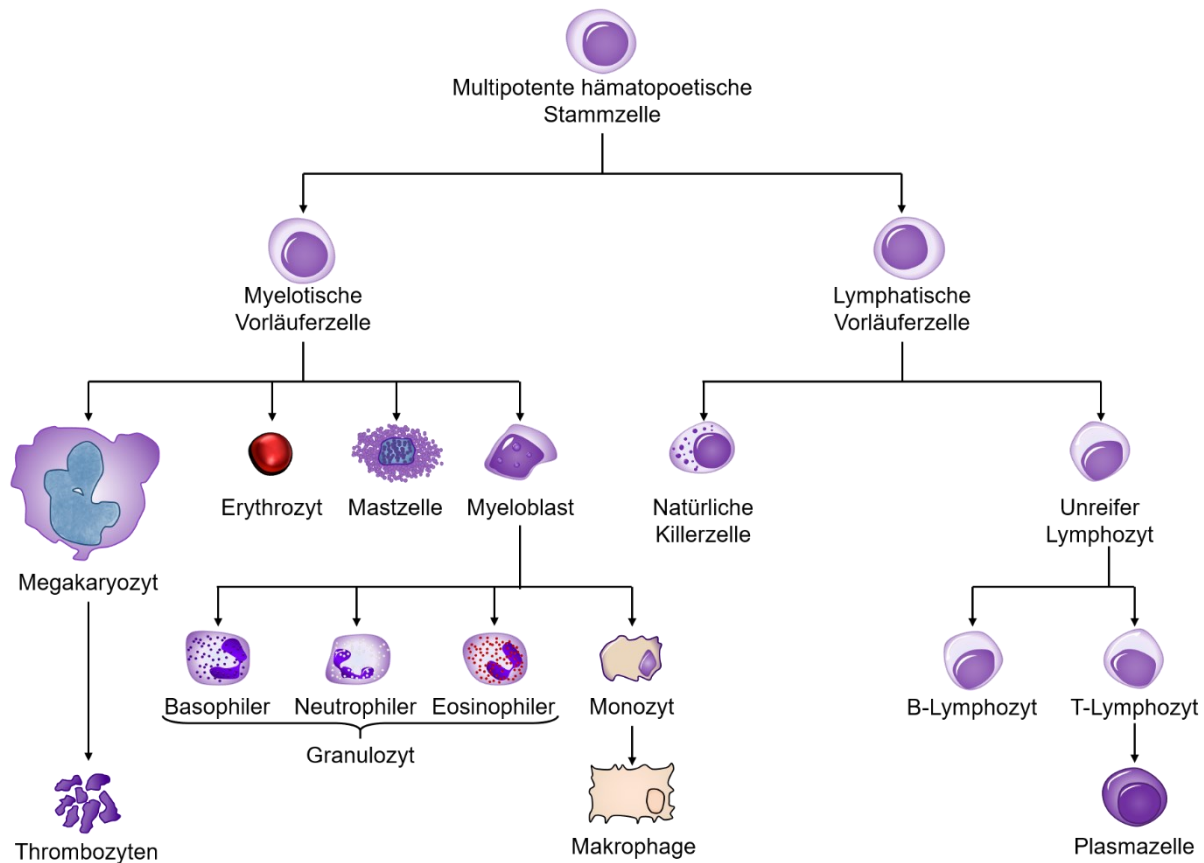
### 1.1.1 Durch Hämatopoese generierte Zellen des Immunsystems

Der menschliche Körper ist ununterbrochen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt. Während der Großteil dieser nicht pathogen ist, benötigen Lebewesen eine Abwehr gegenüber Krankheitserregern, welche durch das Immunsystem gegeben ist. Dieses teilt sich in zwei Systeme auf: das angeborene und das adaptive Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem findet sich schon früh in der Entwicklungsgeschichte der Lebewesen und ist auch bei entfernteren Organismen wie Pflanzen oder Insekten sowie auch schon in mehrzelligen Organismen vorhanden. Das adaptive Immunsystem hingegen hat sich vor rund 500 Millionen Jahren erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt entwickelt und findet sich in dieser Form lediglich in Wirbeltieren (Flajnik und Kasahara 2010).

Zum angeborenen Immunsystem gehören mechanische und physiologische Barrieren wie die Haut, Schleimhäute, aber auch Magensäure, welche Bakterien unspezifisch abtötet. Daneben beinhaltet das angeborene Immunsystem spezialisierte Zellen wie Granulozyten und Makrophagen sowie Proteine wie Interleukine oder das Komplementsystem. Das adaptive Immunsystem beinhaltet ebenfalls spezialisierte Zellen wie B- und T-Zellen sowie Antikörper. Mit diesen ist es in der Lage sich auf nicht-verändernde Bestandteile von Pathogenen einzustellen und diese damit effizienter als das angeborene Immunsystem alleine zu bekämpfen (Chaplin 2010).

Die ständige Neubildung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems ist Teil der sogenannten Hämatopoese, welche nach Geburt größtenteils im Knochenmark stattfindet. Bei dieser werden eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle gebildet. Diese Zellen haben die Eigenschaft sich im Zuge einer asymmetrischen Teilung in eine direkte Kopie der hämatopoetischen Stammzelle sowie eine myeloische oder lymphatische Vorläuferzelle zu teilen (Morrison und Kimble 2006). Aus den Vorläuferzellen können, wie in Abbildung 1.1 gezeigt, unterschiedliche Immunzellen differenzieren. Durch den lymphatischen Zweig können natürliche Killerzellen, B-Zellen sowie T-Zellen gebildet werden. Über den myeloischen Zweig kommt es zur Bildung von Thrombozyten, Erythrozyten, Mastzellen, Granulozyten (neutrophil, eosinophil und basophil) sowie Monozyten. All diese Zellen haben trotz unterschiedlichster Funktionen eine Beteiligung am Immunsystem.



**Abbildung 1.1: Abstammungsmodell immunrelevanter Zellen.** Dieses Schema stellt den graduellen Verlauf der Hämatopoese von multipotenten Stammzellen zu ausdifferenzierten Zellen dar. Entsprechend der myeloischen oder lymphatischen Abstammungslinie werden abhängig von Umwelteinflüssen unterschiedliche Zellen gebildet, wobei multipotente Eigenschaften stufenweise abnehmen.

Monozyten entwickeln sich aus differenzierten Myeloblasten, den Monoblasten, und stellen eine Zwischenstufe in der Entwicklung zu Makrophagen dar. Die Regulierung der Differenzierung hin zu Monozyten ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren, wobei erhöhte Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren PU.1, GATA1 und C/EBP $\alpha$  hauptsächlich verantwortlich für die Entstehung von Monozyten sind (Friedman 2007).

Monozyten können beim Menschen anhand ihrer Expression der membrangebundenen Glykoproteine CD14 und CD16 in drei Unterkategorien eingeteilt werden. Dabei wird eine hohe Expression von CD14 und kein CD16 als „klassischer“ Monozyt bezeichnet. Ein „intermediärer“ Monozyt weist eine hohe CD14 und eine niedrige CD16 Expression auf wohingegen ein „nicht-klassischer“ Monozyt eine niedrige CD14 Expression und eine hohe Expression von CD16 aufweist (Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010).

### 1.1.2 Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Während der Differenzierung zu Monozyten verlassen diese Zellen das Knochenmark und migrieren durch das Endothel in den Blutkreislauf, woraufhin sie sich im menschlichen Körper

teilweise in der Milz ansammeln. Diese dient im Menschen als Reservoir für Monozyten und kann diese bei einer Infektion freisetzen (Swirski, Nahrendorf et al. 2009). Aus dem Blutkreislauf gehen Monozyten bei Infektionen in das betroffene Gewebe über und differenzieren dabei zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Die genaue Zuordnung der Funktionen und Unterschiede zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen war lange ungeklärt und ist weiterhin Bestandteil von Diskussionen (Ginhoux, Williams et al. 2016). Eine in 2014 entwickelte Nomenklatur klassifiziert differenzierte Monozyten ausschließlich als Makrophagen, während dendritische Zellen als Nachfolger eines, von Monozyten unabhängigen, gemeinsamen dendritischen Zellvorläufers entstehen (Williams, Ginhoux et al. 2014).

Makrophagen weisen nach Rekrutierung in Gewebe aufgrund unterschiedlicher Stimulanzen organspezifische Unterschiede auf, welche historisch unterschiedlich benannt wurden. Abhängig von der Lokalisation sind diese zum Beispiel Mikroglia im Gehirn, Kupfer-Sternzellen in der Leber, Chondroklasten in Knorpelgewebe oder Alveolarmakrophagen in der Lunge. Auch anhand ihrer phagozytierten Substanzen können Makrophagen unterschieden werden. So werden diese zum Beispiel nach Aufnahme von Hämosiderin, ein Abbauprodukt von Ferritin, Siderophagen genannt und können durch ihre Anwesenheit als Nachweis für viele Vorgänge im Körper dienen (Rahimi und Woehrer 2017). Die Morphologie von Makrophagen kann stark unterschiedlich sein, wobei durch Bildung von Filopodien im Rahmen der Phagozytose ein hohes Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis entsteht.

Der Monozyten-Kolonien-stimulierende Faktor (M-CSF) sowie der Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierende Faktor (GM-CSF) stellen die zwei relevanten Zytokine dar mit welchen die Makrophagen-Homöostase reguliert wird. M-CSF reguliert die Anzahl von Monozyten und Makrophagen in verschiedenen Geweben, hat aber keinen Einfluss auf deren Aktivierung. Aktiviert, also bereit gemacht für eine Bedrohungssituation durch Pathogene, werden diese Immunzellen durch GM-CSF, welches im Zuge von Entzündungen oder bei einem Befall durch Pathogene ausgeschüttet wird (Ushach und Zlotnik 2016). Eine erhöhte Expression von M-CSF und GM-CSF wurde auch außerhalb von Infektionen bei einer Vielzahl an Autoimmunerkrankungen festgestellt. Aus diesem Grund gelten die Zytokine und deren dazugehörigen Rezeptoren als vielversprechende Ziele für therapeutische Ansätze durch Medikamente (Cannarile, Weisser et al. 2017).

### 1.1.3 Funktionen von Makrophagen im Immunsystem

Makrophagen üben Funktionen sowohl im angeborenen sowie im adaptiven Immunsystem aus. Im Zuge des angeborenen Immunsystems müssen sie molekulare Strukturen von Mikroorganismen detektieren. Dies geschieht über spezialisierte Rezeptoren (*engl.: pattern recognition receptors, PRRs*), die Pathogene anhand von charakteristischen Mustern, sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) erkennen und binden. PAMPs sind Struktur motive von Zellbestandteilen oder Proteinen, die meist zeitlich unveränderlich in Mikroorganismen auftreten. Dies ist häufig der Fall für Komponenten der bakteriellen Zellwand wie Peptidoglykane, Lipoproteine sowie Lipopolysaccharide (LPS) oder Lipoteichonsäuren für gramnegative beziehungsweise grampositive Bakterien. Auch für menschliche Zellen unbekannte Substanzen oder Strukturen wie 5' Triphosphat-dsRNA oder Flagellen können der Erkennung durch PRRs dienen. Unabhängig von bakteriellen Modifikationen kann auch eine ungewöhnliche Lokalisation ansonsten bekannter Stoffe als Erkennungsmerkmal fungieren (Hornung, Ellegast et al. 2006, Ray, Cot et al. 2013, Hartmann 2017).

PRRs können in verschiedene Klassen anhand ihrer Lokalisation in der Zelle eingeteilt werden. Membran-gebundene PRRs beinhalten Toll-ähnliche Rezeptoren (*engl.: toll-like receptors, TLRs*), Typ-C Lektin Rezeptoren (CLRs) sowie Scavenger-Rezeptoren. PRRs im Zytoplasma beinhalten NOD-ähnliche (NLRs) und RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLRs) (Kawai und Akira 2009). Die am besten erforschte Klasse ist die der TLRs, welche 1985 entdeckt wurden (Anderson, Jürgens et al. 1985). Diese Transmembran-Proteine sind evolutionär konserviert, bilden meist Dimere, mit sich selbst oder anderen TLRs, und binden eine Vielzahl an unterschiedlichen Liganden. Diese Liganden können von Pathogenen wie Bakterien und Viren stammen, umfassen aber auch sogenannte Schadens-assoziierten molekulare Marker (*engl. damage-associated molecular patterns; DAMPs*). Diese Abbauprodukte der Wirtszelle werden zum Beispiel im Falle einer Verletzung freigesetzt. Durch die von TLRs ausgehenden Regulationen innerhalb der Zelle stellen diese auch ein interessantes Ziel für Medikamente wie Resiquimod dar, welche ebenfalls durch TLRs gebunden werden (Hattermann, Picard et al. 2007).

Kommt es zur Bindung von TLRs an entsprechende Liganden, werden, abhängig von der Art der TLRs, zwei mögliche Signalkaskaden aktiviert bei denen die Signaltransduktion entweder über MyD88 oder TRIF erfolgt. Nach Bindung von MyD88 an den TLR kommt es zur Phosphorylierung von IRAK1 und schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors

NF- $\kappa$ B. Dies resultiert in der erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 (Arango Duque und Descoteaux 2014, Deguine und Barton 2014). Diese Zytokine bewirken eine Stärkung der lokalen Immunantwort durch Rekrutierung von zusätzlichen Immunzellen und Proteinen sowie der Aktivierung einer lokalen Koagulationskaskade, die eine bakterielle Verbreitung unterbindet (Medzhitov 2007). TLR4 und TLR3 sind in der Lage unabhängig von MyD88 über TRIF die Expression von NF- $\kappa$ B und somit die gleichen Zytokine zu steuern und induzieren zusätzlich die Expression von Typ I Interferonen wie IFN- $\beta$  (Ullah, Sweet et al. 2016).

Vergleichbar mit TLRs binden CLRs ebenfalls ein breites Feld an unterschiedlichen Liganden, wobei neben MAPK und anderen Faktoren wieder NF- $\kappa$ B ein zentrales regulatorisches Element darstellt. In Folge deren Aktivierung werden, neben einer Zytokinausschüttung, viele weitere zelluläre Vorgänge ausgelöst (Hoving, Wilson et al. 2014). Ähnliches ist auch der Fall für Scavenger-Rezeptoren, wobei man ursprünglich davon ausging, dass sie nur Lipoproteine binden würden (Zani, Stephen et al. 2015). NLRs sind in der Erkennung von PAMPs auf bakterielle Peptidoglykane spezialisiert (Caruso, Warner et al. 2014) wohingegen RLRs dsRNA binden (Hornung, Ellegast et al. 2006).

Neben den beschriebenen Funktionen von Makrophagen im angeborenen Immunsystem agieren diese auch im adaptiven Immunsystem. Die über PRRs detektierten Bestandteile von Pathogenen führen zur Sekretion von Zytokinen und folglich auch zu einer Rekrutierung von weiteren, für das adaptive Immunsystem relevante, Immunzellen (Takeuchi und Akira 2010). Zudem sind Makrophagen nach Aufnahme von Pathogenen in der Lage, im Zuge der Phagozytose, diese zu degradieren und Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Dies geschieht mit Hilfe von MHC Typ II Proteinen, die zusammen mit dem Antigen von einem auf nicht-aktivierten T-Helfer Zellen befindlichen T-Zell-Rezeptor gebunden werden. Wurde ein valides Antigen präsentiert resultiert dies in der Proliferation und Differenzierung der T-Helfer Zelle zu  $T_H1$  oder  $T_H2$  Zellen abhängig von den umgebenden Zytokinen (Roche und Furuta 2015). Abhängig vom Typ der adulten T-Helfer Zelle werden unterschiedliche Zytokine sekretiert. Für  $T_H1$  Zellen sind dies unter anderem Interferon- $\gamma$ , IL-2 und TNF, wohingegen  $T_H2$  Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sekretieren. Durch Ausschüttung dieser Zytokine kommt es zur vermehrten Differenzierung von T-Helfer Zellen vom gleichen Typ. Schließlich führt die erhöhte Anwesenheit von differenzierten T-Helfer Zellen zu einer Beeinflussung der Aktivität von Makrophagen und weiterer Immunzellen (Roche und Furuta 2015).



### 1.1.4 Die Polarisation von Makrophagen

Makrophagen decken durch die Erkennung und Bekämpfung unterschiedlichster Pathogene, der Rekrutierung zum Ort der Entzündung, sowie der Regulation dieser in verschiedenen Geweben, ein breites Feld an Funktionen ab. Dies benötigt eine hohe Anpassungsfähigkeit abhängig von der gegenwärtigen Situation und wird durch spezialisierte Phänotypen möglich. Für Makrophagen wurden in der Vergangenheit zwei Polarisierungen identifiziert: die klassisch aktivierten M1 Makrophagen sowie die alternativ aktivierten M2 Makrophagen (Stein, Keshav et al. 1992, Mills 2012). Diese Bezeichnungen stellen die Extremformen dar, die ein Makrophage annehmen kann. Klassisch aktivierte M1 Makrophagen zeichnen sich durch ihre effiziente Bekämpfung von Mikroorganismen und Viren aus. Sie sekretieren proinflammatorische Zytokine und Chemikalien wie Sauerstoffradikale und verhindern so die Ausbreitung der Pathogene. Zudem hat diese Polarisierung eine negative Auswirkung auf die Proliferation umgebender Zellen und schädigt diese bei hoher Aktivität sogar. Alternativ aktivierte M2 Makrophagen haben entgegengesetzte Funktionen und sekretieren antiinflammatorische Zytokine. Sie helfen dadurch bei der Heilung von Wunden und der Reparatur von umliegenden Geweben. Sie unterdrücken die Aktivität des Immunsystems und fördern die Proliferation von Zellen (Atri, Guerfali et al. 2018).

Durch Messung von spezifischen Markern für die jeweilige Polarisation können diese voneinander unterschieden werden. Nach Analyse von M2 spezifischen Markern wurden alternativ aktivierte Makrophagen sogar in vier Unterkategorien, gekennzeichnet durch den Zusatz a bis d, eingeteilt, wobei es sich als schwierig herausstellte diese feineren Unterscheidungen bei Experimenten *in vivo* zu verwenden (Röszer 2015). Diese Unterkategorien, wie auch die verwendete Nomenklatur der M1 und M2 Polarisation stellen zur Kategorisierung von Makrophagen *in vitro* einen künstlichen Rahmen dar, dessen Bedingungen sich in Organismen aber selten klar wiederfinden. Vielmehr ist ein fließender Übergang zwischen den Extremformen der klassischen und alternativ aktivierten Makrophagen zu beobachten (Murray, Allen et al. 2014).

## 1.2 *Legionella pneumophila* als Krankheitserreger

### 1.2.1 Die Gattung *Legionella*

Die Gattung *Legionella* enthält aktuell 67 Arten (Parte, Sardà Carbasse et al. 2020). Sie stellen gramnegative, aerobe Bakterien dar, deren optimale Wachstumsbedingungen bei einer Temperatur von 35 °C liegt, die aber gut bis 55 °C überleben können (RKI 2019). Legionellen haben die Eigenschaft als intrazelluläres Pathogen andere Zellen zu infizieren.

In der Natur dienen ihnen dafür hauptsächlich Amöben und andere Protozoen (Fields 1996, Richards, Von Dwingelo et al. 2013). In menschengemachten Umgebungen können sie in vielen Wasserreservoirien, wie Wasserrohren, Klimaanlageanlagen und Kühltürmen, überleben (Heng, Goh et al. 1997, García-Fulgueiras, Navarro et al. 2003). Legionellen werden zudem häufig in Blumenerde nachgewiesen (Steele, Moore et al. 1990).

### 1.2.2 Entdeckung als Krankheitserreger

In einem Hotel in Philadelphia war 1976 eine große Anzahl der Besucher von einer Lungenentzündung betroffen. Im späteren Verlauf verstarben 29 der 181 erkrankten Gäste. Ein Großteil der Besucher war zu diesem Zeitpunkt als US-Kriegsveteranen Teil einer Organisation, der *American Legion*. Ein Jahr später wurde 1977 *Legionella pneumophila* (*L.p.*) als Verursacher dieser Epidemie identifiziert, welche sich in der Klimaanlage vermehrt hatten. In Folge wurde diese Art der Lungenentzündung nach der Veteranenvereinigung als Legionärskrankheit benannt (Bartram 2007).

Es wurde festgestellt, dass sich Legionellen in Protozoen, vorwiegend Amöben, vermehren. Dies führte zur Annahme, dass diese auch in menschlichen Makrophagen zur Replikation fähig sein könnten, da diese Zellen mehrere Parallelen zu Amöben aufweisen (Rowbotham 1980). Die Infektion von Makrophagen erfolgt über die oberen Atemwege. Die Aufnahme der Bakterien erfolgt dabei durch Einatmen von kontaminierten Aerosolen. *Legionella pneumophila* des Serotyps 1 stellt den Verursacher dar, der für den Großteil aller menschlichen Infektionen verantwortlich ist (Yu, Plouffe et al. 2002).

Bei einer Infektion mit Legionellen kommt es nicht immer zur Ausprägung aller Legionärskrankheit-spezifischen Symptome. Bei Ausbleiben der Lungenentzündung, aber Auftreten von grippeähnlichen Symptomen spricht man vom sogenannten Pontiac Fieber. Dieses ist benannt nach der US-amerikanischen Stadt, in der 1968 mehrere Mitarbeiter des Gesundheitsamtes erkrankten. Die Ursache wurde erst nach einem Jahrzehnt durch die Entdeckung der Legionellen aufgeklärt (Glick, Gregg et al. 1978).

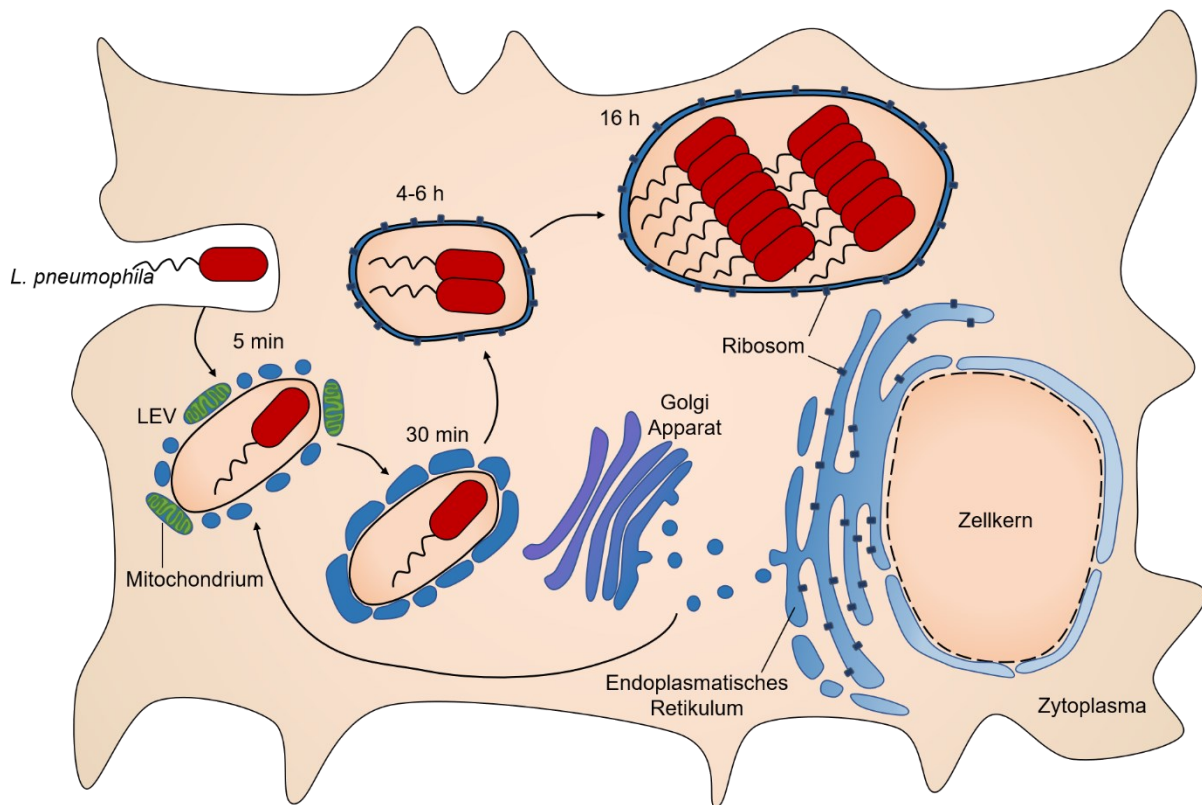
### 1.2.3 *Legionella pneumophila*

*Legionella pneumophila* ist ein aerobes, gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium. Es ist durchschnittlich 2 µm lang und besitzt ein 3,44 Mb großes Genom. *L. pneumophila* hat ein polar lokalisiertes Flagellum, ist nicht von einer Kapsel umgeben und benötigt externe Quellen an Cystein und Eisen(III) um zu überleben. Legionellen können Biofilme bilden, was ihnen

neben zusätzlichem Schutz vor Umwelteinflüssen ermöglicht, sich außerhalb natürlicher auch in vielen menschengemachten Umgebungen anzusiedeln (Abdel-Nour, Duncan et al. 2013).

Als gramnegatives Bakterium besitzt *L. pneumophila* eine doppelschichtige Zellwand, wobei sich auf der äußeren Membran Lipopolysaccharide befinden. Dieses LPS stellt das vorwiegende Antigen dar, gegen das Menschen Antikörper bilden. Bei einer Infektion fungiert das LPS der Legionellen unter anderem als primäre Verankerung an Wirtszellen (Kowalczyk, Chmiel et al. 2021). Im Gegensatz zu LPS anderer Gammaproteobakterien wird LPS von *L. pneumophila* von TLR2 statt TLR4 erkannt. Dies resultiert, reguliert über MyD88, in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und in der Beseitigung der Infektion (Girard, Pedron et al. 2003, Archer, Alexopoulou et al. 2009, Shim, Kim et al. 2009).

Legionellen besitzen verschiedene Sekretionssysteme mit denen sie, abhängig vom befallenen Wirtsorganismus, eine Vielzahl von Effektorproteinen in dessen Zellen transferieren und deren Verhalten modifizieren können. Während die Typ 2 und Typ 4 Sekretionssysteme (T4SS) in allen Legionellastämmen vorkommen, besitzt *L. pneumophila* zusätzlich ein Typ 1 Sekretionssystem (Qin, Zhou et al. 2017, Gomez-Valero, Rusniok et al. 2019). Von den T4SS hat vor allem das Dot/Icm System eine essentielle Funktion während einer Infektion mit *L. pneumophila*. So sind dessen sekretierte Proteine notwendig um sich innerhalb von Amöben sowie menschlichen Zellen zu etablieren und zu vermehren (Marra, Blander et al. 1992, Berger und Isberg 1993).

1.2.4 Der intrazelluläre Lebenszyklus von *Legionella pneumophila*

**Abbildung 1.2: Aufnahme und Etablierung der Legionellen Vakuole.** Nach Aufnahme einer Legionelle werden innerhalb weniger Minuten Vesikel, ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), rekrutiert, welche sich an die Legionellen-enthaltende Vakuole an (LEV) anlagern. Eine Rekrutierung ist auch für Mitochondrien zu beobachten. Die die LEV umgebenden Vesikel breiten sich über die Oberfläche der LEV aus, verbinden sich, und nehmen über einen Zeitraum von wenigen Stunden zusammen mit Ribosomen eine Form an, die der des raunen ER gleicht. Innerhalb dieses abgeschlossenen Systems vermehrt sich das Bakterium und tritt nach rund 16 h aus der Wirtszelle aus indem es die Lyse dieser einleitet. Adaptiert nach (Isberg, O'Connor et al. 2009).

Wird ein nicht pathogenes Bakterium von Makrophagen aufgenommen, kommt es zur Bildung eines Endosoms im Rahmen der Phagozytose. Im späteren Verlauf fusioniert dieses mit einem Lysosom und das Bakterium wird in einem Endolysosom degradiert. *Legionella pneumophila* umgeht diese Degradation indem es die Fusion mit Lysosomen unterbindet und ein abgetrenntes Zellkompartiment, die Legionellen-enthaltenden Vakuole (LEV), etabliert (Horwitz 1983, Horwitz und Maxfield 1984). Für die erfolgreiche Bildung der LEV und das daran anschließende Wachstum der Legionellen innerhalb dieser, ist das Dot/Icm T4SS System notwendig. Durch dieses werden über 300 Effektorproteine in die Wirtszelle sekretiert, zu deren Funktionen es unter anderem gehört, Einfluss darauf zu nehmen wie der intrazelluläre Vesikeltransport reguliert wird (Nagai, Kagan et al. 2002). In Folge dieser Beeinflussung werden Vesikel des Wirtes rekrutiert, welche anschließend in der Nähe des Bakteriums lokalisieren und eine Struktur, ähnlich dem des endoplasmatischen Retikulums (ER), nachbilden (Swanson und Isberg 1995, Derré und Isberg 2004). Dies wird auch durch die Anwesenheit von Ribosomen unterstützt (Tilney, Harb et al. 2001).

Der ungefähre zeitliche Ablauf eines Lebenszyklus von *L. pneumophila* in menschlichen Makrophagen ist in Abbildung 1.2 gezeigt, wobei es innerhalb weniger Minuten zur Rekrutierung von Vesikeln und anschließend der Bildung der LEV kommt und ein Austreten aus der Wirtszelle nach ungefähr 16 Stunden stattfindet.

Die Nachbildung einer Makrophagen Organelle, der LEV, erlaubt es den Bakterien sich geschützt zu replizieren. Das für die Membranen benötigte Material stammt aus umgeleiteten Vesikeln, welche vom ER abgeschieden und eigentlich zum Golgi-Apparat transportiert werden (Kagan und Roy 2002). Die rekrutierten Vesikel fusionieren mit der LEV, wobei der Inhalt des Lumens in die LEV übergeht und so neben Lipiden auch Proteine aufgenommen werden (Kagan, Stein et al. 2004, Robinson und Roy 2006).

Nach erfolgreicher Etablierung der LEV vermehrt sich *L. pneumophila* in dieser, wobei über die Dauer der Infektion unterschiedliche Signalwege des Wirtes modifiziert werden, um jeweils optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen. Diese Regulationen sind abhängig vom gegenwärtigen Stand der Infektion und betreffen einzelne Substrate wie Phosphotyrosin (Kaneko, Stogios et al. 2018), einzelne Signalwege wie den Hippo Signalweg (Lee und Machner 2018), oder Effektoren mit Einfluss auf die gesamte Transkription wie NF- $\kappa$ B (Bartfeld, Engels et al. 2009).

Die Anwesenheit von intrazellulären Pathogenen wie Legionellen benötigt eine Einflussnahme auf die Regulation des Zelltods, damit es von Seiten des Wirtes nicht zum Absterben der Zellen in Folge der Immunantwort kommt. Dafür besitzt *L. pneumophila* mehrere Effektorproteine und Substrate, welche die Aktivität von proapoptotischen Proteinen während der bakteriellen Replikation einschränken (Laguna, Creasey et al. 2006, Banga, Gao et al. 2007, Luo 2011). Auf der anderen Seite wird nach abgeschlossener Vermehrung ab einem bestimmten Zeitpunkt die Freisetzung des Bakteriums nötig. *L. pneumophila* kann den Tod der Wirtszelle über eine Vielzahl an Systemen induzieren und regulieren. So läuft ein großer Teil der Regulation über sekretierte Effektorproteine, entweder mit Ähnlichkeit zu eukaryotischen E3 Ubiquitin Ligasen (Kubori, Hyakutake et al. 2008, Lin, Doms et al. 2015, Lin, Lucas et al. 2018), oder mit einem Einfluss auf die Aktivität von Wirtsproteinen, welche für Ubiquitinierung relevant sind (Ensminger und Isberg 2010). Alternativ besitzt *L. pneumophila* auch die Fähigkeit Caspase-3 Aktivität zu induzieren und so die Apoptose der Makrophagen einzuleiten (Zhu, Hammad et al. 2013). Die durch den Tod der Wirtszelle freigesetzten Legionellen können im Anschluss weitere Makrophagen infizieren, wodurch sich, wenn nicht eine entsprechende Immunantwort

oder antimikrobielle Behandlung zur Verfügung steht, der Gesundheitszustand des betroffenen Menschen verschlechtert.

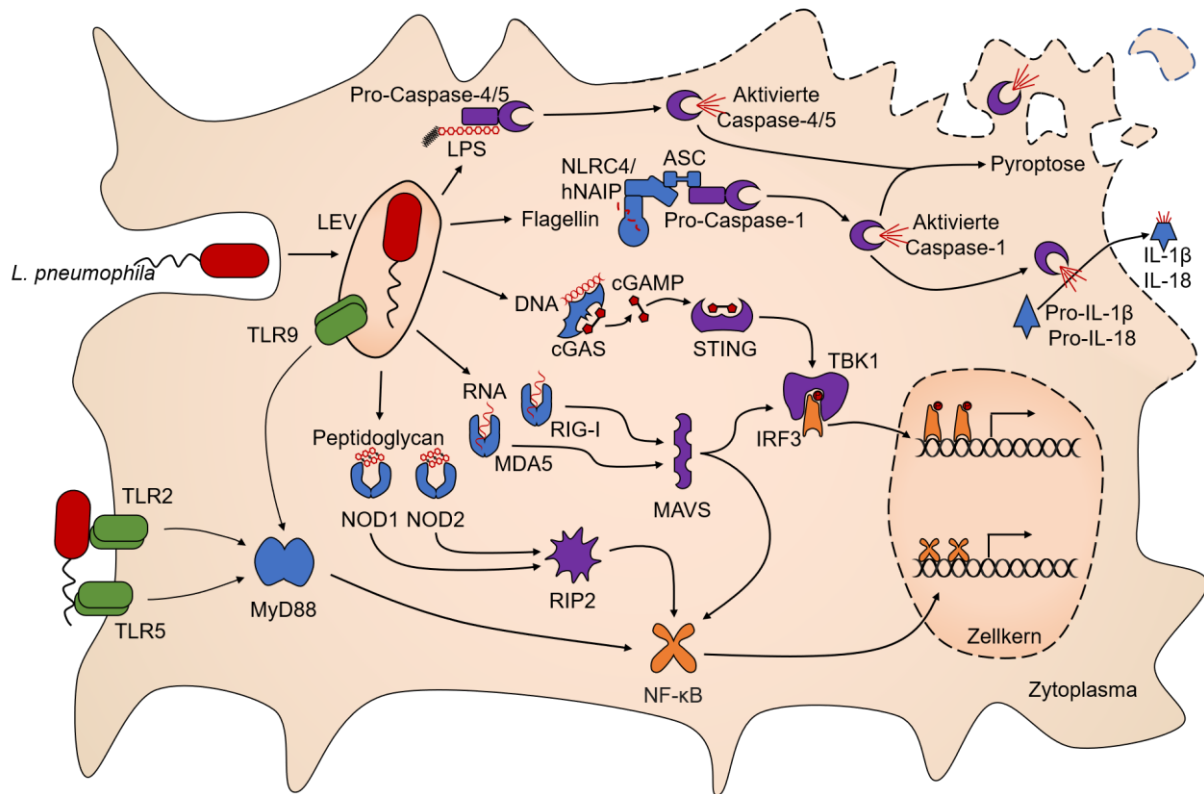
### 1.2.5 Erkennung von *Legionella pneumophila* durch Makrophagen

Bei einer Infektion mit *Legionella pneumophila* stehen dem Immunsystem zur Detektion und Bekämpfung dieser mehrere Optionen zur Verfügung. Dabei können Makrophagen die Bakterien anhand von PRRs erkennen und in Folge Maßnahmen zur Beseitigung der Bakterien ergreifen. Die Erkennung erfolgt unter anderem über TLRs, NLRs und mehrere Nukleinsäurebindende Proteine. Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht über die in der Erkennung von Legionellen involvierten Signalwege.

Relevante TLRs bei einer Infektion mit Legionellen sind TLR2, TLR5 und TLR9, welche jeweils LPS, Flagellin beziehungsweise bakterielle DNA in Endo- und Phagosomen binden. Obwohl LPS in der Regel über TLR4 detektiert wird, ist dies bei Legionellen nicht der Fall (Girard, Pedron et al. 2003). Für die drei involvierten TLRs erfolgt eine Signalkaskade über MyD88 und resultiert in der Produktion von antibakteriellen Zytokinen und der Rekrutierung von weiteren Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten (Casson, Doerner et al. 2017).

Die Erkennung von Peptidoglykan erfolgt über die NLRs NOD1 und NOD2 welche in Folge über RIP2 die Aktivität von NF- $\kappa$ B steigern und vergleichbar mit TLRs die Sekretion von Zytokinen beeinflussen (Mukherjee, Hovingh et al. 2019). Die Detektion von Flagellin wird durch einen Proteinkomplex ermöglicht, der neben dem Adaptorprotein ASC und der daran gebundenen Pro-Caspase-1 auch die NLRs NLRC4 und humanes NAIP enthält. Durch Bindung von Flagellin wird aktivierte Caspase-1 freigesetzt, was zur Prozessierung von IL-1 $\beta$  und IL-18 führt und unabhängig davon durch Spaltung von Gasdermin D die Pyroptose einleitet. Caspase-4 und Caspase-5 werden durch bakterielles LPS aktiviert und führen ebenfalls zum Tod der Zelle durch Pyroptose (Naujoks, Lippmann et al. 2018).

Nukleinsäuren aus bakteriellem Ursprung wie DNA und RNA stellen ebenfalls Ziele für die Erkennung durch geeignete Rezeptoren dar. Doppelsträngige DNA wird aufgrund der unüblichen Lokalisation im Zytoplasma statt des Zellkerns durch cGAS gebunden, welches daraufhin zyklisches GMP-AMP (cGAMP) als sekundären Botenstoff produziert. Bindung durch STING führt zur Aktivierung von TBK1, des Transkriptionsfaktors IRF3 und der Produktion von IFN- $\beta$ . Doppelsträngige RNA wird über RIG-I und MDA5 erkannt, was zur Bindung an MAVS führt. MAVS aktiviert die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF3, was zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt (Naujoks, Lippmann et al. 2018).



**Abbildung 1.3: Erkennung von *Legionella pneumophila* durch Makrophagen.** *L. pneumophila* wird durch TLR2 und TLR5 an der Zelloberfläche detektiert wohingegen eine Erkennung in Phagosomen über TLR9 stattfindet. Diese veranlassen über MyD88 und NF- $\kappa$ B die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. NOD1, NOD2, MDA5, RIG-I, cGAS, NLRC4 und humanes NAIP detektieren mit Peptidoglycan, RNA, DNA und Flagellin bakterielle Bestandteile und induzieren die Transkription verschiedener proinflammatorischer Proteine sowie die Aktivierung von Caspase-1, die zur Freisetzung der Entzündungsfaktoren IL-1 $\beta$  und IL-18 führt. Die Detektion von LPS über pro-Caspase-4/5 resultiert in der Pyroptose der Wirtszelle. Adaptiert nach (Naujoks, Lippmann et al. 2018).

## 1.3 microRNAs

### 1.3.1 Entdeckung und Einordnung von microRNAs

Die Entdeckung von microRNAs (miRNAs) geht eng einher mit der Entdeckung der RNA Interferenz (RNAi). Die Idee, dass die RNA des komplementären Strangs der mRNA, die sogenannte Antisense-RNA, einen Einfluss auf die Translation der mRNA haben könnte, bestand schon deutlich vor der Entdeckung von RNAi oder miRNAs. Das Phänomen tauchte 1984 auf, als Antisense-RNA zur dazugehörigen mRNA im Verhältnis 100:1 gegeben wurde und so die Expression der Thymidin Kinase des Herpes simplex Virus einschränkte (Izant und Weintraub 1984). Auch bei Pflanzenexperimenten bemerkte man den inhibitorischen Effekt auf die Expression. Dabei wurde meistens die Beobachtung gemacht, dass die Ergebnisse den Erwartungen entgegengesetzt waren. So wurde zum Beispiel 1990 festgestellt, dass sich die Blätter von Petunien trotz Überexpression der Chalkon-Synthase, einem Enzym das maßgeblich an der Färbung der Blätter beteiligt ist, nicht verdunkelten, sondern sogar heller wurden (Napoli, Lemieux et al. 1990).

Man bemerkte 1993 in einer Studie mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, dass Transkripte eines essentiellen Gens nicht zu Proteinen translatiert werden. Zwei der Transkripte kodierten kurze 22 beziehungsweise 61 Nukleotid lange RNAs, deren Sequenzen annähernd komplementär zu einer Region im 3' untranslatierten Bereich (3' UTR) waren. Die längere der beiden RNAs wies zwei Bereiche auf, die komplementär zueinander waren und bildete dadurch eine Stamm-Schleifen Struktur aus. Sie diene als Vorstufe in der Prozessierung der kürzeren RNA. Durch die Komplementarität zur 3' UTR wurde vermutet, dass wahrscheinlich eine RNA-RNA Interaktion vorlag (Lee, Feinbaum et al. 1993).

Nachdem in vorherigen Pflanzenexperimenten beobachtet wurde, dass die Expression bestimmter Virussequenzen eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen Viren zur Folge hatte, wollte man das System umdrehen. Dazu infizierte man Pflanzen mit Viren, welchen eine Antisense-Sequenz eingebaut wurde, woraufhin die Expression des Gens in der Pflanze sank (Kumagai, Donson et al. 1995). Als Überbegriff für alle Beobachtungen von reduzierter Expression durch Antisense-RNA wurde posttranskriptionelles Gen-Silencing verwendet, wobei der genaue molekulare Ablauf weiterhin unbekannt war (Depicker und Montagu 1997).

Die Aufklärung wie es zur Expressionsreduktion kommt gelang Fire und Mello 1998 bei Experimenten mit *C. elegans*. Sie beobachteten, dass eine effiziente Regulation des Zielproteins nur stattfand, wenn doppelsträngige RNA (dsRNA) injiziert wurde, nicht aber bei Injektion von mRNA oder komplementärer Antisense-RNA (Fire, Xu et al. 1998). Sie erkannten dabei auch, dass die Effekte nicht stöchiometrisch abliefen, so dass bereits kleine Mengen an dsRNA große Wirkung zeigten und eine katalytische oder verstärkende Komponente dementsprechend Teil des Prozesses sein muss. Diesen Prozess bezeichneten Andrew Fire und Craig Mello als RNA Interferenz (RNAi) und wurden 2006 für die Entdeckung und spätere Aufklärung mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Zwei Jahre nach Entdeckung der RNAi stellte man fest, dass zugegebene dsRNA von einer unbekanntes dsRNA-spezifischen Nuklease in 21-23 Nukleotid lange Stücke geschnitten wird und anschließend vermutlich durch eine ATP-abhängige Helikase in ihre Einzelstränge aufgetrennt werden. Dabei bleibt der Antisense-Strang mit dem Nuklease- und Helikase-enthaltenden Komplex verbunden und bindet mit diesem komplementär an die Ziel-mRNA. In Folge kommt es zur Spaltung der mRNA (Zamore, Tuschl et al. 2000). Es wurde vermutet, dass die Zugabe von langen dsRNAs für den beabsichtigten Effekt nicht von Nöten sei und bereits kurze 21 Nukleotid lange Stücke, sogenannte siRNAs (*engl.: small interfering RNAs*), zur Expressionsminderung führen, was in Folge auch nachgewiesen wurde (Elbashir, Harborth et al. 2001).



Kurz nachdem das Modell der RNAi veröffentlicht wurde konnten essentielle Bestandteile bestimmt und das Modell erweitert werden. Die zuvor unbekannte Nuklease wurde als Endoribonuklease Dicer identifiziert (Bernstein, Caudy et al. 2001) und ein aktualisiertes Modell vorgestellt um auch die beobachtete katalytische, beziehungsweise verstärkende Komponente, zu berücksichtigen (Sijen, Fleenor et al. 2001). Dies wurde zum einen durch die Wiederverwendung der mRNA schneidenden Endonuklease, des RNA-induzierten Silencing Komplexes (RISC), erreicht (Hammond, Bernstein et al. 2000). Zum anderen sollte eine RNA-abhängige RNA-Polymerase aus verwendeten Antisense-RNAs die ursprüngliche dsRNA herstellen und so deren Wirksamkeit fördern. Die Vorarbeiten für das Modell der RNAi wurden vorwiegend mit *C. elegans* durchgeführt in welchem eine RNA-abhängige RNA-Polymerase bekannt war. Obwohl eine vergleichbare Polymerase in Menschen vermutet wurde konnte ein Protein mit solcher Funktion erst deutlich später nachgewiesen werden (Maida und Masutomi 2011). Abbildung 1.4 zeigt das erweiterte Modell der RNAi von 2001.

Bevor die Namenskonvention microRNAs beziehungsweise miRNAs aufkam war von kurzen RNAs wie *lin-4* und *let-7* bekannt, dass diese die Expression von Genen posttranskriptionell regulieren. Sowohl die Länge als auch deren Biogenese entsprach denen der siRNAs, welche im Zuge der RNAi ihre adressierten mRNAs degradieren. Diese Degradation trat bei dieser Klasse an RNAs, bis dahin stRNAs (*engl.: small temporal RNAs*) genannt, nicht auf. Durch die zwei unterschiedlichen Regulationsmechanismen wurde klar, dass es sich um zwei Klassen an RNAs handeln muss, wobei aufgrund der vergleichbaren Biogenese und Integration in RISC unklar war, worin die Unterschiede lagen. Auf die neue Bezeichnung miRNA einigten sich drei Forschungsgruppen 2001 und stellten fest, dass es neben den zwei bekannten Vertretern *lin-4* und *let-7* eine Vielzahl an bislang unbekanntem miRNAs gab (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001, Lau, Lim et al. 2001, Lee und Ambros 2001).

Da zuvor nur *lin-4* und *let-7* als miRNAs bekannt waren, bezogen sich zu diesem Zeitpunkt alle Vermutungen über die unterschiedliche Wirkung gegenüber siRNAs auf diese. Bei beiden miRNAs wurde beobachtet, dass deren Komplementarität nicht durchgängig ist und in der Mitte der RNA nicht-komplementäre Basen vorhanden sind. Daraufhin bestand die Annahme, dass dies der Grund für die Repression der Translation ohne mRNA Degradation ist. Zudem wurde vermutet, dass miRNAs durch die resultierende Sekundärstruktur eventuell andere Proteine rekrutieren beziehungsweise verdrängen können oder durch Bindung an andere RNAs deren Bindung von mRNAs verhindern können (Ambros 2001).



**Abbildung 1.4: Erweitertes Modell der RNA Interferenz.** Die Effizienz der RNA Interferenz wurde erklärt durch die Wiederverwendung von bereits genutzten RNA-geladenen RISC Komplexen (rechte Seite) und durch die Amplifikation der siRNAs über eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Adaptiert nach (Sijen, Fleenor et al. 2001).

### 1.3.2 Transkription und Prozessierung von miRNAs

miRNAs können sowohl aus Teilen bekannter Gene sowie nicht annotierten Bereichen des Genoms entstehen. Dazu werden diese Bereiche durch RNA Polymerase II oder RNA Polymerase III transkribiert. Viele miRNA kodierende Bereiche befinden sich in Clustern und werden spezifisch durch eine der beiden Polymerasen transkribiert, wobei einzelne miRNAs auch unabhängig von anderen im Cluster reguliert werden können. Beide RNA Polymerasen erkennen spezifische Promoter- beziehungsweise Terminator-Sequenzen und die Aktivität der

einzelnen Polymerasen kann über eine Vielzahl an Regulationsmöglichkeiten, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, modifiziert werden. Die durch die Transkription entstehenden primären miRNAs (pri-miRNA) können polyadenyliert und mit einem 5'-Cap versehen sein, was kennzeichnend für die Prozessierung durch RNA Polymerase II ist.

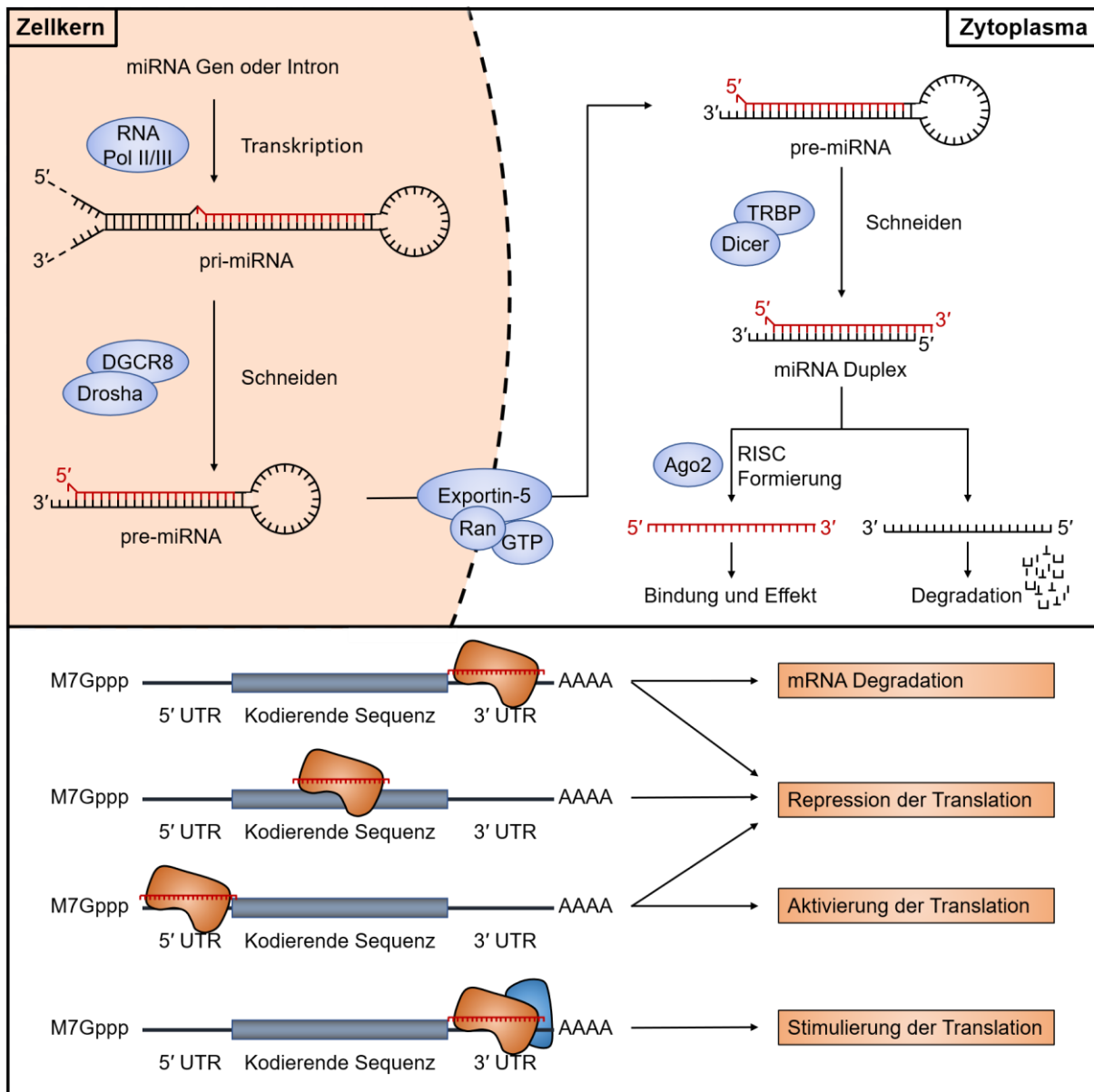
Die transkribierten pri-miRNAs bilden aufgrund ihrer Sequenz eine sogenannte Haarnadel-Struktur (*engl.: hairpin*), die bei den meisten pri-miRNAs aus 33 komplementären Basenpaaren und einer Schleife ohne Komplementarität zueinander besteht. Zudem sind in der Regel die letzten Nukleotide am 3' und 5' Ende der RNA nicht komplementär.

Bei mehreren miRNAs wurden posttranskriptionelle Modifizierungen der RNA festgestellt, welche in der Regel durch Adenosin Deaminasen wie ADAR eingebracht werden. Diese Enzyme binden an dsRNA und konvertieren Adenosin zu Inosin, was unterschiedliche Effekte zur Folge haben kann. Die Auswirkungen reichen von variiertem Prozessierung durch die RNasen III Drosha oder Dicer hin zu veränderter Spezifität gegenüber Ziel-mRNAs (Tomaselli, Bonamassa et al. 2013).

Die pri-miRNA wird noch im Zellkern durch den sogenannten Mikroprozessor-Komplex gespalten. Dieser Komplex enthält die Typ III RNase Drosha sowie die RNA-bindende Komponente DGCR8. Bei der endonukleolytischen Spaltung der pri-miRNA dient DGCR8 der doppelsträngige Teil der Haarnadel-Struktur als Bindestelle und kann mit Hilfe der 3' und 5' nicht-komplementären Basen die Spaltungsstelle exakt festsetzen. Die Prozessierung der pri-miRNA durch Drosha und DGCR8 resultiert in einer verkürzten Haarnadel-Struktur, die pre-miRNA genannt wird. Bei miRNAs die sich in Introns befinden besteht die Möglichkeit, dass die durch das Spleißen entstehende RNA die Struktur einer pre-miRNA aufweist. In diesem Fall wird die Prozessierung durch Drosha und DGCR8 umgangen und man spricht von Mirtrons (Winter, Jung et al. 2009).

Der Transfer der pre-miRNA vom Zellkern in das Zytoplasma wird durch Exportin-5 und RanGTP ermöglicht. Angekommen im Zytoplasma wird die pre-miRNA über RISC weiter prozessiert und kann mit diesem ihre Funktion ausüben. Zur Formierung dieses Proteinkomplexes muss die pre-miRNA durch den, aus der Typ III RNase Dicer, dem dsRNA bindenden Proteinen TRBP und PACT, sowie der Hauptkomponente Ago2 bestehenden RISC-Lade-Komplex (RLC) gebunden werden. In Folge wird die einzelsträngige Schleife der pre-miRNA durch Dicer entfernt. Dabei entsteht eine 22 Nukleotid langes doppelsträngige RNA mit zwei Nukleotid langen Überhängen an beiden 3' Enden (Heyam, Lagos et al. 2015).

Nach dem Abtrennen der Schleife dissoziieren Dicer, TRBP und PACT von der miRNA und diese wird durch eine unbestimmte Helikase in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Nur einer der beiden Stränge kann an mRNAs binden (*engl.: guide strand*), wohingegen der Strang mit der höheren thermo-dynamischen Stabilität am 5' Ende der RNA degradiert wird (*engl.: passenger strand*). In dieser Form kann die nun fertig prozessierte miRNA zusammen mit Ago2 die regulatorischen Funktionen auf die mRNA ausüben (Winter, Jung et al. 2009).



**Abbildung 1.5: miRNA Biogenese, Bindungsoptionen und Auswirkungen.** miRNAs werden durch RNA Polymerase II/III transkribiert. Die entstandene pri-miRNA wird durch DGCR8 und Drosha zur pre-miRNA geschnitten und über Exportin-5 aus dem Nucleus exportiert. Dort wird sie über TRBP und Dicer in ihre endgültige Form, einen miRNA Duplex, geschnitten. Ein Strang des Duplexes wird zusammen mit Ago2 in den RISC Komplex geladen und kann darüber zur Degradation einer mRNA oder zur Repression, Aktivierung oder Stimulierung der Translation dieser mRNA führen. Adaptiert nach Winter, Jung et al. 2009, Ling, Fabbri et al. 2013, Heyam, Lagos et al. 2015.

### 1.3.3 Auswirkungen von miRNAs auf adressierte mRNAs

Zusammen mit Ago2 kann eine fertig prozessierte miRNA im RISC Komplex an geeignete Bindestellen in mRNAs binden. Die Spezifität gegenüber einzelnen Bindestellen entsteht über eine perfekte Sequenzkomplementarität zwischen den Nukleotiden 2-7 der miRNA und der mRNA. Diese Region der miRNA wird als sogenannte Seed-Region bezeichnet.

In der Regel finden sich die Bindestellen der regulierten mRNAs in deren 3' UTR, doch auch Bindungen an die 5' UTR sowie innerhalb der kodierenden Sequenz sind bekannt. Gebunden an die mRNA kommt es meist zu einer Deadenylierung der mRNA und so verringerter Stabilität. In selteneren Fällen kommt es zur Degradation der mRNA durch endonukleolytische Spaltung oder zur Blockierung der Ribosomen durch Abdecken von Bindestellen. Obwohl miRNAs üblicherweise eine reduzierte Expression von Ziel-mRNAs zur Folge haben gibt es auch Fälle in denen die Translation stimuliert wird. Dies geschieht üblicherweise durch eine Blockade von reprimierenden beziehungsweise destabilisierenden Faktoren oder durch Rekrutierung von translationsfördernden Faktoren (Ling, Fabbri et al. 2013).

### 1.3.4 miRNA-Nomenklatur

Um miRNAs einheitlich zu benennen wurde ein System etabliert, das auch in Teilen die Herkunft einzelner miRNAs klären kann. miRNAs werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert und während bis Anfang des Jahrhunderts nur sehr wenige Vertreter bekannt waren, ist deren Anzahl schnell in niedrige vierstellige Bereiche angewachsen.

Da über die Zeit immer mehr Methoden zur Identifikation kurzer RNAs entwickelt wurden, muss bei miRNAs mit hohen Indikatoren darauf geachtet werden, ob eine miRNA Funktionalität vorliegt. Trotz einer entsprechenden Charakteristik von rund 21 Nukleotiden kann eine solche RNA andere Funktionen besitzen und diese fälschlicherweise in Datenbanken vertreten sein.

Wird hsa-miR-106a-5p als Beispiel für die Benennung von miRNAs verwendet bezeichnen die ersten drei Buchstaben *hsa* den Organismus *homo sapiens*. *miR* zeigt an, dass es sich um die endgültig prozessierte Variante der miRNA-106a handelt, wohingegen *mir* das miRNA Gen, die pri-miRNA oder die pre-miRNA bezeichnet. Buchstaben nach der Zahl wie *106a* geben Varianten an, wenn sich miRNAs durch wenige Nukleotide unterscheiden wohingegen abgesetzte Zahlen wie bei miR-105-1 und miR-105-2 identische miRNAs aus unterschiedlichen genomischen Quellen beschreiben.

Da nur einer der beiden miRNA Stränge, der *guide strand*, eine Funktion ausübt wird der nicht genutzte, der *passenger strand*, mit einem Stern markiert wie zum Beispiel bei miR-106a\*. Ist nicht bekannt von welchem der beiden Stränge die Funktion ausgeht können die Stränge wie bei miR-106a-5p mit 3p oder 5p versehen werden um eine eindeutige Zuordnung zum 3' oder 5' Strang zu gewährleisten.

Da es bei einigen pre-miRNAs durch Modifikationen der Sequenz zu Varianten kommen kann, resultiert eine pre-miRNA nicht notwendigerweise in einer Variante fertig prozessierter miRNA. Diese sogenannten IsomiRs stellen zusammen mit miRs, die trotz unterschiedlicher Sequenz aus einer Quelle stammen, Ausnahmen der sonst üblichen Biogenese dar und werden bislang nicht systematisch benannt.

Da miRNA kodierende Bereiche häufig in Clustern in räumlicher Nähe zueinander liegen werden diese Bereiche mit Vertretern dieses Clusters benannt. Dabei wird wie beim miR-17 Cluster beziehungsweise miR-17-92 Cluster entweder die miRNA mit der kleinsten Zahl oder die miRNAs mit der kleinsten und größten Zahl als Indikator verwendet (Bhaskaran und Mohan 2014).

## 1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Mit Blick auf die durch Legionellen ausgelösten Krankheiten war das Ziel dieser Arbeit das Verständnis der zugrundeliegenden Bakterien-Wirts-Interaktion zu verbessern. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, welche Signalwege die Legionellen-Makrophagen Interaktion beeinflussen. Dazu sollte ein Screening-Verfahren entwickelt werden, das es erlaubt miRNAs und bioreaktive Substanzen zu ermitteln, die diese Infektion beeinflussen. Dabei wurde beabsichtigt dieses Verfahren möglichst automatisiert zu gestalten, so dass damit eine große Anzahl an Testsubstanzen untersucht werden kann. Dies bezog sich sowohl auf die Probenbearbeitung als auch auf die endgültige Messmethode, die über automatisierte Mikroskopie erfolgen sollte.

Durch Experimente mit miRNAs und bioreaktiven Substanzen sollten die Anforderungen, Prozessschritte und Limitationen eines solchen Screening-Verfahrens bestimmt werden. Darüber hinaus sollten, durch die weitere Untersuchung von positiv validierten Kandidaten, deren Wirkmechanismen aufgeklärt und deren Interaktionen im Infektionsgeschehen ermittelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Stimulanzen

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Stimulanzen

| Chemikalie  | Information | Hersteller   |
|---|-------------|--|
| (E)-2-((E)-4-phenoxybenzylidene)hydrazono-thiazolidin-4-on                                | OM152       | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| (S)-5-benzyl-3-methyl-2-thioxothiazolidin-4-on  | Schl38018   | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| 2-((4-chlorophenyl)amino)-1-(4-(5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-3-yl)piperazin-1-yl)ethan-1-on | EMS022      | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| 2-(N-Hexadecanoylamino)-4-nitrophenylphosphocholinhydroxid                                | HNP         | Biosynth Carbosynth Berkshire, UK                                      |
| 25-hydroxy Cholesterol  | 25-HC       | Cayman Chemical Company Ann Arbor, USA                                 |
| 2-Mercaptoethanol   |             | Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland                         |
| 3-(2-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-2-oxoethyl)-5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dion    | EMS056      | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid                                | MTT         | Sigma-Aldrich St. Louis, USA   |
| 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure  | HEPES       | Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland                         |
| 4.6-Diamin-2-Phenylindol  | DAPI        | ATT Bioquest Sunnyvale, USA  |
| 4-nitrobenzyl 4-((4-phenylpiperazin-1-yl)sulfonyl)piperazin-1-carbodithioat               | GR438       | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| 4-nitrobenzyl 4-(m-tolylsulfonyl)piperazin-1-carbodithioate                               | GR48        | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| 4-nitrobenzyl(4-(N,N-dimethylsulfamoyl)piperazin-1-yl)carbomodithioat                     | Schl37015   | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |
| 5-(5-(3-hydroxyphenyl)thiophen-2-yl)-1-(4-(methylsulfonyl)piperazin-1-yl)pentan-1-on      | Schl36050   | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie Marburg, Deutschland |

| <b>Chemikalie</b>                                 | <b>Information</b>              | <b>Hersteller</b>   |
|---|---------------------------------|---|
| 8-Brom-adenosin-3',5'-cyclophosphat Natriumsalz   |                                 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Acrylamid/Bisacrylamid                            | Rotiphorese® Gel 30<br>(37,5:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Agar Agar (Kobe I)                                |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Aktivkohle  |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Amitriptylin Hydrochlorid                         |                                 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Ammoniumperoxodisulfat                            | APS                             | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Benzotropine Mesylat                              |                                 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Bepriidil Hydrochlorid                            |                                 | Enzo Biochem Inc.<br>Farmingdale, USA                                     |
| B-HT 920  |                                 | Santa Cruz Biotechnology Inc.<br>Santa Cruz, USA                          |
| Bis(4-nitrobenzyl)benzoylcarbonohydrasonodithioat | Schl37020                       | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie<br>Marburg, Deutschland |
| Bortezomib  |                                 | Santa Cruz Biotechnology Inc.<br>Santa Cruz, USA                          |
| Bovines Serum Albumin Fraktion V                  | BSA, $\geq 98\%$                | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Chloroform  |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Deferoxamin Mesylatsalz                           |                                 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Dihydroergocristin Mesylatsalz                    |                                 | Santa Cruz Biotechnology Inc.<br>Santa Cruz, USA                          |
| Dimethylsulfoxid                                  | DMSO                            | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Eisen(III)-nitrat Nonahydrat                      |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Essigsäure  |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Ethanol   | $\geq 99,8\%$                   | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Ethylendiamintetraessigsäure                      | EDTA                            | Carl Roth GmbH & Co. KG   |



| <b>Chemikalie</b>         | <b>Information</b>              | <b>Hersteller</b>   |
|---------------------------|---------------------------------|---|
| Fluoxetin Hydrochlorid    |                                 | Karlsruhe, Deutschland<br>Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA |
| Flüssiger Stickstoff      |                                 | Linde plc<br>Düsseldorf, Deutschland                      |
| Forskolin                 |                                 | Cayman Chemical Company<br>Ann Arbor, USA                 |
| Fötale Kälber Serum (FCS) | FBS Superior                    | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA             |
| Gentamicin                |                                 | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA             |
| GlutaMAX                  |                                 | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA             |
| Glycerin                  |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| Glycin                    | PUFFERAN®<br>≥ 99 % p. a.       | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| GlycoBlue™                |                                 | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA             |
| H-89 Hydrochlorid         |                                 | Cayman Chemical Company<br>Ann Arbor, USA                 |
| Hefeextrakt               | pulv., für die<br>Bakteriologie | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| Iloperidon                |                                 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA                           |
| Isopropanol               | ROTIPURAN® ≥ 99,8<br>%, p. a.   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| Kanamycin Sulfat          |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| L-Cystein                 |                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| Lipofectamin 2000         |                                 | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA             |
| Lisurid                   |                                 | Bio-Techne Corp.<br>Minneapolis, USA                      |
| Leukotrien D4             |                                 | Santa Cruz Biotechnology Inc.<br>Santa Cruz, USA          |
| LY294002                  |                                 | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland                      |
| Methanol                  | ROTIPURAN®<br>≥ 99,9 %, p. a.   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland         |

| <b>Chemikalie</b>  | <b>Information</b>                        | <b>Hersteller</b>   |
|--|---|---|
| Methansulfonsäure  |   | Sigma-Aldrich St. Louis, USA  |
| Milchpulver  | blotting grade, fettarm                   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Mowiol 4-88  |   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure                                    | ACES                                      | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| N-(4-(N-benzylsulfamoyl)phenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide               | Schl38009                                 | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie<br>Marburg, Deutschland |
| N-(furan-2-carbonyl)-2-(2-(4-isopropylphenoxy)acetyl)hydrazin-1-carboxamid | LOL037                                    | AG Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie<br>Marburg, Deutschland |
| N-Acetyl-L-Cystein   |   | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Natriumacetat  |   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumazid  |   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumcarbonat  | ≥ 99,8 %, p.a.                            | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumchlorid   |   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumchlorid   | ≥ 99,8%                                   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumdihydrogenphosphat  | Monohydrat, ≥ 98 %, p.a.                  | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumdodecylsulfat   | SDS; Pellets, ≥ 99,9 %, für die Biochemie | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Natriumpyruvat   |   | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                             |
| Nifedipin  |   | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Nonidet P40  |   | AppliChem<br>Darmstadt, Deutschland                                       |
| Opti-MEM   | Ohne Phenolrot                            | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                             |
| Pam3CSK4   |   | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                             |
| Paraformaldehyd  |   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                         |

| <b>Chemikalie</b>                | <b>Information</b>   | <b>Hersteller</b>   |
|----------------------------------|--|---|
| Perhexiline Maleat               |  | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Phosphatgepufferte Salzlösung    | PBS  | GE Healthcare<br>Chalfont St. Giles, UK<br>Capricorn<br>Ebsdorfergrund, Deutschland |
| Proteaseinhibitor Cocktail (25x) | cOmplete™  | F. Hoffmann-La Roche AG<br>Basel, Schweiz   |
| Protein-Ladepuffer               | Lane Marker Reducing<br>Sample Buffer (5x<br>konzentriert) | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                                       |
| Ropinirol Hydrochlorid           |  | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| RPMI-1640 Medium                 |  | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                                       |
| Saponin                          |  | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                                   |
| siPORT™ NeoFX                    |  | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                                       |
| Sirolimus/Rapamycin              |  | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland  |
| Tergurid                         |  | Key Organics Ltd.<br>Camelford, UK  |
| Tetramethylethylendiamin         | TEMED; ≥ 99 %, p.a.  | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                                   |
| Trametinib 95%                   |  | Biomol GmbH<br>Hamburg, Deutschland   |
| Trichostatin A                   |  | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland  |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan   | TRIS   | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                                   |
| Triton-X 100                     |  | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                                   |
| Trizol                           | TRI Reagent®   | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA   |
| Tween-20                         |  | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland                                   |
| UP-Wasser                        | Ultra-pures Wasser,<br>steril                              | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland  |
| Viromer GREEN                    |  | Lipocalyx GmbH<br>Halle, Deutschland  |

| <b>Chemikalie</b>                  | <b>Information</b> | <b>Hersteller</b>                         |
|------------------------------------|--------------------|---|
| W-7 Hydrochlorid                   |                    | Cayman Chemical Company<br>Ann Arbor, USA |
| Wiskostatin                        |                    | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA           |
| Wortmannin                         |                    | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA           |
| Ziprasidon Hydrochlorid Monohydrat |                    | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA           |

## 2.1.2 Puffer und Medien

Tabelle 2.2: Gemischte Puffer und Medien

| <b>Puffer/Medium</b>          | <b>Herstellung</b>   |
|-------------------------------|--|
| 10x Laufpuffer (für SDS-PAGE) | 250 mM Tris 30,3 g<br>1,92 M Glycin 144 g<br>ad 1 L Aqua bidest  |
| 10x TBS-Puffer                | 10 mM Tris 12,1 g<br>0,9 % (w/v) NaCl 90 g<br>ad 1 L Aqua bidest<br>mit 37 % (v/v) HCl auf pH 7,4 einstellen |
| 10x Wet-Blot Puffer           | 250 mM Tris 30,3 g<br>1,92 M Glycin 144 g<br>ad 1 L Aqua bidest<br>mit 37 % (v/v) HCl auf pH 8,3 einstellen  |
| 1x Laufpuffer (für SDS-PAGE)  | 10x Laufpuffer 100 ml<br>0,1 % (w/v) SDS 1 g<br>ad 1 L VE-Wasser   |
| 1x TBS-T Puffer               | 10x TBS Puffer 500 ml<br>0,1 % (v/v) Tween-20 5 ml<br>ad 5 L VE-Wasser                                       |
| 1x Wet-Blot Puffer            | 10x Wet-Blot Puffer 200 ml<br>20 % (v/v) Methanol 400 ml<br>0,1 % (w/v) SDS 2 g<br>ad 2 L VE-Wasser          |
| Blockierungslösung            | 10 % (w/v) Milch in 1x TBS-T   |
| RIPA-Puffer                   | 10 mM Tris, pH 7,5<br>150 mM NaCl<br>1 % NP-40<br>1 % Desoxycholat   |

| <b>Puffer/Medium</b>                | <b>Herstellung</b>   |
|-------------------------------------|--|
| Polyacrylamid-Gel (10%ig)           | <p>1 mM EDTA</p> <p>Für ein Trenngel (10%)</p> <p>In ddH<sub>2</sub>O</p> <p>Tris-HCl pH 8,8 132 mM</p> <p>Acrylamid/Bisacrylamid 350 mM</p> <p>Glycerol 170 mM</p> <p>SDS 3,5 mM</p> <p>APS 2,2 mM</p> <p>TEMED 6,7 mM</p> <p>Für ein Sammelgel (5%)</p> <p>In ddH<sub>2</sub>O</p> <p>Tris-HCl pH 6,8 87,5 mM</p> <p>Acrylamid/Bisacrylamid 174 mM</p> <p>SDS 3,5 mM</p> <p>APS 2,2 mM</p> <p>TEMED 6,7 mM</p> |
| Verdünnungspuffer für ELISA         | 10 % FKS in 1x PBS   |
| Waschpuffer für ELISA               | 0,05 % Tween in 1x PBS   |
| Natrium-Azetat-Puffer 0,2 M, pH 5,6 | <p>1,64 g Natrium Azetat (82,03 g/mol)</p> <p>1,2 ml Essigsäure 100%</p> <p>pH einstellen und Auffüllen mit Wasser</p>   |
| HNP Reagenz 30mM                    | <p>25 mg HNP</p> <p>1447 µl Natrium Azetat Puffer</p>  |
| Natrium-Cholat 0,5 %                | <p>0,25 g Natrium-Cholat</p> <p>Auffüllen mit Wasser auf 50 ml</p>   |
| Glycin-NaOH-Puffer 0,2M, pH 11      | <p>0,8 g NaOH</p> <p>1,5 g Glycin</p> <p>pH einstellen und Auffüllen mit Wasser</p>  |
| Legionellen Flüssigmedium           | <p>10 g Aces</p> <p>10 g Hefepulver</p> <p>pH einstellen auf pH 6,9 und Auffüllen mit Wasser auf 1 L</p>   |
| BCYE-Agar                           | <p>10 g Aces</p> <p>10 g Hefepulver</p> <p>2,5 g Aktivkohle</p> <p>15 g Agar</p> <p>pH einstellen auf pH 6,9, auffüllen auf 1 L</p>  |

## 2.1.3 Primer

Tabelle 2.3: Verwendete qRT-PCR Primer

| <b>Ziel</b> | <b>Sequenz (5'→3')</b>                                       |
|-------------|--|
| AKT1        | Vor: GCACAAACGAGGGGAGTACA<br>Rück: TCACGTTGGTCCACATCCTG      |
| AKT2        | Vor: TTGCCAAGGATGAAGTCGCT<br>Rück: CCCGTTGGCATACTCCATCA      |
| APP         | Vor: CAAGAAAGCCGCTCAGATCC<br>Rück: TCATCCTGAATCTCCTCGGC      |
| ARNT        | Vor: GCCGGCAGAGAATTTTCAGGAATA<br>Rück: TTGGAGTGGCGGGAAATCTG  |
| ATM         | Vor: AGAGCTACAGAACGAAAGAAAGA<br>Rück: CTTGTTTGAATCTGAATGCCG  |
| CDK6        | Vor: TTCAGCTTCTCCGAGGTCTG<br>Rück: CCATCTGGAAACTATAGATGCCG   |
| E2F1        | Vor: GGAGCAAGAACCCTGTTGTC<br>Rück: ACATGCTCCAGGAGCGAGTC      |
| EZH2        | Vor: CTTCGAGCTCCTCTGAAGCA<br>Rück: CATTGAGGCTTCAGCACCAC      |
| HIF1A       | Vor: GACCGATTCACCATGGAGGG<br>Rück: GTGGCAACTGATGAGCAAGC      |
| HMGR        | Vor: TCTAGTGAGATCTGGAGGATCCAA<br>Rück: TGTCCCCACTATGACTTCCA  |
| IL1beta     | Vor: AGCTCGCCAGTGAAATGATGG<br>Rück: CAGGTCCTGGAAGGAGCACTTC   |
| IL-6        | Vor: AATTCGGTACATCCTCGACGG<br>Rück: TTGGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCT |
| IL-10       | Vor: GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG<br>Rück: TCACATGCGCCTTGATGTCTG  |
| LDLR        | Vor: ACGAGTTCCAGTGCCAAGAC<br>Rück: TGACAGACAAGCACGTCTCC      |
| MTOR        | Vor: AAGCCGCGCGAACCTC<br>Rück: TGGTTTCCTCATTCCGGCTC          |
| MX1         | Vor: GGGCTTTGGAATTCTGTGGC<br>Rück: CCTTGGAATGGTGGCTGGAT      |
| NF1         | Vor: GTCTTGCTGGGCAACCAAAG<br>Rück: GCTGCATGCTGGTTTCCTTC      |

| <b>Ziel</b> | <b>Sequenz (5'→3')</b>                                     |
|-------------|--|
| NOTCH1      | Vor: TGGACCAGATTGGGGAGTTC<br>Rück: GCACACTCGTCTGTGTTGAC    |
| RPS18       | Vor: GCGGCGGAAAATAGCCTTTG<br>Rück: GATCACACGTTCCACCTCATC   |
| S100A8      | Vor: AGACTGTAGCAACTCTGGCAG<br>Rück: TCCAGCTCGGTCAACATGATG  |
| TNF         | Vor: GCTGCACTTTGGAGTGATCG<br>Rück: TCACTCGGGGTTTCGAGAAGA   |
| TREM2       | Vor: TGCTCATCTTACTCTTTGTCAC<br>Rück: AGTGCTTCATGGAGTCATAGG |

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 2.4: Verwendete primäre Antikörper

| <b>Spezifität</b> | <b>Ursprung</b> | <b>Anhang</b> | <b>Nutzung</b> | <b>Hersteller</b>                                |
|-------------------|-----------------|---------------|----------------|--|
| β-Aktin           | Maus            | -             | 1:1000         | Santa Cruz Biotechnology Inc.<br>Santa Cruz, USA |
| GOLGA1            | Hase            | -             | 1:50           | Abcam PLC<br>Cambridge, England                  |
| mTOR              | Maus            | -             | 1:1000         | Cell Signaling Technology Inc.<br>Danvers, USA   |
| P70S6K            | Hase            | -             | 1:1000         | Cell Signaling Technology Inc.<br>Danvers, USA   |
| p-P70S6K (Thr389) | Hase            | -             | 1:1000         | Cell Signaling Technology Inc.<br>Danvers, USA   |

Tabelle 2.5: Verwendete sekundäre Antikörper

| <b>Spezifität</b> | <b>Ursprung</b> | <b>Anhang</b>   | <b>Nutzung</b> | <b>Hersteller</b>                                     |
|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|---|
| Anti-Hase         | Ziege           | Alexa Fluor 555 | 1:1000         | Invitrogen, Thermo Fisher scientific<br>Carlsbad, USA |
| Anti-Maus         | Ziege           | HRP             | 1:2000         | Santa Cruz Biotechnology Inc.<br>Santa Cruz, USA      |
| Anti-Hase         | Maus            | HRP             | 1:2000         | Cell Signaling Technology<br>Leiden, Niederlande      |

### 2.1.5 Kits

Tabelle 2.6: Verwendete Kits

| <b>Kit</b>  | <b>Hersteller</b>                             |
|---|---|
| ECL™ Prime Western Blotting System                      | GE Healthcare<br>Chalfont St. Giles, UK       |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH)                        | F. Hoffmann-La Roche AG<br>Basel, Schweiz     |
| Fast SYBR® Green Master Mix                             | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA |
| Guava easy Check Kit                                    | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland          |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit            | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA |
| Luna® Universal qPCR Master Mix                         | New England Biolabs<br>Ipswich, USA           |
| MISSION® microRNA Mimic <i>Library</i> ;<br>miRBase v21 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA               |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit                           | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA |
| TaqMan® Fast Advanced Master Mix                        | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA |
| TaqMan™ microRNA Kit zur reversen<br>Transkription      | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA |

### 2.1.6 Zelllinie und Bakterienstämme

Tabelle 2.7: Verwendete Zelllinie

| <b>Zelllinie</b> | <b>Herkunft</b> |
|------------------|-----------------|
| THP-1            | ATCC® TIB-202™  |

Tabelle 2.8: Verwendete Bakterienstämme

| <b>Bakterienstamm</b>                                    | <b>Herkunft</b>                        |
|--|--|
| <i>Legionella pneumophila</i> (Corby) wt (#20)           | Robert Koch Institut (Berlin, Germany) |
| <i>Legionella pneumophila</i> (Corby) gfp (#69)          | Robert Koch Institut (Berlin, Germany) |
| <i>Legionella pneumophila</i> (Corby) $\Delta$ dotA (#8) | Robert Koch Institut (Berlin, Germany) |



## 2.1.7 Weitere Materialien

Tabelle 2.9: Verwendete MISSION® microRNA Mimics

| Produkt                                   | Sequenz bzw. Produktcode            | Hersteller                               |
|---|-------------------------------------|--|
| hsa-miR-101-3p                            | UACAGUACUGUGAUAAACUGAA<br>HMI0026   | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| hsa-miR-106a-5p                           | AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG<br>HMI0037  | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| hsa-miR-107                               | AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA<br>HMI0041  | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| hsa-miR-125a-5p                           | UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA<br>HMI0110 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| hsa-miR-144                               | UACAGUAUAGAUGAUGUACU<br>HMI0223     | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| hsa-miR-187                               | UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG<br>HMI0288   | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| miRNA Negativkontrolle 1                  | GGUUCGUACGUACACUGUUCA<br>HMC0002    | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| miRNA Negativkontrolle 2                  | CGGUACGAUCGCGGCGGGUAUAUC<br>HMC0003 | Sigma-Aldrich<br>St. Louis, USA          |
| Cy3 gelabelte miRNA<br>Negativkontrolle 1 | AM17120                             | Thermo Fisher scientific<br>Waltham, USA |

Tabelle 2.10: Verwendete TaqMan Sonden und Primer

| Spezifität      | Sequenz  | ID     | Hersteller                               |
|-----------------|--|--------|--|
| hsa-miR-101-3p  | UACAGUACUGUGAUAAACUGAA   | 002253 | Thermo Fisher scientific<br>Waltham, USA |
| hsa-miR-106a-5p | AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG  | 002169 | Thermo Fisher scientific<br>Waltham, USA |
| hsa-miR-107-3p  | AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA  | 000443 | Thermo Fisher scientific<br>Waltham, USA |
| RNU48           | GAUGACCCAGGUAACUCUGAGU<br>GUGUCGCUGAUGCCAUCACCGCA<br>GCGCUCUGACC | 001006 | Thermo Fisher scientific<br>Waltham, USA |

Tabelle 2.11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| <b>Produkt</b>                           | <b>Hersteller</b>  |
|--|--|
| Adhesive Microplate Seal (600258)        | Biozym Scientific GmbH<br>Hessisch Oldendorf, Deutschland                                  |
| Deckgläschen                             | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA  |
| Filter für Sterilfiltration              | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland   |
| Impföse                                  | VWR International LLC<br>Radnor, USA   |
| Küvetten, Polystyrol                     | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland   |
| Mikrotiterplatten 6/12/24/96-Well        | Greiner Bio-One GmbH<br>Frickenhausen, Deutschland   |
| Mikrotiterplatten 96-Well für LDH-Assay  | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland   |
| Nitril-Handschuhe                        | Semperit AG<br>Wien, Österreich  |
| Nitrozellulose Membran                   | GE Healthcare<br>Chalfont St. Giles, UK  |
| Objektträger                             | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA  |
| optische Klebefolie                      | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA  |
| Parafilm                                 | VWR International LLC<br>Radnor, USA   |
| Pasteurpipette                           | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG<br>Sondheim, Deutschland                          |
| Pipettenspitzen 10 µl – 1 ml             | Gilson Inc.<br>Middleton, USA<br>Biozym Scientific GmbH<br>Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Pipettenspitzen Combitips 0,5 ml – 10 ml | Eppendorf SE<br>Hamburg, Deutschland   |
| qPCR-Mikrotiterplatte, 0,1 ml            | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA  |
| Reagiergefäß (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)        | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland   |
| Röhrchen, 14 ml, für Bakterienaufzucht   | Greiner Bio-One GmbH<br>Frickenhausen, Deutschland   |

| <b>Produkt</b>                             | <b>Hersteller</b>                                  |
|--|--|
| Schraubröhre, 15/50 ml                     | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland     |
| Sensoplate Plus Mikroskopieplatte (655891) | Greiner Bio-One GmbH,<br>Kremsmünster, Österreich  |
| Serologische Pipetten                      | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland     |
| Skalpell                                   | B. Braun Melsungen AG<br>Melsungen, Deutschland    |
| Wattestäbchen                              | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Karlsruhe, Deutschland  |
| Wischtuch für Mikroskopie                  | Kimberly-Clark AG<br>Dallas, USA                   |
| Zählkammer                                 | Bio-Rad Laboratories Inc.<br>Hercules, USA         |
| Zellkulturflaschen, T25/ T75/T175          | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland     |
| Zellkulturschalen                          | Greiner Bio-One GmbH<br>Frickenhausen, Deutschland |
| Zellschaber                                | Sarstedt AG & Co. KG<br>Nümbrecht, Deutschland     |

## 2.1.8 Geräte

Tabelle 2.12: Verwendete Geräte

| <b>Gerätetyp</b>            | <b>Bezeichnung</b>             | <b>Hersteller</b>  |
|-----------------------------|--------------------------------|--|
| Absaugpumpe                 | Vacusaft                       | INTEGRA Biosciences AG<br>Zizers, Schweiz<br>LC BioTech (DITABIS AG)<br>Pforzheim, Deutschland |
| Autoklav                    | Varioklav®                     | HP Medizintechnik GmbH<br>Oberschleißheim, Deutschland   |
| Automatisches Zellzählgerät | TC-10TM Automated Cell Counter | Bio-Rad Laboratories Inc.<br>Hercules, USA   |
| Brutschrank                 | HERACELL 240i                  | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA  |
| Durchflusszytometer         | guava easy cyte 5HT            | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland   |
| Elektrische Pipettierhilfe  | accu-jet pro                   | BRAND GmbH & Co. KG<br>Wertheim, Deutschland   |

| <b>Gerätetyp</b>            | <b>Bezeichnung</b>                             | <b>Hersteller</b>   |
|-----------------------------|--|---|
| Gefrierschrank              | -80 °C Ultra low VIP-Series                    | Sanyo Denki K.K.<br>Moriguchi, Japan                                |
| Geldokumentationssystem     | Gel-x Imager                                   | INTAS Science Imaging<br>Instruments GmbH<br>Göttingen, Deutschland |
| Heizblock                   | Thermomixer comfort                            | Eppendorf SE<br>Hamburg, Deutschland                                |
|                             | Thermomixer pro                                | CellMedia GmbH & Co. KG<br>Zeitz, Deutschland                       |
| Kryotank                    | CryoPlus™                                      | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA                       |
| Kühl-/Gefrierschrank        | +4 °C/-20 °C                                   | Liebherr-International S.A.<br>Bulle, Schweiz                       |
| Lumineszenzdetektionssystem | ChemoCam Imager 3.2                            | INTAS Science Imaging<br>Instruments GmbH<br>Göttingen, Deutschland |
| Mikropipetten               | 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl,<br>10 µl, 2 µl | Gilson Inc.<br>Middleton, USA                                       |
| Mikroskope                  | AXIO Vert a1; PrimoVert                        | Carl Zeiss AG<br>Oberkochen, Deutschland                            |
| Photometer                  | Infinite® M200 PRO                             | TECAN Group AG<br>Männedorf, Schweiz                                |
|                             | Ultrospec 10                                   | GE Healthcare<br>Chalfont St. Giles, UK                             |
| Präzisionswaage             | EMB 600-2                                      | Kern & Sohn GmbH<br>Balingen, Deutschland                           |
| Reagenzschüttler            | Vortex-GENIE 2                                 | Scientific Industries Inc.<br>Bohemia, USA                          |
|                             | Vortex-V-1 plus                                | PeqLab Biotechnologie GmbH<br>Erlangen, Deutschland                 |
| Real Time PCR System        | QuantStudio 3                                  | Applied Biosystems<br>Waltham, USA                                  |
|                             | ViiA 7   | Applied Biosystems<br>Waltham, USA                                  |
| Rollenmischer               | Roller mixer SRT6D                             | Cole-Parmer GmbH<br>Wertheim, Deutschland                           |
| Spannungsquelle             | peqPOWER E300                                  | PeqLab Biotechnologie GmbH<br>Erlangen, Deutschland                 |

| <b>Gerätetyp</b>   | <b>Bezeichnung</b>                     | <b>Hersteller</b>                                   |
|--------------------|--|---|
| Spektrometer       | NANODROP 2000c                         | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA       |
| Sterilwerkbank     | SAFE 2020                              | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA       |
| Thermocycler       | peqSTAR 2x Gradient                    | PeqLab Biotechnologie GmbH<br>Erlangen, Deutschland |
| Ultraschallgerät   | Bioruptor® Plus                        | Diagenode Inc.<br>Denville, USA                     |
| Wasserbad          |  | LAUDA-GFL GmbH<br>Burgwedel, Deutschland            |
| Wet-Blot-Apparatur | PerfectBlue™ Elektrobloetter<br>Web™ S | PeqLab Biotechnologie GmbH<br>Erlangen, Deutschland |
| Zentrifugen        | Multifuge X3R                          | Heraeus GmbH<br>Hanau, Deutschland                  |
|                    | Centrifuge 5430 R                      | Eppendorf SE<br>Hamburg, Deutschland                |
|                    | Centrifuge 5424 R                      | Eppendorf SE<br>Hamburg, Deutschland                |
|                    | FRESCO 17                              | Heraeus GmbH<br>Hanau, Deutschland                  |

## 2.1.9 Software

Tabelle 2.13: Verwendete Software

| <b>Name</b>                | <b>Hersteller</b>                                |
|----------------------------|--|
| Chemdraw v14.0.0.117       | PerkinElmer Inc.<br>Waltham, USA                 |
| Fiji / ImageJ 1.53b        | Open Source                                      |
| FlowJo® 7.6.5              | FlowJo, LLC<br>Ashland, USA                      |
| GraphPad Prism 6           | GraphPad Software Inc.<br>San Diego, USA         |
| Ingenuity pathway analysis | Qiagen N.V.<br>Venio, Niederlande                |
| LabImage 1D                | Kapelan Bio-Imaging GmbH<br>Leipzig, Deutschland |
| Microsoft Office           | Microsoft Corp.<br>Redmond, USA                  |

| <b>Name</b>                             | <b>Hersteller</b>                             |
|---|---|
| QuantStudio® Design & Analysis Software | Thermo Fisher Scientific Inc.<br>Waltham, USA |
| R 3.4.2                                 | R Core Team                                   |
| RStudio 1.1.383                         | RStudio Inc.<br>Boston, USA                   |
| ViiA7 RUO v1.2                          | Applied Biosystems<br>Waltham, USA            |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von THP-1 Zellen

Bei THP-1 Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie. Sie stammen aus einem einjährigen männlichen Leukämiepatienten und sind als Modell für menschliche Monozyten etabliert (Tsuchiya, Yamabe et al. 1980). Die verwendete Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) erworben.

Zellen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Inkulturnahme in einem Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt, einmal mit RPMI Medium gewaschen und anschließend bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Zellen wurden als Suspension in RPMI Medium mit  $10\%$  fetalem Kälberserum (FCS),  $1\%$  Natriumpyruvat und  $1\%$  GlutaMax kultiviert. Gehalten wurden die Zellen bei einer Konzentration von 2 bis  $10 \times 10^5$  Zellen pro ml in T175 Zellkulturflaschen. Gelagert wurden die Flaschen unter Gasaustausch bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Die Zellen wurden regelmäßig mit dem entsprechenden Medium verdünnt um eine zu hohe Zelldichte von über  $1 \times 10^6/\text{ml}$  zu vermeiden, wobei die Anzahl an Verdünnungen (Passagen) maximal 15 betrug.

Verwendet wurden die THP-1 Zellen in der Regel im differenzierten Zustand, bei dem sie Makrophagen ähneln. Zur Differenzierung wurde  $20\text{ nM}$  Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für  $24\text{ h}$  zu den Zellen gegeben. Durch diesen Stimulus werden THP-1 Zellen adhärent, verändern ihre Morphologie und teilen sich nicht weiter (Eto, Tsuji et al. 1987, Auwerx, Deeb et al. 1988).

### 2.2.2 Transfektion von THP-1 Zellen mit miRNAs

Zur Transfektion von THP-1 Zellen wurden zwei Transfektionsreagenzien verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von siPORT Neo FX auf Viromer Green gewechselt.

Für die Transfektion von 1 ml wurde für siPORT Neo FX eine Mischung aus 5 µl siPORT Neo FX und 45 µl Opti-MEM zu 1 µl miRNA (50 µM) gemischt mit 49 µl Opti-MEM gegeben und 20 min inkubiert. Anschließend wurden 900 µl Zellsuspension zu 100 µl des gemischten Reaktionsansatzes gegeben. Die Endkonzentration an THP-1 Zellen betrug  $4 \times 10^5$  Zellen je ml und die der transfizierten miRNAs, falls nicht anders erwähnt, 50 nM.

Für eine Transfektion mit Viromer Green wurde 1 µl Viromer Green mit 89 µl Viromer Puffer gemischt und zu einer Mischung aus 1 µl miRNA (50 µM) und 9 µl Opti-MEM gegeben. Auch hier wurden anschließend 900 µl Zellsuspension der gleichen Konzentration zugegeben.

Zu den Transfektionsansätzen wurde nach 24 h PMA zum Differenzieren der THP-1 Zellen gegeben (siehe 2.2.1). Nach weiteren 24 h wurden das Medium erneuert und die Zellen für Experimente verwendet. Um eine erfolgreiche Transfektion der miRNAs zu gewährleisten wurde RNA aus den Zellen isoliert (Kapitel 2.2.11) und die relative Menge der jeweiligen miRNA mittels RT-qPCR (Kapitel 2.2.12) gemessen.

### 2.2.3 Anzucht von *Legionella pneumophila* Kulturen

Experimente, in denen Legionellen zur Infektion von differenzierten THP-1 Zellen verwendet wurden sind, wurden, falls möglich, mit dem GFP exprimierenden *Legionella pneumophila* Stamm Corby durchgeführt. In den Fällen in denen das GFP Signal Experimente erschwert hätte, zum Beispiel bei ausgewählten Immunfluoreszenz-Mikroskopie Anwendungen, wurde der Wildtyp verwendet. In diesen Fällen wird explizit auf die Verwendung von nicht-GFP exprimierenden Legionellen hingewiesen.

Die Bakterien wurden aus einer eingefrorenen Glycerinkultur auf einer BCYE-Agarplatte ausgestrichen und für zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Diese Vorkultur wurde bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert und wurde für die Erstellung einer Infektionskultur wiederum neu auf einer BCYE-Agarplatte ausgestrichen und für drei weitere Tage bei 37 °C inkubiert. Für die Kultivierung des GFP exprimierenden Stammes sowie der ΔdotA Mutante wurden BCYE-Agarplatten mit 20 µg/ml Kanamycin verwendet.

### 2.2.4 Stimulation von THP-1 Zellen

Neben der Stimulation mit PMA zur Differenzierung der THP-1 Zellen wurde weitere Stimulanzen im Rahmen eines Screenings verwendet. Bei diesen Experimenten wurde das Medium 24 h nach Zugabe von PMA erneuert und die weitere Differenzierung gestoppt. Die Stimulanzen wurden ein bis zwei Stunden vor Infektion mit *L. pneumophila* in entsprechender Konzentration zugegeben und befanden sich während der gesamten Infektionsdauer im Medium.

### 2.2.5 Infektion von THP-1 Zellen mit *Legionella pneumophila*

Für eine Infektion mit *L. pneumophila* wurden nur differenzierte THP-1 Zellen verwendet. Sollte das Medium der Zellen nicht zuvor gewechselt worden sein (z.B. durch Zugabe weiterer Stimulanzen (siehe 2.2.4) wurde das Medium an diesem Punkt erneuert. Anschließend wurden für die Infektion die Bakterien von der Infektionskultur mit einem sterilen Wattestäbchen aufgenommen und eine Verdünnung mit PBS auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von  $3 \times 10^9$  Zellen je ml (Kozak, Lucas et al. 2013). Diese Verdünnung wurde mit RPMI 1640 Medium inkl. Zusätzen mittels serieller Verdünnungen auf die benötigte Konzentration eingestellt und entsprechende Mengen zu THP-1 Zellen gegeben. Die Menge der zugegebenen Legionellen wurde über die geplante Multiplizität der Infektion (MOI), also dem Verhältnis zwischen THP-1 Zellen und Legionellen, der jeweiligen Experimente ermittelt. Um eine gleichmäßigere Infektion zu erreichen, wurden die Mikrotiterplatten für 10 min bei 500 g zentrifugiert, bevor sie in den Inkubator gestellt wurden.

Um die real benutzte MOI zu bestimmen wurde die eingesetzte Legionellensuspension zwei Mal separat verdünnt und je 50 µl auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Koloniebildenden Einheiten (engl.: *colony forming units*; CFUs) gezählt und auf die verwendete MOI zurückgerechnet (CFUs/ml = gezählte Kolonien x Verdünnungsfaktor).

### 2.2.6 Fixierung und Färbung von THP-1 Zellen

Um infizierte THP-1 Zellen mit Unterscheidung der gesamten Zellfläche, des Zellkerns und der Legionellenvakuolen mikroskopisch untersuchen zu können, mussten mit GFP-exprimierenden Legionellen infizierte THP-1 Zellen fixiert und gefärbt werden. Dabei erfolgte die Fixierung über 4 % Paraformaldehyd (PFA), die Permeabilisierung über eine 0,1 % Triton X-100 Lösung, das Anfärben der gesamten Zellfläche über 2 µg/ml CellMask Red und das Färben des Zellkerns über 2 µg/ml Höchst 33342.



Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen, um extrazelluläre Legionellen zu entfernen. Je Well einer 96 Well Mikrotiterplatte wurden 300 µl einer 4 % PFA Lösung in PBS zugegeben und für 15 min inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit PBS wurden 150 µl einer 0,1 % Triton X-100 Lösung zugegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit PBS gewaschen und schließlich 100 µl einer Färbelösung aus 2 µg/ml Höchst 33342 und 2 µg/ml CellMask Red zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min unter Lichtausschluss wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen schließlich in 100 µl PBS aufgenommen. Mikrotiterplatten wurden trotz fixierter Zellen mit einer Plastikfolie luftdicht verklebt um potentielle Kontaminationen und Austrocknung zu verhindern.

### 2.2.7 CFU-Assay

Der Kolonie bildende Einheiten (CFU-) Assay wurde benutzt um Veränderungen der Replikation oder Infektionsgeschwindigkeit von *L. pneumophila* zu bestimmen. Dazu wurden zuvor transfizierte oder nach Differenzierung stimulierte THP-1 Zellen mit Legionellen bei einer MOI von 0,5 infiziert und für Zeiträume zwischen 16 h und 72 h inkubiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten nach Infektion wurden die Makrophagen mittels Saponinlösung (1 % Endkonzentration, 10 min, 37 °C) lysiert, wobei die Wirksamkeit über Mikroskopie kontrolliert wurde. Die Lysate wurden von den Mikrotiterplatten in Reagiergefäße transferiert und seriell mit PBS verdünnt. Die Verdünnungen wurden auf BCYE-Agarplatten ausgestrichen und die vereinzelt Kolonien nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ausgezählt. Um Schwankungen des Assays auszugleichen wurde zum einen jeweils mit technischen Triplikaten gearbeitet deren Ergebnisse zusammengefasst wurden, als auch biologische Replikate erstellt.

### 2.2.8 Bakterielle Wachstumskurven

Bakterielle Wachstumskurven wurden genutzt um den Einfluss von Chemikalien bzw. unterschiedlicher Konzentrationen derer auf das Wachstum von *L. pneumophila* in Flüssigkultur zu bestimmen. Dazu wurde der GFP exprimierende Legionellenstamm von einer Vorkulturplatte abgenommen und in Legionellenmedium mit 20 µg/ml Kanamycin resuspendiert. Die OD<sub>600</sub> wurde auf 0,05 eingestellt und zwei Kulturröhrchen der Suspension über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase (~ OD<sub>600</sub> 0,6) verwendet. Zu testende Substanzen wurden entsprechend in Medium verdünnt und 7,5 µl Substanzverdünnung mit Zellsuspension (verdünnt auf OD<sub>600</sub> 0,03) auf 150 µl aufgefüllt. Als Kontrollen dienen 10 µg/ml Gentamicin

(kein Wachstum), entsprechend verdünntes DMSO als Lösungsmittelkontrolle, unbehandelte Bakterien, und Medium ohne Zugabe von Legionellen.

Der Rand einer 96 Well Mikrotiterplatte wurde mit Wasser aufgefüllt und die Proben in mindestens Triplikaten mittig aufgetragen, wobei sich keine leeren Wells auf der Platte befanden. Die Platte wurde mit Klebeband seitlich abgedichtet um Verschiebungen des Deckels zu vermeiden und für 36 h in einem Plattenleser bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dabei regelmäßig geschüttelt und jedes Well nach jeweils 30 min bei OD<sub>600</sub> gemessen. Die Ergebnisse der Replikate wurden gemittelt und als Graph dargestellt.

### 2.2.9 Messen der Zellvitalität mittels Laktatdehydrogenase Assay

Um zu bestimmen ob Stimulanzen oder unerwartete Umgebungseinflüsse die Vitalität der verwendeten THP-1 Zellen beeinflusst haben wurde diese mit einem Laktatdehydrogenase (LDH) Assay gemessen. Dazu wurde der Überstand des Mediums abgenommen und bei 10.000 g für 5 min zentrifugiert. Als Referenz diente eine Totallyse bei der alle Zellen durch Zugabe von 10 % Triton X-100 (1 % Endkonzentration) lysiert wurden. Außerdem wurde Medium mit FCS und ohne FCS verwendet um den Hintergrund bzw. den Effekt des FCS im Medium zu bestimmen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand 1:5 mit Medium ohne FCS verdünnt und 50 µl jeder Probe in Duplikaten in eine 96 Well Platte gegeben.

Zu den Proben wurde jeweils 50 µl der Reagenzmischung des Cytotoxicity Detection Kits gegeben. Diese wurde zuvor aus 1,25 µl Reagenz 1 und 56,25 µl Reagenz 2 erstellt. Die Platte wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 493 nm gemessen. Als Referenz wurde zusätzlich bei 660 nm gemessen. Die Messwerte des Mediums mit FCS wurden als Hintergrund abgezogen und die korrigierten Werte der Proben relativ zur Totallyse analysiert.

### 2.2.10 Messen der Zellvitalität mittels MTT Assay

Neben dem LDH Assay wurde auch der MTT Assay zur Bestimmung der Zellvitalität verwendet. Er basiert auf der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem Formazansalz (Mosmann 1983). Diese Umsetzung ist von der Aktivität bzw. der Menge an mitochondrialer Reduktase abhängig und entspricht in der Regel der Anzahl an lebenden Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.

Für den Assay wurden  $5 \times 10^4$  THP-1 Zellen in 100 µl je Well in einer 96 Well Platte differenziert (siehe 2.2.1). Nach 24 h wurde das Medium erneuert und die zu testenden

Stimulanzen für einen entsprechenden Zeitraum zugegeben. Zu dem Zeitpunkt an dem die Vitalität geprüft werden sollte, wurden 10 µl MTT-Reagenz mit 5 mg/ml in H<sub>2</sub>O zugegeben und die Platte 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Überstand jedes Wells abgenommen, die sich am Boden gebildeten Kristalle einmal mit PBS gewaschen, und danach 200 µl einer 1:1 Mischung aus DMSO und Ethanol zugegeben. Die Platte wurde für 15 min geschüttelt um ungelöste Kristalle zu vermeiden und wurde anschließend bei 600 nm gemessen. Die Ergebnisse der stimulierten THP-1 Zellen wurden mit denen von unbehandelten Zellen verglichen und relativ dazu analysiert.

### 2.2.11 RNA Isolierung

RNA wurde über die Guanidin-Thiozyanat-Methode isoliert (Chomeczynski und Sacchi 1987). Dazu wurde das Medium von THP-1 Zellen abgenommen und 500 µl TRI Reagent je Well einer 12 Well Platte zugegeben und 5 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und 100 µl Chloroform zugegeben. Die Mischung wurde für 15 s gevortext, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Probe anschließend für 15 min bei 4 °C bei 15.000 g zentrifugiert. Dadurch trennten sich die organische und wässrige Phase, welche im Anschluss abgenommen und in ein neues Gefäß transferiert wurde. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und 1 µl GlycoBlue präzipitierte die RNA bei -20 °C über Nacht und war anschließend sichtbar. Die präzipitierte RNA wurde bei 15.000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde zwei Mal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet bei 30 °C getrocknet und anschließend in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Proben wurden für 5 min bei 58 °C inkubiert und daraufhin auf Eis gelagert.

Um RNA Konzentrationen zu bestimmen und potentielle Kontaminationen durch Proteine oder Lösungsmittel zu detektieren wurden RNA Proben mit einem Nanodrop Gerät gemessen. Die Langzeitlagerung von RNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.12 Reverse Transkription und quantitative PCR (qPCR)

Um Unterschiede in der Expression von mRNAs oder miRNAs zu bestimmen wurde die quantitative PCR (qPCR) verwendet. Diese Methode beruht darauf, dass die entsprechende Probe zuvor durch eine reverse Transkription (RT) zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Diese cDNA wird im Anschluss durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und währenddessen die Menge der doppelsträngigen DNA-Moleküle bestimmt.

Da in dieser Arbeit qPCRs von mRNAs und miRNAs angefertigt wurden und die sich die Protokolle dieser beiden RNA Spezies unterschieden, werden im Folgenden die Protokolle getrennt beschrieben.

### 2.2.12.1 Reverse Transkription und qPCR von mRNAs

Zuvor isolierte RNA (siehe 2.2.11) wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zu cDNA umgeschrieben. Dabei wurde standardmäßig 500 – 1000 ng RNA je Probe verwendet, die mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt wurden. Der RT-Ansatz war für ein Endvolumen von 20 µl, wie in Tabelle 2.14 beschrieben, ausgelegt.

Tabelle 2.14: Mastermix für RT von mRNAs

| Komponente                                | Volumen je Ansatz |
|---|-------------------|
| Wasser                                    | 4,2 µl            |
| 10x RT Puffer                             | 2 µl              |
| 10x Random Primer                         | 0,8 µl            |
| 100 mM dNTPs                              | 2 µl              |
| 50 U/µl Multiscribe reverse Transkriptase | 1 µl              |
| RNA (500 – 1000 ng) aufgefüllt mit Wasser | 10 µl             |

Für oben genannten Ansatz wurde das in Tabelle 2.15 beschriebene Temperaturprogramm angewendet.

Tabelle 2.15: Temperaturprogramm RT von mRNAs

| Schritt              | Temperatur | Dauer  |
|----------------------|------------|--------|
| Primerhybridisierung | 25 °C      | 10 min |
| Elongation           | 37 °C      | 2 h    |
| Enzyminaktivierung   | 85 °C      | 5 min  |
| Lagerung             | 4 °C       | halten |

Die dadurch erhaltene cDNA wurde im Anschluss durch Zugabe von 80 µl Wasser 1:5 verdünnt. Tabelle 2.16 beschreibt den für die folgende qPCR benötigten Ansatz. Dabei wurden die 18,5 µl Mastermix vorgelegt und 1,5 µl der jeweiligen cDNA Probe zugegeben. Dabei wurde je Probe mit Triplikaten gearbeitet. Wasser diente als Negativkontrolle. Nach Versiegeln der PCR Mikrotiterplatte mit einer entsprechenden Abdeckfolie wurde das in Tabelle 2.17 beschriebene Programm auf einem qPCR Gerät ausgeführt (ViiA7 bzw. QuantStudio 3).

Tabelle 2.16: Mastermix für qPCR von mRNAs

| Komponente  | Volumen für 1 Ansatz |
|---|----------------------|
| 2x FAST SYBR Green Master Mix oder Luna Universal qPCR Master Mix | 10 µl                |
| 10 µM Primer vorwärts   | 0,4 µl               |
| 10 µM Primer rückwärts  | 0,4 µl               |
| Wasser  | 7,7 µl               |
| cDNA  | 1,5 µl               |

Tabelle 2.17: Temperaturprogramm qPCR mRNAs

| Schritt             | Temperatur | Dauer              | Wiederholung |
|---------------------|------------|--------------------|--------------|
| Denaturierung       | 95 °C      | 20 s               | 40 Zyklen    |
| Elongation          | 60 °C      | 20 s               |              |
| Denaturierung       | 95 °C      | 15 s               |              |
| Beginn Schmelzkurve | 60 °C      | 60 s               |              |
| Schmelzkurve        | 60 – 95 °C | 0,05 °C/s steigend |              |
| Ende Schmelzkurve   | 95 °C      |                    |              |

Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Proben muss ein Schwellenwert (cycle threshold: Ct) festgelegt werden. Die dadurch erhaltene Zahl gibt die Nummer der nötigen Wiederholungen an Elongations-/Denaturierungsschritten an, bis das Signal der amplifizierten DNA den gegebenen Schwellenwert erreicht. Dieser Wert wurde durch die jeweilige Software der Geräte automatisch bestimmt und wurde nicht manuell festgelegt.

Als endogene Kontrolle für Expressionsanalysen von mRNAs diente die mRNA des ribosomalen Proteins S18 (RPS18), einem Teil der 40S Untereinheit des Ribosoms. Als Auswertemethode wurde die von Livak et al. beschriebene  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001).

### 2.2.12.2 RT und qPCR von miRNAs

Aufgrund der geringen Länge von 20-23 Nukleotiden können miRNAs nicht wie die längeren mRNAs über übliche Protokolle revers transkribiert und in qPCRs analysiert werden. Aus diesem Grund wurden entsprechende TaqMan microRNA Kits zur RT verwendet. Dabei entstehen durch sogenannte stem-loop Primer längere Fragmente die anschließend in einer qPCR mit angepassten Sonden relativ gemessen werden können. Die miRNA spezifischen RT-Primer wurden zusammen mit einem RT-Primer für die endogene Kontrolle RNU48 eingesetzt

(Wong, Lee et al. 2007). 500-1000 ng RNA wurden mit Wasser auf 4  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend 11  $\mu$ l Mastermix zugegeben. Der Ansatz zum Umschreiben zu cDNA ist in Tabelle 2.18 gezeigt.

Tabelle 2.18: Mastermix für RT von miRNAs

| <b>Komponente</b>                               | <b>Volumen für 1 Ansatz</b> |
|---|-----------------------------|
| 10x RT Puffer                                   | 1,5 $\mu$ l                 |
| 100 mM dNTPs                                    | 0,3 $\mu$ l                 |
| RNase Inhibitor                                 | 0,2 $\mu$ l                 |
| Primerpool (0,05x je miRNA; max. 4 miRNAs)      | 6 $\mu$ l                   |
| 50 U/ $\mu$ l Multiscribe reverse Transkriptase | 3 $\mu$ l                   |
| RNA (500-1000 ng)                               | 4 $\mu$ l                   |

Für oben genannten Ansatz wurde das in Tabelle 2.19 beschriebene Temperaturprogramm angewendet.

Tabelle 2.19: Temperaturprogramm RT von miRNAs

| <b>Schritt</b>       | <b>Temperatur</b> | <b>Dauer</b> |
|----------------------|-------------------|--------------|
| Primerhybridisierung | 16 °C             | 30 min       |
| Elongation           | 42 °C             | 30 min       |
| Enzymaktivierung     | 85 °C             | 5 min        |
| Lagerung             | 4 °C              | halten       |

Zu der erhaltenen cDNA wurden 5  $\mu$ l Wasser gegeben. Tabelle 2.20 beschreibt den für die folgende qPCR benötigten Ansatz. Dabei wurden die 18,5  $\mu$ l Mastermix vorgelegt und 1,5  $\mu$ l der jeweiligen cDNA Probe zugegeben. Dabei wurde je Probe mit Triplikaten gearbeitet. Wasser diente als Negativkontrolle. Für miRNAs wurde das in Tabelle 2.21 beschriebene Programm auf einem qPCR Gerät ausgeführt. Tabelle 2.20: Mastermix für qPCR von miRNAs

| <b>Komponente</b>                  | <b>Volumen für 1 Ansatz</b> |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 2x TaqMan Fast Advanced Master Mix | 10 $\mu$ l                  |
| TaqMan Primer                      | 1 $\mu$ l                   |
| Wasser                             | 7,5 $\mu$ l                 |
| cDNA                               | 1,5 $\mu$ l                 |

Tabelle 2.21: Temperaturprogramm qPCR miRNAs

| Schritt       | Temperatur | Dauer | Wiederholung |
|---------------|------------|-------|--------------|
| Denaturierung | 95 °C      | 20 s  | 40 Zyklen    |
| Elongation    | 60 °C      | 20 s  |              |
| Denaturierung | 95 °C      | 15 s  |              |

Die Auswertung der qPCR Daten erfolgte wie bei mRNAs über einen automatisch gesetzten Ct Wert und der  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  Methode.

### 2.2.13 Proteinisolierung

Nach entsprechender Inkubationszeit und vorangegangener Behandlung von THP-1 Zellen wurden diese einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in RIPA Puffer lysiert. Zellreste wurden abgeschabt, die Suspension 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt.

### 2.2.14 Bestimmung einer Proteinkonzentration mittels BCA-Methode

Proteinkonzentrationen von zuvor sonifizierten Zellsuspensionen wurden mit der Bicinchoninsäure Methode (*engl.* bicinchoninic acid, BCA) ermittelt. Dazu wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet, wobei alle Schritte nach Herstellerangaben erfolgten. Die Messung wurde im Anschluss mit einem Tecan Infinite M200 PRO Plattenleser bei 595 nm durchgeführt. Dabei wurden die Signale der Proben mit denen einer Standardkurve verglichen und dadurch die jeweiligen Konzentrationen bestimmt.

### 2.2.15 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Proben auf die gleiche Konzentration eingestellt und in 1:5 Laemmli-Puffer bei 95°C für 5min denaturiert. Für alle hier durchgeführten Arbeiten wurden 10 % SDS Gele verwendet, wobei Taschen zusätzlich zu einem Größenstandard mit jeweils 20 µg Protein beladen wurden. Als Spannung wurden zunächst 80 V für 30 min und anschließend 120 V für bis zu drei Stunden angelegt.

### 2.2.16 Western Blot

Zum Übertragen der Proteine vom Acrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose Membran wurde die Wet-Blot Technik benutzt. Der Transfer wurde bei 4 °C und 60 V für drei Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit 10 % Milch in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach einmaligem Waschen mit TBS wurde der jeweilige primäre Antikörper in entsprechender Konzentration in TBST mit 3 % BSA zugegeben und die

Membran über Nacht bei 4 °C unter wippen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST wurde der sekundäre Antikörper zugegeben. Entsprechende Konzentrationen wurden in TBST mit 3 % BSA gelöst und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter wippen inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden über mehrmaliges waschen mit TBST entfernt und eine Lumineszenz-Lösung zugegeben. Nach kurzer Inkubation wurden Signalintensitäten über ein Lumineszenzdetektionssystem gemessen. Relative Signalstärken wurden über die LabImage 1D software densitometrisch ermittelt.

### 2.2.17 Durchflusszytometrie infizierter THP-1 Zellen

Nach vorhergegangener Stimulation und Infektion von THP-1 Zellen mit *L. pneumophila* wurden extrazelluläre Bakterien durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt. Adhärente THP-1 Zellen wurden durch eine 0,05 % Trypsin/EDTA Lösung bei Raumtemperatur abgelöst und die Reaktion nach 5 min durch Zugabe frischen Mediums gestoppt. Zellen wurden 10 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und Zellen in PBS resuspendiert. Bis zur Messung in einem Durchflusszytometer wurden Proben anschließend auf Eis gehalten. Bei Auswertungen wurden stets intakte Zellen von Zelltrümmern separiert und der Infektionsgrad durch einen Vergleich zu einer nicht infizierten Probe ermittelt.

### 2.2.18 Markierungsfreie Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Messungen wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Funktionelle Genomforschung an der Universität Greifswald unter Leitung von Prof. Dr. Völker, v.a. durch Dr. Kristin Surmann, durchgeführt.

Gefrorene Zellpellets wurden zum Zellaufschluss in je 30 µl Puffer aus 8M Harnstoff und 2M Thioharnstoff resuspendiert. Anschließend wurden fünf Zyklen von Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen bei 30 °C durchgeführt. Nach 3 min in einem Ultraschallbad wurden Proben für 1 h bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Alle Proben wurden bis zu einem Verdau bei -80 °C gelagert. Dieser Verdau erfolgte mit 4 µg Protein nach dem SP3 Protokoll (Blankenburg, Hentschker et al. 2019). Kurz zusammengefasst, wird dabei die Probe zusammen mit 10 % SDS und speziellen Kugeln mehrmals mit Ethanol oder Acetonitril gewaschen und ein tryptischer Verdau für 18 h in Ammoniumbicarbonat-Puffer bei 37 °C durchgeführt. Nach mehrmaligem waschen mit Acetonitril wurden Peptide mit 2 % DMSO eluiert. Proben wurden nach dem Verdau an einem Q Exactive Plus Massenspektrometer gemessen (Dr. Manuela Gesell Salazar) und eine Datenauswertung wurde über die Spectronaut Software (Version 13) gegen eine humane Zelllinienbibliothek sowie über ein R Programm (erstellt durch Dr. Stephan Michalik) durchgeführt. Zahlenwerte zu relativen



Proteinmengen sowie angepasstem p-Wert wurden aus diesen Auswertungen unverändert übernommen.

### 2.2.19 Messung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität

Sphingomyelinasen setzen Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin um (Li, Wang et al. 2019). Abhängig vom pH-Wert, an dem ihre enzymatische Aktivität das Optimum erreicht, werden Sphingomyelinasen in saure, neutrale oder alkalische Sphingomyelinasen eingeteilt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay durchgeführt bei dem die Enzymaktivität der sauren Sphingomyelinase gemessen wurde. Der Assay basiert auf der Umsetzung von 2-(N-Hexadecanoylamino)-4-nitrophenylphosphocholin hydroxid (HNP) zu einem gelben Farbstoff, der im Anschluss in einem Spektrophotometer gemessen werden kann.

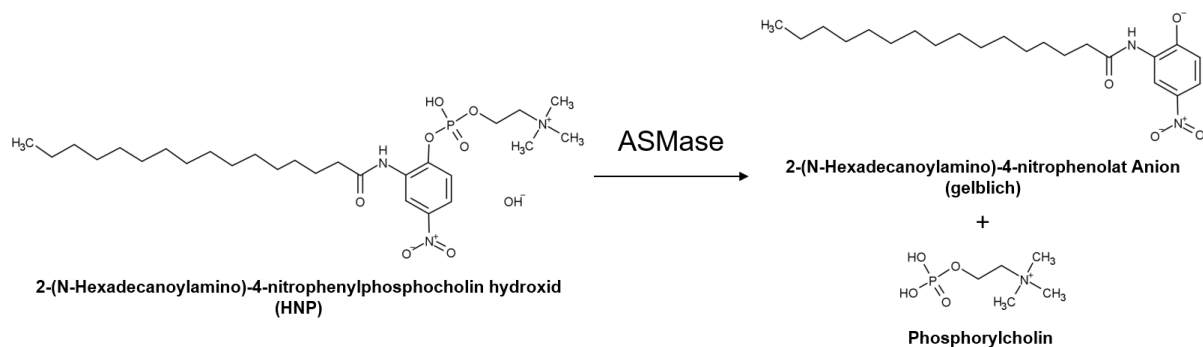


Abbildung 2.1: Umsetzung HNP durch saure Sphingomyelinasen (ASMase).

Dazu wurden je Probe  $3 \times 10^6$  THP-1 Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in kumulativ 80  $\mu\text{l}$  0,5 % Natriumcholat abgeschabt. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proben für 20 Zyklen bei 4 °C sonifiziert (30s an, 40s aus). Danach wurden sie 10 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß transferiert.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde anschließend wie in Kapitel 2.2.14 beschrieben ermittelt. In der Regel lagen die erreichten Konzentrationen bei 2-4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Von jeder Probe wurden 25  $\mu\text{l}$  mit 25  $\mu\text{l}$  HNP-Reagenz gemischt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Um vergleichbare Mengen zu analysieren wurde dabei die Konzentration der Proben auf die der geringsten Konzentration angepasst. Für den Leerwert (keine Enzymaktivität) wurde eine Probe von unbehandelten Zellen für 5 min bei 95 °C gekocht und ebenfalls 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt indem alle Proben 5 min bei 95 °C gekocht wurden. Zu jeder Probe wurde im Anschluss 150  $\mu\text{l}$  100 % Ethanol und 100  $\mu\text{l}$  Glycin-NaOH Puffer pH 11 gegeben um den entstandenen Farbstoff zu lösen. Die Proben wurden kurz gevortext und

anschließend 10 min bei 15.000 g zentrifugiert. Von jeder Probe wurden 250 µl des Überstandes in eine klare 96-Well Platte gegeben, Blasen entfernt und die Platte bei 410 nm gemessen.

Der Leerwert wurde von allen anderen Proben subtrahiert und die Ergebnisse relativ zu unbehandelten Zellen berechnet.

## 2.2.20 Automatisierte Prozesse am Tecan Freedom EVO

### 2.2.20.1 Verdünnen und aliquotieren der miRNA *Library*

Im ersten automatisierten Prozess wurden miRNAs mit Wasser gelöst, aliquotiert und für eine langfristige Lagerung bzw. spätere Prozesse vorbereitet. Ausgangspunkt waren 36 steril verpackte 96-Well Platten in denen in Positionen A2-H11 jeweils 0,25 nmol miRNA lyophilisiert vorlag. Die Platten wurden nach Ankunft bei -80 °C gelagert und vor steriler Bearbeitung auf Raumtemperatur erwärmt.

Zu jedem Well der *Library* wurden 100 µl RNase-freies Wasser gegeben und durch mehrmaliges pipettieren gelöst (Endkonzentration 2,5 µM). Aus jedem Well wurden 20 µl auf eine neue 96-Well Platte transferiert und die Ursprungsplatte anschließend mit einer Folie versiegelt und bei -80 °C gelagert. Zu den 20 µl miRNA wurden 80 µl Opti-MEM gegeben (Enzkonzentration 500 nM). Von der miRNA-Negativkontrolle 1 wurden 100 µl in der gleichen Konzentration in Positionen A1-F1 gegeben. Ebenso wurden 100 µl einer Cy3-fluoreszent markierten miRNA in der gleichen Konzentration in Positionen G1 und H1 gegeben.

Jeweils 12 µl der auf 500 nM verdünnten miRNAs wurden an die gleichen Positionen in drei 96-Well PCR Platten aliquotiert und alle Platten anschließend mit einer Folie versiegelt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ein schematischer Überblick der einzelnen Schritte ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

### 2.2.20.2 Transfektion der miRNAs in THP-1 Zellen mit siPORT Neo FX

Im zweiten automatisierten Prozess wurde die in Kapitel 2.2.20.1 erstellten PCR-Platten verwendet und zusammen mit siPORT Neo FX und THP-1 Zellen eine Transfektion durchgeführt. Dieser Prozess war durch die vorherige Lagerung der Platte bei -80 °C zeitlich unabhängig vom vorherigen Prozess.

Die PCR-Platte wurde auf Raumtemperatur gebracht und zusammen mit den nötigen Reagenzien steril bearbeitet. Zu den 12 µl vorgelegter miRNA Lösung wurden 12 µl einer

Mischung aus 0,6 µl siPORT Neo FX Reagenz und 11,4 µl Opti-MEM gegeben. Diese Mischung wurde mehrmals auf und ab pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Jeweils 80 µl einer THP-1 Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen / ml) wurden in die Wells A1-H11 einer Sensoplate Plus Mikroskopieplatte pipettiert. Zu den 80 µl wurden jeweils 20 µl der miRNA und Transfektionsreagenz Mischung der entsprechenden Wells gegeben und mehrmals auf und ab pipettiert. Die Platte wurde nach einem Schüttelschritt im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h gelagert. Die miRNA-Reste auf der PCR-Platte wurden verworfen. Ein schematischer Überblick der einzelnen Schritte ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

### 2.2.20.3 Differenzieren der transfizierten THP-1 Zellen

Die Differenzierung der transfizierten THP-1 Zellen wurde 24 h nach Ende des vorherigen Prozesses gestartet. Zur Differenzierung der THP-1 Zellen wurde wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben 20 nM PMA verwendet. Dazu wurden 20 nM einer 120 nM PMA Lösung zu den in Suspension befindlichen Zellen gegeben und durch pipettieren gemischt. Im Anschluss wurde die Platte geschüttelt und für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein schematischer Überblick der einzelnen Schritte ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

### 2.2.20.4 Mediumswechsel und anschließende Infektion

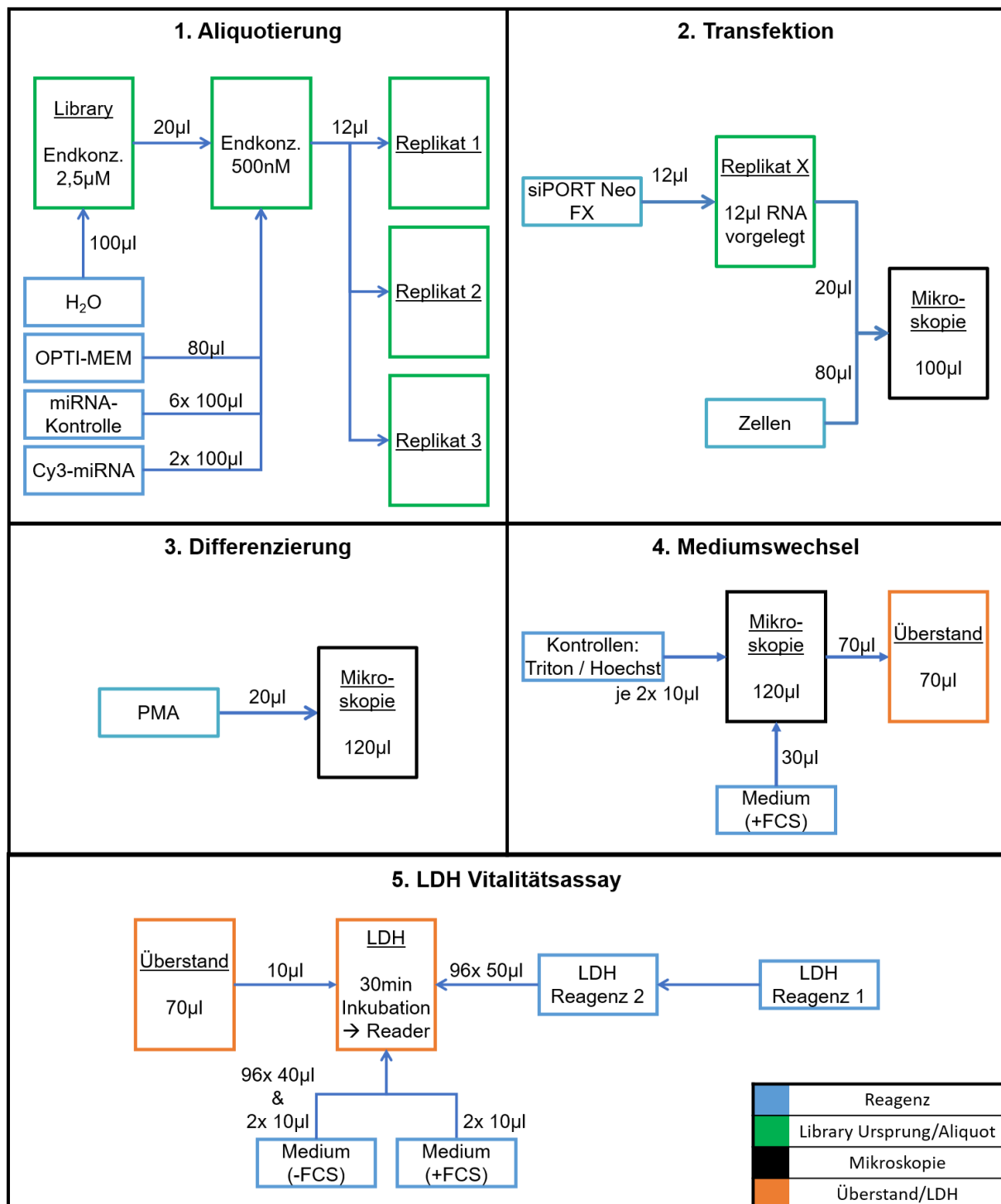
Ein Mediumswechsel vor der im Anschluss durchgeführten Infektion mit *L. pneumophila* ist nötig, um das im letzten Schritt zugegebene PMA aus dem Medium zu entfernen und den Zellen optimale Bedingungen während der Infektion zu gewähren. Zudem wurde in diesem Prozess der abgenommene Überstand vorbereitet um im darauffolgenden Prozess einen Vitalitätsassay durchzuführen und Hoechst 33342 zugegeben um zusammen mit der zuvor hinzugefügten Cy3-markierten miRNA die Transfektionseffizienz Mikroskopisch bestimmen zu können. Der hier beschriebene Prozess wurde 24 h nach Ende des vorherigen gestartet.

Es wurden 10 µl einer 10 % Triton X-100 Lösung in Wells E1 und F1 sowie 10 µl Hoechst 33342 (20 µg/ml) zu den Wells G1 und H1 gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand jedes Wells bis zu einer festen Position über dem Plattenboden abgenommen. Dies sollte sicherstellen, dass in jedem Well vergleichbare Flüssigkeitsstände vorliegen. Der abgenommene Überstand wurde in eine neue PCR Platte überführt. Technisch bedingt konnte dabei nicht die gesamte Menge des Überstandes transferiert werden ohne die adhärenen Zellen am Boden der Mikroskopie Platte zu beschädigen. Im Anschluss wurde zu jedem Well 30 µl frisches Medium ohne PMA gegeben. Zu diesem Zeitpunkt lagen in jedem Well 65 µl Medium vor.

Die Mikroskopie Platte wurde ausgegeben und die Transfektionseffizienz wie in Kapitel 2.2.21.1 beschrieben getestet sowie die Infektion wie in Kapitel 2.2.5 durchgeführt. Die PCR Platte mit den abgenommenen Überständen wurde im nächsten Prozess weiterverwendet. Ein schematischer Überblick der einzelnen Schritte ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

#### 2.2.20.5 Durchführen eines LDH Vitalitätsassays

Der Vitalitätsassay wurde ähnlich wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben automatisiert durchgeführt. Dazu wurden 10 µl jedes Wells mit 40 µl Medium ohne FCS verdünnt und 50 µl der Reagenz 1 und Reagenz 2 Mischung zugegeben. Zwei Wells mit Medium ohne FCS und zwei weitere Wells mit Medium mit FCS dienten als Negativkontrollen. Die Wells E1 und F1, in die im Kapitel 2.2.20.4 Triton X-100 zugegeben wurde, dienten als Totallyse (100 % Zelltod). Ein schematischer Überblick der einzelnen Schritte ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der automatisierten Prozesse.** Im ersten Prozess wurden die miRNA-Library Platten mit Wasser gelöst, verdünnt mit OPTI-MEM und Kontrollen in eine Zwischenplatte pipettiert und anschließend aliquotiert. Im zweiten Prozess wurde das Transfektionsreagenz zu den Aliquots gegeben und THP-1 Zellen transfiziert. Im dritten Prozess wurde nach 24 h PMA zur Differenzierung der Zellen zugegeben. Im vierten Prozess wurde der Überstand für einen LDH Vitalitätsassay abgenommen, ein Mediumswechsel durchgeführt und die Mikroskopieplatten für die händische Infektion vorbereitet. Im fünften Prozess wurde der Vitalitätsassay durchgeführt.

## 2.2.21 Automatisierte Mikroskopie am Nikon Eclipse Ti2 Mikroskop

### 2.2.21.1 Prozess zur Messung der Transfektionseffizienz

Die in Kapitel 2.2.20.1 erwähnte fluoreszent markierte miRNA wurde in der darauffolgenden Transfektion in THP-1 Zellen eingebracht. Dies diente dazu kontrollieren zu können ob und wie effizient die Transfektion generell funktioniert hat. Neben dem roten Fluoreszenz Signal der markierten miRNA wurde, wie in Kapitel 2.2.20.4 beschrieben, im Rahmen des Mediumswechsels zu diesen Wells Hoechst 33342, ein Membran-permeables und DNA-interkalierendes Agens, zugegeben, was den Nukleus blau fluoreszierend abbildet.

Die zu bearbeitenden Platten wurden in den Inkubator gestellt und in Folge mit einem automatisierten Vorgang bearbeitet. Dabei wurde der Barcode detektiert, der Fokus im Differentialinterferenzkontrast (DIC) Kanal grob ermittelt (2,5  $\mu\text{m}$  Schritte) und anschließend der Fokus im roten Kanal (0,4  $\mu\text{m}$  Schritte) genau ermittelt. Es wurden je Well 44 Bilder im roten (300 ms, Stufe 2, Gain 1), blauen (220 ms, Stufe 8, Gain 1) und DIC Kanal (40 ms, 5 Volt, Gain 1) mit einer 20x Vergrößerung erstellt. Die entsprechenden Wellenlängen der Kanäle sind der Tabelle 2.22: Mikroskopie-Wellenlängen zu entnehmen.

Die Auswertung erfolgte über die Nikon NIS-Elements Software. Damit wurden in jedem Bild die blauen Flächen der Zellkerne über einem Schwellenwert detektiert und die durchschnittliche Signalintensität des roten Kanals über jede dieser Flächen ausgegeben. Die Ergebnisse jeder Zelle der zwei analysierten Wells wurden zusammengenommen und die resultierenden Boxplots der Signalintensitäten mit den Daten anderer Transfektionen verglichen. Wäre eine Transfektion fehlgeschlagen, wäre weniger bzw. kein Signal detektiert worden oder im Falle falscher Verdünnungen eine Steigerung der Signale detektiert worden.

### 2.2.21.2 Prozess zur Aufnahme der Screening Bilder

Die Ergebnisse des Screenings beruhen auf der Auswertung von Mikroskopie Bildern jeder einzelnen miRNA Behandlung. Diese Bilder wurden ebenfalls automatisiert an einem Nikon Eclipse Ti2 Mikroskop aufgenommen. Wie schon zuvor bei der Messung der Transfektionseffizienz wurden die zu analysierenden Platten in den Stacker des Inkubators geladen und der anzuwendende Prozess für jede dieser Platten in Folge durchgeführt. Nach der Detektion des Barcodes wurde die Platte in den Schlitten des Mikroskops geladen, der Fokus mit dem DIC Kanal grob (2,5  $\mu\text{m}$ ) und fein über den roten Kanal (0,4  $\mu\text{m}$ ) und schließlich fein über ein automatisch angepasstes Perfect-Fokus-System (PFS) System ermittelt. Je Well A1 bis D1 und A2 bis H11 wurden 44 Bilder im blauen, roten und grünen Kanal mit einer 20x Vergrößerung erstellt. Die entsprechenden Wellenlängen der verwendeten Filter sind der

Tabelle 2.22: Mikroskopie-Wellenlängen zu entnehmen. Die Umwandlung der erstellten ND2 Dateien ins TIFF Format, Auftrennung in einzelne Kanäle und entsprechender Benennung erfolgte über das Bio-Formats Modul in ImageJ. Das dazu geschriebene Skript befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Tabelle 2.22: Mikroskopie-Wellenlängen

| Kanalfarbe | Anregungsfilter     | Dichroitischer Spiegel | Emissionsfilter     |
|------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| blau       | 381,5 nm - 392,5 nm | 409 nm                 | 417 nm – 477 nm     |
| grün       | 457 nm – 487nm      | 495 nm                 | 502,5 nm - 537,5 nm |
| rot        | 542 nm – 582 nm     | 593 nm                 | 604 nm - 644 nm     |

### 2.2.22 Automatisierte Bildauswertung

Aufgrund der geplanten Anzahl von  $4 \times 10^5$  Bildern in jeweils drei Kanälen war eine händische Auswertung nicht mehr möglich. Durch die komplexe Morphologie der Makrophagen-ähnlichen THP-1 Zellen im aktivierten Zustand schlugen handelsübliche Methoden zur automatisierten Auswertung fehl. Aus diesem Grunde wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Freisleben eingegangen. Aus dieser Kooperation entstand eine Software die durch sogenannte „*ground truth*“ Daten lernen konnte einzelne Zellen in einem Zellverbund voneinander zu unterscheiden. Als *ground truth* Daten dienten 82 Bilder in zwei Kanälen in denen jeweils die Zellkerne bzw. die Umrisse der darin enthaltenen Zellen per Hand markiert wurden.

Wissenschaftlich neu war die Kombination zweier Kanäle zur Analyse von Zellrändern, so dass das Prinzip dieser Software unter dem Titel „Detection and segmentation of morphologically complex eukaryotic cells in fluorescence microscopy images via feature pyramid fusion“ publiziert wurde (Korfhage, Mühling et al. 2020).

Angewendet wurde die Software mit den Einstellungen  $t = 0,2$  (Legionellen Segmentationsschwellenwert) und  $s = 0,7$  (Minimalgröße für detektierte Flächen). Die Auswertung nicht beeinflussende Optionen wurden je nach Anwendung zugeschaltet.

Ergebnisse waren für die detektierten Flächen der Zelle, des Kerns oder Legionellen die jeweilige Fläche, durchschnittliche Intensität dieser Fläche bzw. deren Zirkularität. Diese Ergebnisse wurden für jedes Well bzw. miRNA Behandlung gemittelt und mit den Negativkontrollen verglichen.

### 3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens und die Ermittlung der dafür nötigen Anforderungen. Mit diesem Verfahren sollten menschliche miRNAs sowie bioreaktive Substanzen mit Einfluss auf die Wirt-Pathogen Interaktion von Makrophagen und dem Bakterium *Legionella pneumophila* identifiziert und die von diesen ausgehende Regulation aufgeklärt werden.

Im Rahmen der Etablierung zeigte sich, dass Umwelteinflüsse die effektive Durchführung des miRNA Screenings verhinderten. Obwohl in Folge dieses Screening unterbrochen wurde, konnten drei miRNAs mit einem Einfluss auf die Infektion identifiziert werden. Die Untersuchung der dabei involvierten Vorgänge lieferte Proteinklassen und Signalwege die potentiell die Infektion regulieren. Bei der Durchführung des Screening-Verfahrens mit bioreaktiven Substanzen wurde eine Proteinklasse identifiziert die die Infektion beeinflusst.

Folglich gliedert sich dieser Teil der Arbeit in drei Teile: die Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens, die Untersuchung der drei miRNAs mit Einfluss auf die Legionelleninfektion und der darin involvierten Signalwege, sowie die Identifikation und Aufklärung der Einflüsse von bioreaktiven Substanzen.

#### 3.1 Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Identifizierung von *Legionella pneumophila*-Infektion beeinflussenden miRNAs und bioreaktiven Substanzen

##### 3.1.1 Konzeptioneller Aufbau und durch Automatisierung bedingte Modifikationen

Durch Studien, die dieser Arbeit vorangegangen waren, wurde bekannt, dass miRNAs eine Rolle in der Infektion von menschlichen Makrophagen mit *Legionella pneumophila* haben (Jung, Stoiber et al. 2016, Herkt, Caffrey et al. 2020).

Im Menschen infizieren Legionellen alveoläre Makrophagen, welche den Bakterien eine Umgebung bieten um sich geschützt vor äußeren Einflüssen intrazellulär zu replizieren. Als Modell für alveoläre Makrophagen werden oft THP-1 Zellen, eine Monozyten Zelllinie, verwendet. Um den Einfluss von miRNAs bei dieser Infektion zu untersuchen, müssen Makrophagen mit miRNAs transfiziert und Veränderungen nach der Infektion gemessen werden.



Bisher wurde dieses Vorgehen nur mit einer kleineren Anzahl an miRNAs und ohne maschinelle Unterstützung durchgeführt. Da in dieser Arbeit neben bioreaktiven Substanzen eine miRNA *Library* mit 2754 zu analysierenden miRNAs in Replikaten untersucht werden sollte, war das pipettieren per Hand nicht mehr umsetzbar. Ein Hochdurchsatzverfahren sollte entwickelt werden, das diesen Ansprüchen entspricht und eine großen Anzahl an zu testenden Bedingungen verarbeiten kann. Durch die Umstellung auf ein automatisiertes System ergaben sich nötige Veränderungen des zuvor genutzten Protokolls. Dies betraf die Pipettierarbeiten (Kapitel 3.1.1.1), die Art der Datengenerierung und wie diese Daten im Anschluss analysiert werden mussten (Kapitel 3.1.1.2). Diese Punkte sollen im Folgenden beschrieben und die am Ende verwendeten Lösungen, deren Prozessschritte sowie Limitationen dargestellt werden.

#### 3.1.1.1 Anpassung der Pipettierarbeiten und Materialien

Mehrere Schritte des Screenings wurden mit Hilfe eines Tecan Freedom EVO Systems automatisiert, was Pipettierfehler wie falsche Volumina oder pipettieren an inkorrekte Positionen ausschloss.

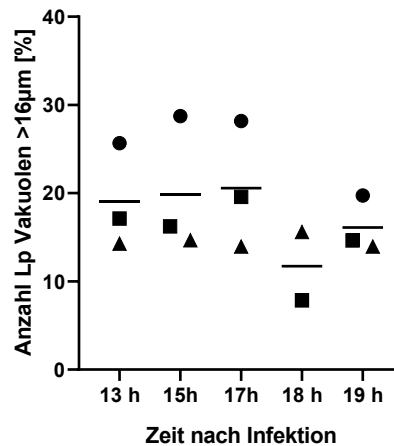
Da die gewählte miRNA *Library* aus 36 Platten im 96 Well Format bestand war es praktisch dieses Format auch im Screening beizubehalten. Zum einen musste dadurch keine aufwendige Umpositionierung aller miRNAs durchgeführt werden und zum anderen entstanden durch die geplanten 36 Platten in Triplikaten bereits 108 zu bearbeitende Platten. Bei Wahl eines größeren Wellformats wie 48 oder 24 Well Platten hätte sich der Arbeitsaufwand verdoppelt oder vervierfacht, was nicht praktikabel umsetzbar gewesen wäre. Eine Greiner Sensoplate Plus Platte wurde im 96-Well Format ausgewählt, um darin die Infektionsexperimente des Screenings durchzuführen. Diese Platte wurde gewählt, da ein Glasboden gegenüber Polystyrol gleichmäßiger ist, bessere optische Eigenschaften für die Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie bietet und so die automatisierte Mikroskopie vereinfachte. Zudem waren differenzierte THP-1 Zellen auf Glas, gegenüber einem Cycloolefin-Copolymer (COC) Boden, in ihrer Morphologie und Verhalten bei Beobachtung unter dem Mikroskop Makrophagen-ähnlicher und wiesen etwas bessere Vitalitätswerte in einem LDH Assay auf.

Da Transfektionen, welche per Hand durchgeführt wurden, standardmäßig im 12 oder 24 Well Format pipettiert wurden, musste das Volumen jedes Wells von 1000  $\mu\text{l}$  bzw. 500  $\mu\text{l}$  auf 100  $\mu\text{l}$  reduziert werden. Dementsprechend wurden auch die Volumina der einzelnen Reagenzien angepasst, so dass für Transfektionen, die Differenzierung von THP-1 Zellen und dem darauffolgenden Mediumswechsel das in Kapitel 2.2.20 beschriebene Protokoll verwendet wurde.

Da Arbeiten mit BSL2 Organismen organisatorisch nicht auf der Automatisierungsplattform möglich waren, wurden alle Tätigkeiten mit lebenden *Legionella pneumophila* Bakterien per Hand durchgeführt. Dies betraf die Infektion der THP-1 Zellen, welche in Folge aus organisatorischen Gründen am Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmeck unter entsprechenden S2 Bedingungen stattgefunden haben.

Da die automatisierte Mikroskopie einer 96-Well Platte, mit den gegebenen Bedingungen von 84 Wells mit je 44 Bildern in drei Kanälen, 8 h dauert, wäre bei mehreren Platten in Folge keine Vergleichbarkeit von Infektionen gegeben gewesen. Aus diesem Grund mussten infizierte Zellen zu entsprechenden Endzeitpunkten fixiert werden. Dies war außerdem vorteilhaft, da es die Anwendung von Farbstoffen, wie CellMask Red, ermöglichte, welche unter Lebend-Zell Bedingungen nicht eingesetzt werden könnten.

Nach Transfektion der miRNAs in THP-1 Zellen, der Differenzierung dieser Zellen und einem Mediumswechsel wurden die Platten per Hand infiziert und nach 16 h Infektion fixiert. Die Färbung der Zellen wurde ebenfalls händisch durchgeführt, da automatisierte Pipettierschritte in einem erhöhten Ablösen der Zellen vom Plattenboden resultierten. Das Vorgehen ist dabei in Kapitel 2.2.5 beziehungsweise Kapitel 2.2.6 beschrieben. Der 16 h Zeitpunkt wurde gewählt um das Ende des ersten Replikationszyklus der Bakterien abzubilden. Es zeigte sich, dass sich die Anzahl großer Vakuolen nach 17 h Infektion mit *L. pneumophila* reduziert, wenn extrazelluläre Bakterien mit Gentamicin abgetötet wurden (Abbildung 3.1). Eine Reinfektion durch frei gewordene Legionellen wurde durch Entfernen von Gentamicin nicht verhindert, so dass bei folgenden Zeitpunkten eine weitere Erhöhung der Legionellenvakuolen zu erwarten war. Dieser Zeitraum von ca. 17 h stellt im genutzten System einen Replikationszyklus dar und sollte knapp unterschritten werden, um konsistentere Ergebnisse, ohne zu viele Reinfektionen zu erhalten. Aus diesem Grund wurden 16 h als Zeitpunkt für weitere Experimente gewählt.



**Abbildung 3.1: Bestimmung der optimalen Infektionsdauer.** Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* MOI 15 infiziert. Zugabe von Gentamicin (25 µg/ml) 1 h nach Infektion und Mediumwechsel 2 h nach Infektion. PFA Fixierung und Färbung mit CellMask Red und Höchst 33342 nach angegebener Infektionsdauer. Auswertung des Vakuolendurchmessers mittels Nikon NIS-Elements Software. Gezeigt sind gemittelte Werte technischer Replikate von 2-3 unabhängigen biologischen Replikaten, repräsentiert durch entsprechende Symbole.

### 3.1.1.2 Datengenerierung und Datenauswertung

Aufgrund der hohen Anzahl zu transfizierender miRNAs im Screening musste eine geeignete Methode zur Datengenerierung gewählt werden, bei der der händische Arbeitsaufwand je Probe gering ist. Dies schloss Durchflusszytometrie sowie CFU-Assays aufgrund des zeitlichen Aufwands aus. Die Sequenzierung behandelter Proben erschien unpraktikabel, da trotz Multiplex Sequenzierung aufgrund der nötigen Sequenziertiefe ein hoher Aufwand sowie Kosten angefallen wären. Der Fokus sollte zudem auf einer veränderten intrazellulären Replikation liegen und die Modifikationen einzelner Stoffwechsel- bzw. Signalwege erst im Anschluss ermittelt werden. Die Auswahl der Methode erfolgte zugunsten eines mikroskopischen Ansatzes mittels eines automatisierten Mikroskops. Dazu musste ein Barcode System entworfen werden, um im Nachhinein Daten einzelnen miRNA Behandlungen zuzuweisen, wobei dieser letztendlich auch im Dateinamen vorkommen musste. Zur optimalen Durchführung wurden Platten im Lagerinkubator auf 28 °C erwärmt, um nach dem Transport auf den Mikroskopieschlitten Verformungen zu vermeiden. Dies erleichterte die Beibehaltung des Fokus über die gesamte Platte hinweg, so dass dieser nur am Anfang jeder Platte bestimmt wurde. Während des Prozesses wurde eine Abdeckfolie verwendet, was Verdunstung und mögliche Kontaminationen, ausgehend von den Proben, ausschloss. Zudem wurde diese Folie so ausgewählt, dass DIC-Mikroskopie weiterhin möglich war, um damit den Fokus zu ermitteln.

Der Mikroskopie-Prozess erzeugte Dateien im Nikon proprietären ND2 Format, die im Anschluss in ein gängiges Format umgeschrieben werden mussten. Dazu wurde ein ImageJ Programm geschrieben (siehe Kapitel 2.2.21.2).

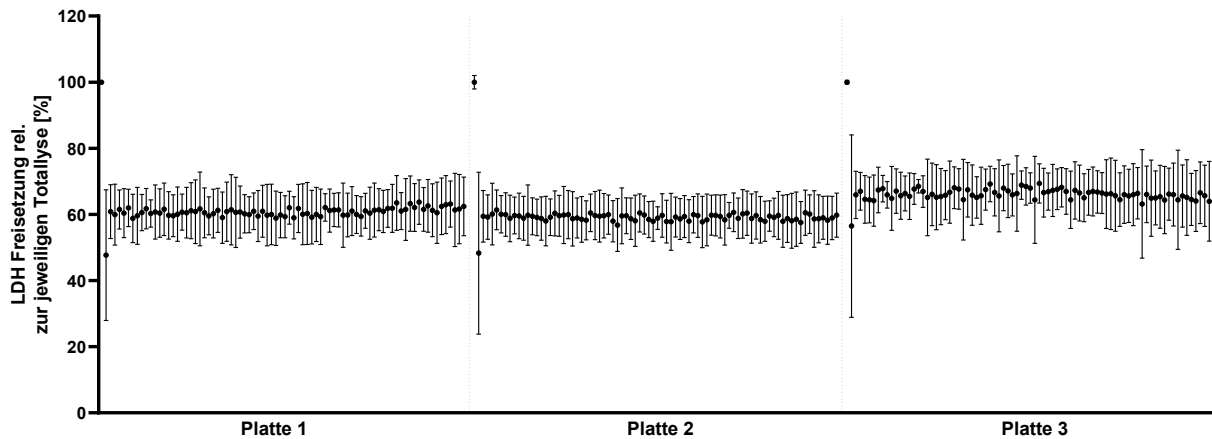
Da gängige Bildauswertemethoden aufgrund der komplexen Morphologie fehlschlagen, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Freisleben eine entsprechende Software entwickelt, mit der Daten von individuellen Zellen aus den Mikroskopiebildern erhoben werden konnten. Dazu gehörten die Flächen und Intensitäten einzelner Signale, aber auch abgeleitete Statistiken der Morphologie der THP-1 Zellen. Die Möglichkeit einzelne Zellen voneinander zu separieren und getrennt voneinander auswerten zu können ermöglicht eine verlässlichere Berechnung der Infektionsrate, da zur Berechnung dieser eine erhöhte Anzahl einzelner Messpunkte zur Verfügung steht. Die Infektionsrate wurde dabei als das Verhältnis zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen festgelegt. Zudem konnten die Signale von Legionellenvakuolen einzelnen infizierten Makrophagen zugeordnet werden, was die Qualität der Daten, durch Festlegung des Infektionsstatus, erhöhte.

### 3.1.2 Durchführung des ersten Teils des Screenings

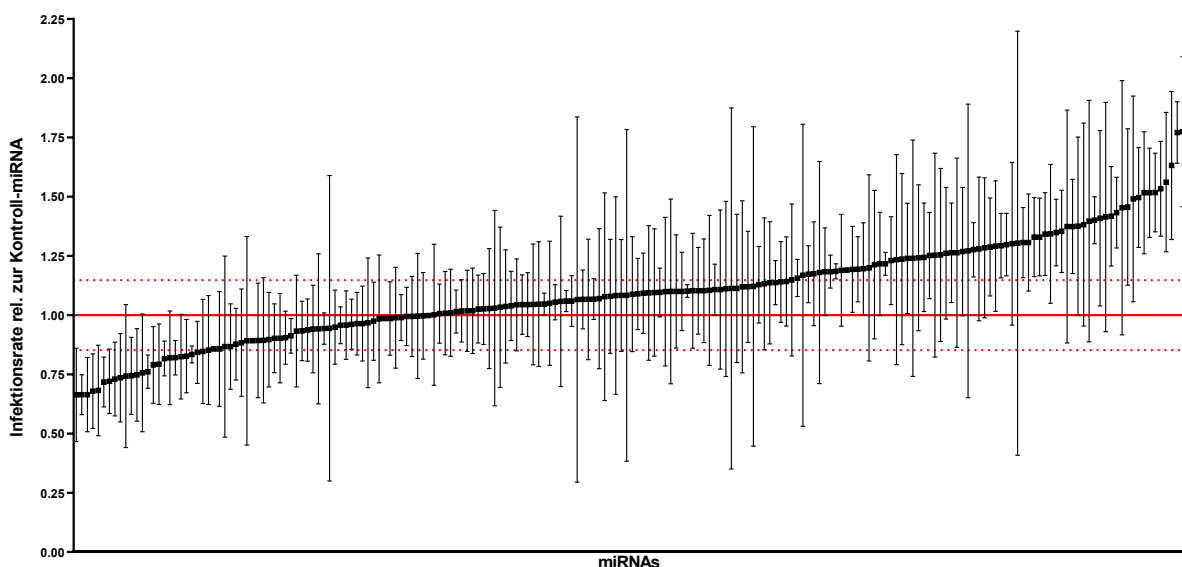
Vor der Durchführung des kompletten Screenings sollte ein kleiner Teil der 36 *Library*-Platten getestet und ausgewertet werden um mögliche Probleme des Testverfahrens zu detektieren. Dementsprechend wurden die ersten drei von 36 miRNA Platten in drei unabhängig voneinander durchgeführten Replikaten gescreent. Aufgrund des Designverfahrens der *Library* wurden wenige miRNAs mehrfach auf einer Platte positioniert, was beim ersten Testscreening in 202 einzigartigen miRNAs, ohne Einbezug der Kontrollen resultierte. Die zugehörigen Werte des Vitalitätsassay sind in Abbildung 3.2 dargestellt. In allen Fällen hatte die miRNA Transfektion keinen deutlich erhöhten Zelltod im Vergleich zur miRNA Negativkontrolle zur Folge. Gegenüber dem Wert reinen Mediums mit FCS zeigte sich ein rund 15 % höheres Signal für die Zellen im Assay, was darauf schließen lässt, dass Zellen durch die Transfektion nur leicht gestresst wurden. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Infektionsrate nach Auswertung der miRNA Behandlung im Vergleich zur entsprechenden miRNA Negativkontrolle. Die Zellsegmentierung erfolgte in diesem Fall über die Nikon eigene NIS-Elements Software, da die speziell angefertigte Softwarelösung zu diesem Zeitpunkt noch nicht bereitstand.

Es wurde erwartet, dass bei einer Transfektion wenige miRNAs die Infektionsrate, also das Verhältnis zwischen infizierten und nicht infizierten Makrophagen, senken beziehungsweise steigern und der Großteil der Behandlungen keinen Einfluss auf die Infektion hat. Dies galt sowohl für die Aufnahme und auch Replikation der Legionellen, deren Effekte in der

Infektionsrate gemischt erscheinen. Nach sortieren aller Infektionswerte zeigt sich wie erwartet ein sigmoidaler Verlauf bei dem die Mehrheit aller miRNA Behandlungen vergleichbare Infektionsraten wie die der miRNA Negativkontrolle aufwies. Interessanterweise scheinen im Schnitt mehr Behandlungen die Infektion zu begünstigen als sie zu senken. Elf miRNAs beeinflussten die Infektionsrate signifikant, wobei nur miRNAs mit einer Steigerung der Infektionsrate Signifikanz aufwiesen. Diese sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.



**Abbildung 3.2: LDH Vitalitätsassay des ersten Teilscreenings.** 234 Positionen mit zu testenden miRNAs auf drei Platten wurden in jeweils drei Replikaten gemessen. Von jedem Signal wurde der Wert reinen Mediums subtrahiert, Replikate gemittelt und eine durch die Automatisierung aufgetretene Positionsabhängigkeit verrechnet. Daten werden im Verhältnis zur dazugehörigen Totallyse (maximale LDH Freisetzung) derselben Platte mit der Standardabweichung aller technischen Replikate gezeigt. Für jede Platte ist von links nach rechts die jeweilige Totallyse, Medium + 10 % FCS, miRNA Negativkontrolle, miRNA-Cy3 Transfektion und in Folge die zu testenden miRNA Behandlungen dargestellt.



**Abbildung 3.3: Ergebnisse des ersten Teilscreenings.** 202 verschiedene miRNAs verteilt auf drei 96 Well Platten wurden mit bis zu sechs Replikaten in THP-1 Zellen transfiziert und anschließend gescreent. Daten werden im Verhältnis zur Kontroll-miRNA mit der jeweiligen Standardabweichung aller biologischen Replikate dargestellt. Die gemittelte Standardabweichung aller miRNA Negativkontrollen ist gepunktet um 1 dargestellt.

**Tabelle 3.1: miRNA Transfektionen mit signifikanter Änderung der Infektionsrate.** Analyse mittels multiplen ungepaartem t-Test. Korrektur auf multiples Testen über die Holm-Sidak Methode mit  $\alpha = 0,05$

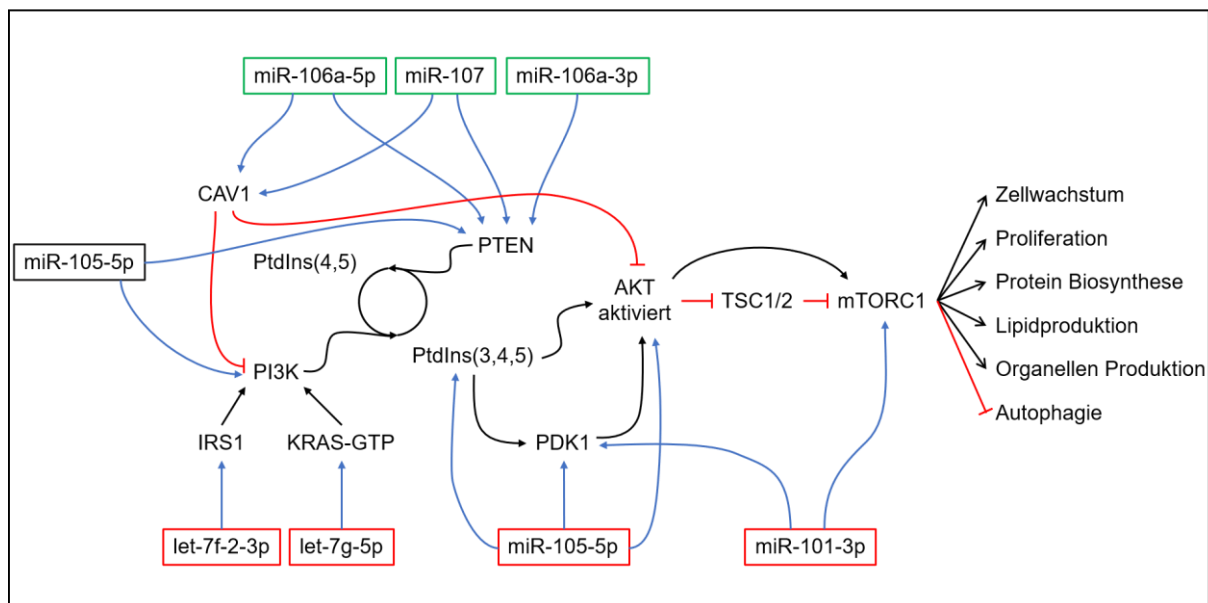
| <b>miRNA</b>      | <b>Infektion x-fach zur Kontrolle</b> | <b>p-Wert</b> | <b>Replikate</b> |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|------------------|
| hsa-miR-1265      | 1,417                                 | 0,000001      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-miR-107       | 1,433                                 | 0,000003      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-miR-101-3p    | 1,496                                 | 0,000005      | 6 (2 x 3)        |
| hsa-miR-125b-2-3p | 1,516                                 | 0,000010      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-let-7f-2-3p   | 1,517                                 | 0,000030      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-miR-106a-3p   | 1,518                                 | 0,000041      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-miR-10a-3p    | 1,533                                 | 0,000044      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-miR-105-5p    | 1,561                                 | 0,000049      | 6 (2 x 3)        |
| hsa-miR-106a-5p   | 1,632                                 | 0,000054      | 3 (1 x 3)        |
| hsa-miR-105-3p    | 1,771                                 | 0,000217      | 6 (2 x 3)        |
| hsa-let-7g-5p     | 1,774                                 | 0,000222      | 3 (1 x 3)        |

Bevor weitere Platten mit dem vorgestellten Verfahren gescreent wurden, sollte die Aussagekraft des Screenings anhand der miRNAs mit signifikanter Steigerung der Infektionsrate validiert werden. Dazu wurden aus den in Tabelle 3.1 gelisteten miRNAs geeignete Kandidaten ausgewählt, deren Einfluss auf die Infektion mit anderen Experimenten validiert werden sollte.

Die Website miRTarBase ist eine Datenbank, die ihre Daten aus veröffentlichten Studien bezieht und listet validierte miRNA-Proteininteraktionen auf. Darüber wurden Proteine identifiziert, die potentiell durch die im Teilscreening gefundenen miRNAs adressiert werden und, da die miRNAs die Infektion beeinflussten, somit auch potentiell während einer Legionellen-Infektion relevant sein könnten.

Mehrere der miRNAs schienen Proteine beeinflussen zu können, die vorwiegend Funktionen im mTOR Signalweg haben. Die Abbildung 3.4 zeigt die über miRTarBase gefundenen Interaktionen in diesem Signalweg. Der mTOR Signalweg, insbesondere über den mTORC1 Komplex, ist verantwortlich für die Regulation der Protein- und Lipidproduktion, des Zellwachstums und des Zellzykluses sowie des Energiehaushalts einer Zelle (Jhanwar-Uniyal, Wainwright et al. 2019). Eine Modifikation dieses Signalwegs kann somit in einer drastisch veränderten Reaktion einer Zelle auf eine Infektion resultieren (Abshire, Dragoi et al. 2016, Ivanov 2017). Damit stellten miRNAs mit Zielen in diesem Signalweg eine biologisch sinnvolle Möglichkeit dar, die zuvor erhobenen Daten zu validieren.

Für die Validierung wurden miRNA-101-3p, miRNA-106a-5p und miRNA-107, im weiteren Verlauf dieser Arbeit miRNAs-101, 106a und 107 genannt, ausgewählt. Damit wurden drei miRNAs mit Proteininteraktionen im mTOR Signalweg selektiert, von denen, abhängig von adressierten Proteinen, die Richtung der Beeinflussung von mTORC1 zu erwarten war. Für miRNA-101-3p wurde eine Reduktion, für miRNA-106a-5p und miRNA-107 eine Steigerung der Aktivität vermutet. Obwohl miRNA-105-5p ebenfalls diesen Signalweg beeinflussen könnte, wurde diese nicht für weitere Experimente herangezogen, da diese nicht vom Hersteller erworben werden konnte. miRNAs let-7f-2-3p und let-7g-5p sind mit ihren adressierten Proteinen IRS1 und KRAS-GFP, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, im Signalweg weiter vom mTORC1 Komplex entfernt und eine direkte Regulation eventuell weniger ausgeprägt. Es wurde davon ausgegangen, dass ein Einfluss auf die Infektion durch eine solche miRNA Transfektion somit weniger wahrscheinlich über diesen Signalweg als für die anderen miRNAs verläuft. miRNA-1265 wurde trotz der stärksten Signifikanz nicht für Validierungen ausgewählt, da miRNAs mit hoher Nummerierung oft fälschlicherweise dieser RNA-Klasse zugeordnet wurden.



**Abbildung 3.4: Signifikant getestete miRNAs mit Interaktionen im mTOR Signalweg.** Gezeigt sind die über miRTarBase gefundenen Interaktionen zwischen miRNAs mit Signifikanz im Screening und ausgewählten Proteinen im mTOR Signalweg. Schwarze Pfeile wirken agonistisch wohingegen rote Linien antagonistisch auf die Funktion eines Proteins oder biologischen Prozesses wirken. miRNAs wurden abhängig von der erwarteten Wirkung auf die mTORC1 Aktivität umrahmt (grün: agonistisch, rot: antagonistisch, schwarz: unbekannt). Adaptiert nach (Jhanwar-Uniyal, Wainwright et al. 2019).

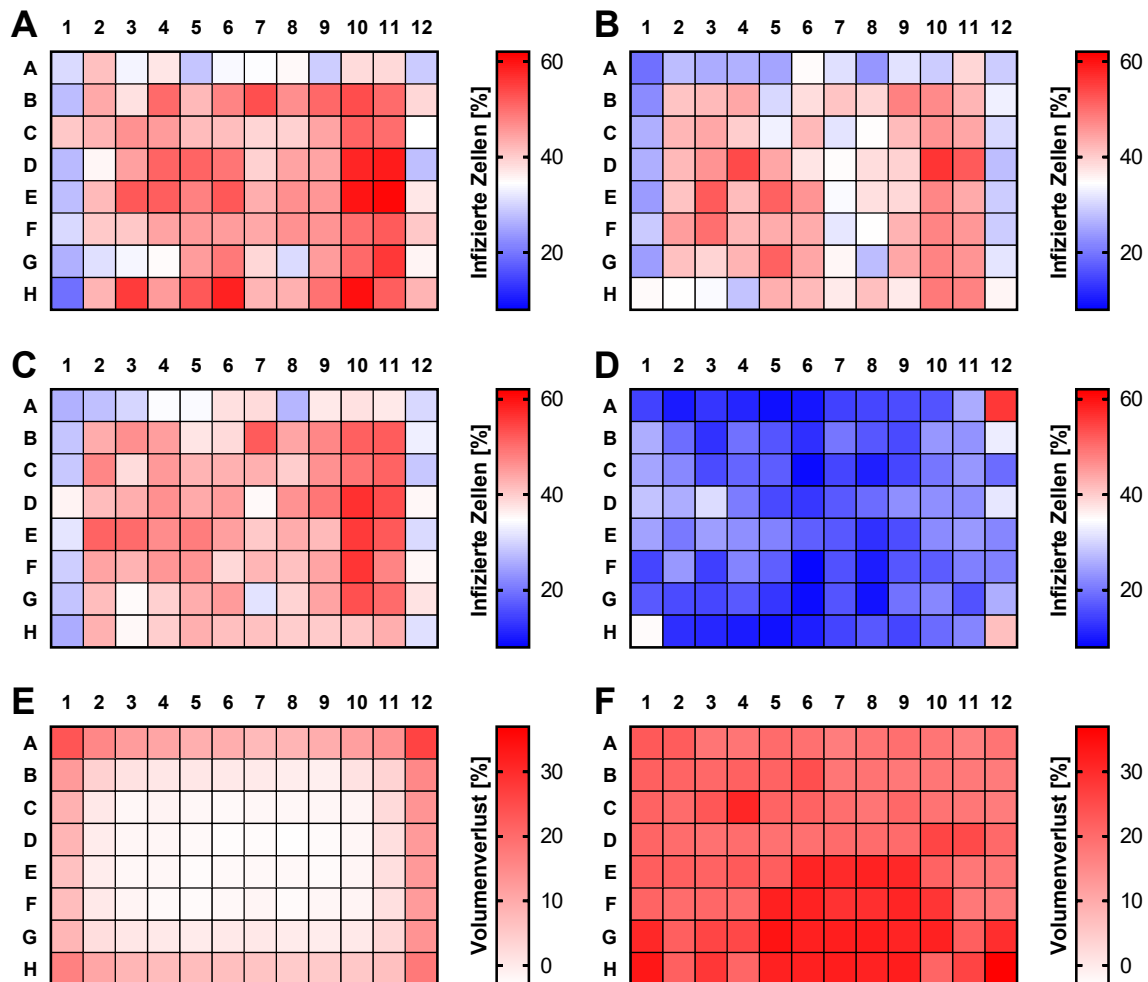
### 3.1.3 Identifizierung von positionsabhängigen Effekten bei Messungen

Schon bei der Durchführung des Screenings der ersten drei miRNA Platten (Kapitel 3.1.2) konnte beobachtet werden, dass die Infektionsrate der Zellen von der Well-Position auf der Mikrotiterplatte abhängig zu sein schien. Wurden Messwerte entsprechend ihrer Position auf der Mikrotiterplatte aufgetragen, zeigte sich eine im Schnitt erhöhte Infektionsrate in der Mitte der 96-Well Platten. Da dieses Verhalten zwischen den biologischen Replikaten etwas variierte und zufällig bedingt sein konnte, wurden erste Validierungsexperimente ungeachtet dessen geplant und durchgeführt. Dieses Verhalten trat jedoch ebenfalls bei der Validierung der drei miRNAs-101, 106a und 107 auf. Um festzustellen, ob diese Abhängigkeit unterbunden werden kann, wurden zunächst verschiedene Abdeckungen, wie alternative Plastikabdeckungen oder Folien mit Gasaustausch, während des automatisierten Teils des Screening-Protokolls getestet. Der Hintergrund dazu war, dass ein mangelhafter Gasaustausch, der vor allem mittig auf der Platte auftreten würde, die Infektion beeinflussen könnte. Überprüft wurden neben dem üblichen Deckel mit Kondensringen ein Deckel mit verkürzter Randleiste sowie ohne Kondensringe und eine Luftdurchlässige Folie. Um vollständigen Gasaustausch zu gewährleisten wurde zudem ein Deckel rund 5 mm über der Platte angebracht.

Wie in Abbildung 3.5 A-D zu sehen ist, wurde ein Randeffekt weder mit einer gasdurchlässigen Folie noch durch das Entfernen der Kondensringe oder einer Randleiste vermieden. Durch die Befestigung einer Abdeckung über der Platte mittels Abstandshaltern wurde der Gasaustausch nicht blockiert wodurch sich der Randeffekt verminderte. Dabei kam es aber zu einer allgemeinen Senkung der Infektionsrate, einer sehr hohen Verdunstung und einer, optisch beobachteten, eingeschränkten Vitalität der Zellen.

Wie in Abbildung 3.5 E dargestellt zeigte sich die Verdunstung des Mediums bei der standardmäßig verwendeten Plastikabdeckung wie erwartet vorwiegend in den Randbereichen und könnte durch die veränderte Konzentration an Nährstoffen das Verhalten der Wirtszellen bei Infektionen verändern. Gasdurchlässige Folien (Abbildung 3.5 F) erhöhen die durchschnittliche Verdunstung stark und stellen dementsprechend keine Alternative dar. Zudem bestand die Gefahr, dass sich die Folie ablöst und wie im unteren Teil des gezeigten Beispiels lokale Abweichungen entstehen.

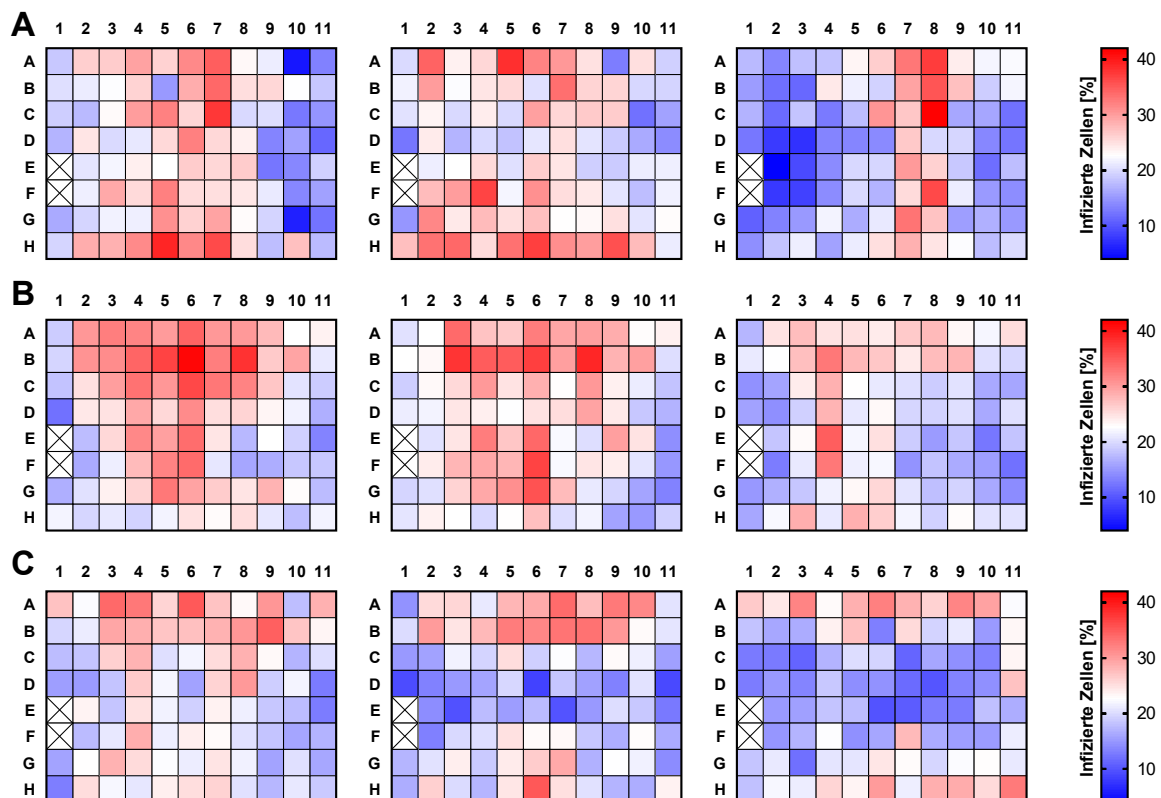




**Abbildung 3.5: Varianten zur Abdeckung von Mikrotiterplatten und Flüssigkeitsverlust.** THP-1 Zellen wurden automatisiert in 96 Well Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 h mit 20 nM PMA differenziert. Als Abdeckung diente ein Deckel mit Kondensringen (A), eine Luftdurchlässige Folie (B), ein Deckel mit vermindelter Randleiste ohne Kondensringe (C) sowie freier Gasaustausch über eine mittels Abstandhaltern über der Platte positionierte Abdeckung (D). Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert (A-D). Die Auswertung der Infektionsrate erfolgte über die Nikon NIS-Elements Software. (A-D) zeigen die Infektion der Zellen in % pro Well. In jedes Well von neun Mikrotiterplatten wurden jeweils 100  $\mu$ l Wasser gegeben, auf Inkubator-Positionen 1, 5 und 8 (oben, mittig, unten) verteilt und mit Plastikdeckel (E) bzw. Folie (F) abgedeckt. Die Platten wurden für einen langen Zeitraum von 113 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert um Unterschiede deutlich zu machen. Vor sowie nach der Inkubation wurde bei 970 nm, dem Absorptionsmaximum von Wasser, gemessen. (E) bzw. (F) zeigen exemplarisch Ergebnisse für Deckel bzw. mit Folie abgedeckte Platten. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei biologischen Replikaten (A-D), sechs bzw. drei technischen Replikaten (E/F).

Variationen in der Abdeckung der Mikrotiterplatten stellten, um die zuvor bemerkten Randeffekte der Infektionsrate zu reduzieren, keine Lösung dar, da alternative Abdeckungen entweder zu erhöhten beziehungsweise unregelmäßigen Verdunstungen führten oder die Zellvitalität einschränkten. Es wurde erwogen Randeffekte mathematisch, abhängig von der Lokalisation auf der Platte, herauszurechnen. Dazu mussten mehrere Replikate unter vergleichbaren Bedingungen zeitlich verteilt angefertigt werden. Die Ergebnisse der gemessenen Infektionsraten von neun Replikaten, jeweils nach Zugabe des

Transfektionsreagenzes, aber ohne miRNA, sind in Abbildung 3.6 zu sehen. Die Vergleichbarkeit innerhalb technischer Replikate war dabei deutlich höher als die biologischer Replikate, welche im Abstand von jeweils einer Woche durchgeführt wurden. Verglichen mit den Messwerten der zuvor positiv getesteten miRNAs waren die Abweichungen der biologischen Replikate akzeptabel und das Herausrechnen des Randeffektes sollte mit diesem Basisdatensatz durchgeführt werden. Als Methode wurde erwogen Messwerte je Wellposition zu mitteln, in das Verhältnis zu den normalerweise benutzten Negativkontroll-Positionen (A-D1 und A-B2) zu setzen und anschließend neu gemessene Werte durch diesen Faktor zu teilen. Bei Erstellung der Replikate wurde erstmals die durch die AG Freisleben erstellte Separations-Software genutzt und Ergebnisse mit denen der NIS Software verglichen. Dabei ergaben sich kleine Unterschiede im unteren einstelligen Prozentbereich in einzelnen Wells, wobei die generelle Verteilung von Bereichen mit hoher bzw. niedriger Infektionsrate sowie die durchschnittliche Infektionsrate über eine Platte unverändert blieb.



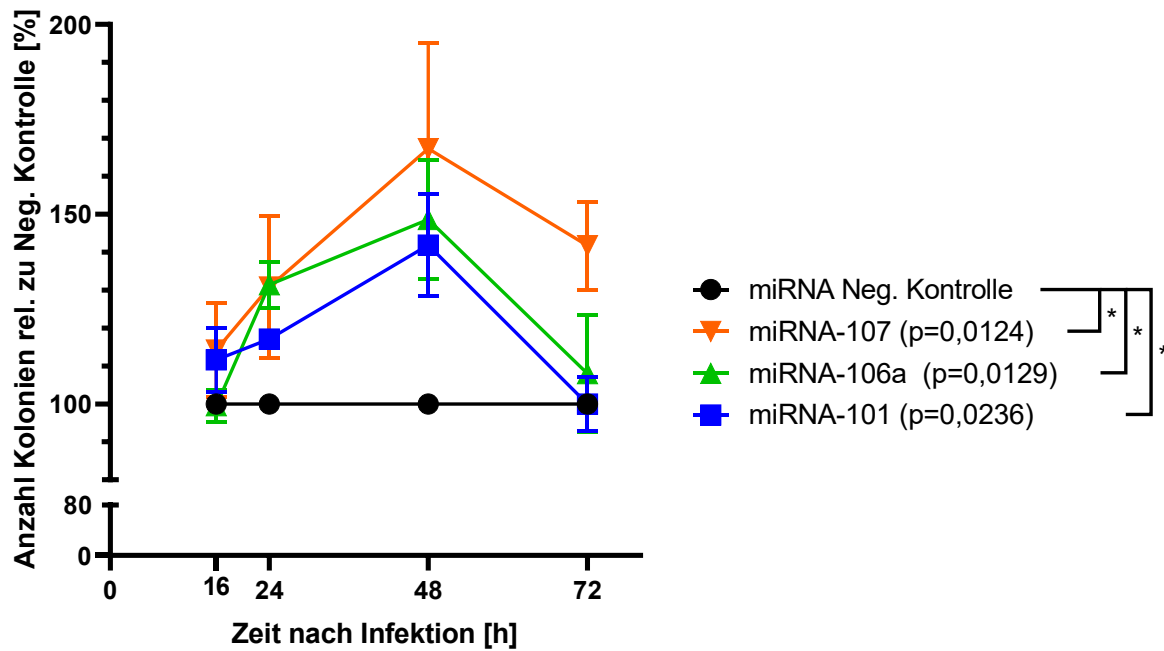
**Abbildung 3.6: Erstellung von Replikaten zur mathematischen Korrektur von Messwerten des Screening Verfahrens.** THP-1 Zellen wurden automatisiert in 96 Well Mikrotiterplatten ausgesät, für 24 h mit Medium und Transfektionsreagenz, aber ohne miRNA, inkubiert und anschließend für 24 h mit 20 nM PMA stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Wells E1, F1 und Spalte 12 wurden ausgeschlossen, da sie im Screeningprozess zur Totanalyse bzw. nicht verwendet werden. Die Auswertung der Infektionsrate erfolgte über die entwickelte Separations-Software. Gezeigt ist die Infektion der transfizierten Zellen in % pro Well. (A-C) zeigen drei Experimente im Abstand von einer Woche mit jeweils drei technischen Replikaten von links nach rechts.

### 3.1.4 Validierung der Ergebnisse anhand der miRNAs-101, 106a und 107

#### 3.1.4.1 miRNAs-101, 106a und 107 steigern Legionellenreplikation in CFU-Assays

Mit den in Kapitel 3.1.2 zur Validierung ausgewählten miRNAs-101, 106a und 107 sollten händisch Experimente durchgeführt werden um die gesteigerte Infektionsrate im Mikroskopie-Screening zu belegen. Zudem war dadurch eine Analyse über mehrere Zeitpunkte möglich. Als etablierte Methode zur Untersuchung der intrazellulären bakteriellen Replikation boten sich CFU-Assays an. Dabei zeigte sich wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, dass alle getesteten miRNAs im Vergleich zur miRNA Negativkontrolle eine gesteigerte Anzahl an Kolonien aufweisen. Diese Steigerung war vor allem 48 h nach Infektion mit *Legionella pneumophila* zu beobachten. Es gab 16 h nach Infektion keine signifikante Veränderung in der Kolonienanzahl, was dem Zeitpunkt des Screenings entsprochen hätte. Dies könnte auf die gesenkte MOI von 0,5 statt 20 zurückzuführen sein wodurch sich prozentuale Änderungen in der Replikation erst kumulieren müssen und so im späteren Verlauf der Infektion sichtbar werden. Die niedrigere MOI wurde verwendet, da dadurch das Experiment über einen längeren Zeitraum von bis zu 72 h durchgeführt werden kann. Der Rückgang der relativen bakteriellen Replikation der miRNA-101, 106a oder 107 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zum 72 h Zeitpunkt kann durch das Absterben der verbleibenden THP-1 Zellen erklärt werden. Durch eine erhöhte Replikation nach entsprechender miRNA Transfektion verringert sich die Anzahl nicht infizierter Zellen schon zu früheren Zeitpunkten, so dass im späteren Verlauf aufgrund eines Mangels an lebenden Makrophagen keine weitere Replikation stattfinden kann.

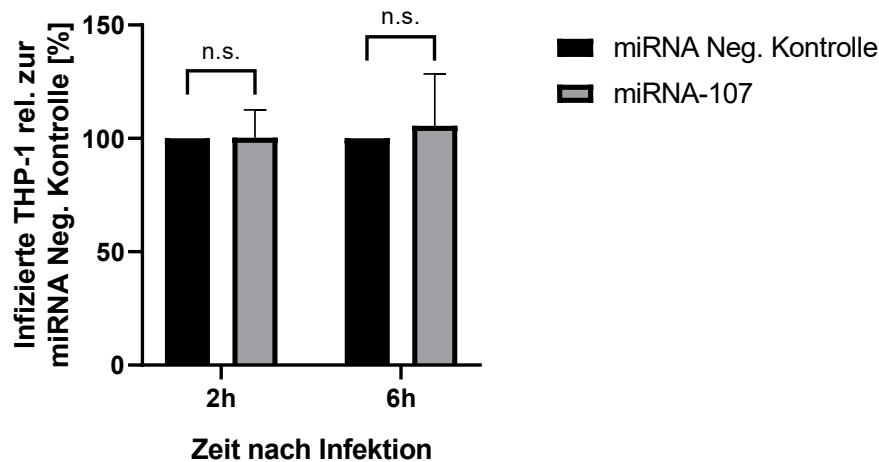
Die zur Validierung verwendeten miRNAs zeigten insgesamt ein zum Teilscreening der miRNAs vergleichbares Ergebnis, indem die bakterielle Replikation nach miRNA-101, 106a und 107 Transfektion im Vergleich zur miRNA Negativkontrolle erhöht war. Die Stärke der Veränderung korrelierte dabei aber nicht mit den Werten des Screenings, da z.B. miRNA-107 im Screening die schwächste, hier aber die größte Steigerung zur Kontrolle zeigte.



**Abbildung 3.7: miRNA-101, 106a und 107 steigern bakterielle Replikation in CFU-Assays.** THP-1 Zellen wurden mit den jeweiligen miRNAs transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 0,5 für bis zu 72 h infiziert. Koloniebildende Einheiten wurden nach der jeweiligen Infektionsdauer bestimmt. Gezeigt sind Durchschnittswerte von drei bis sechs biologischen Replikaten mit dem dazugehörigen SEM. Signifikanz zur miRNA Negativkontrolle wurde mit einem angepassten gemischten Modell mit Dunnett's Korrektur auf multiples Testen berechnet. \* =  $p \leq 0,05$ .

### 3.1.4.2 miRNA-107 erhöht Legionellen Replikation

Eine gesteigerte Infektionsrate im Screening kann sowohl durch eine erhöhte intrazelluläre Replikation als auch eine gesteigerte Aufnahme der Bakterien verursacht gewesen sein. Aus diesem Grund wurden miRNA-107 transfizierte THP-1 Zellen infiziert und nach 2 h und 6 h Proben per Durchflusszytometrie analysiert. Im Vergleich zur Kontroll-miRNA ergab sich dabei keine signifikante Veränderung der Anzahl infizierter Zellen. Dies lässt eventuell darauf schließen, dass zumindest miRNA-107 nicht die Aufnahme von Legionellen, sondern deren intrazelluläre Replikation erhöhen könnte.

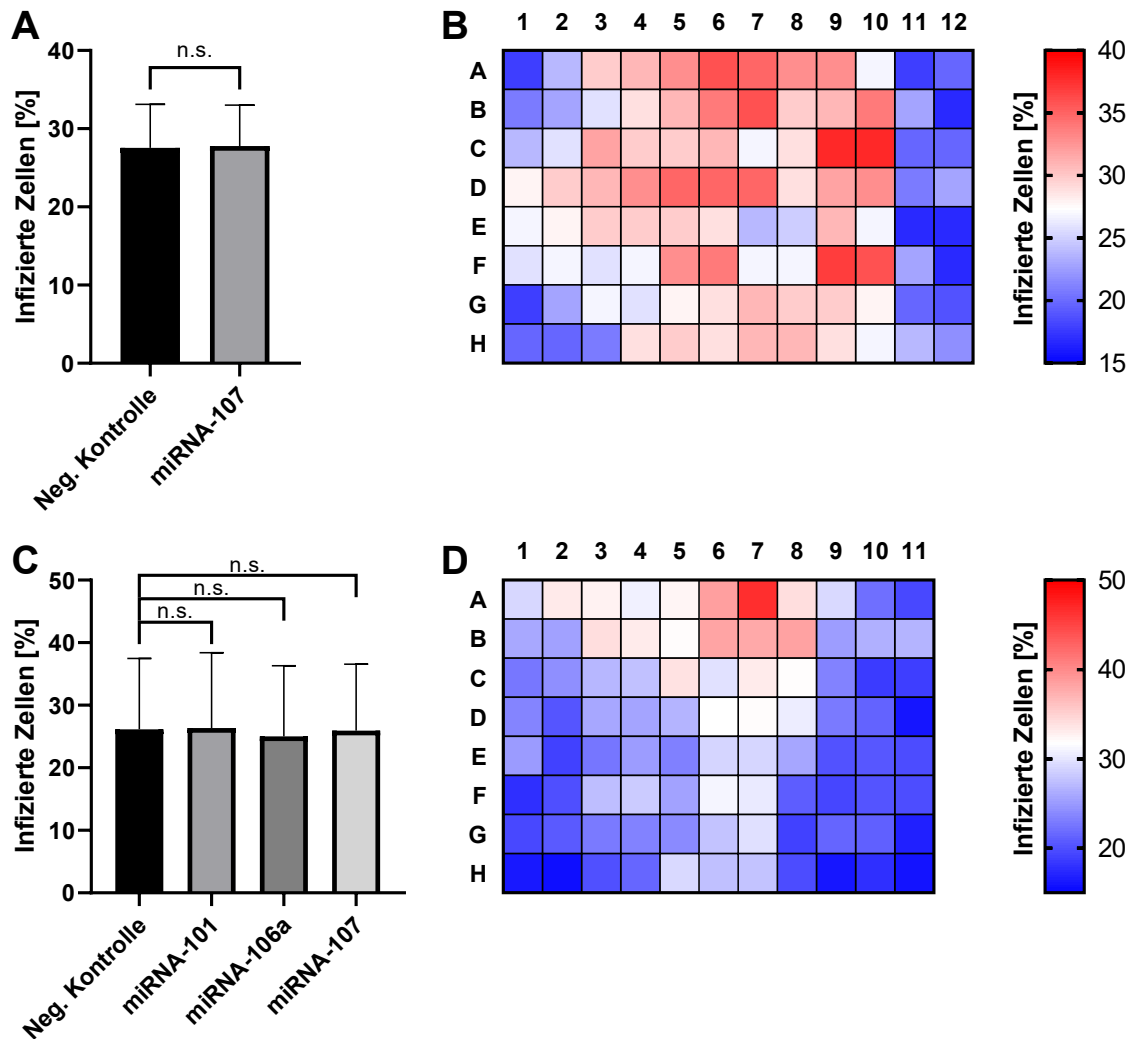


**Abbildung 3.8: miR-107 Transfektion beeinflusst Infektion bei kurzen Zeiträumen nicht.** THP-1 Zellen wurden mit miRNA-107 transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden aufgrund kurzer Zeiträume mit *Legionella pneumophila* in einer hohen Dosis von 100 für 2 h oder 6 h infiziert. Nach der angegebenen Infektionsdauer wurden Zellen abgelöst und per Durchflusszytometrie gemessen und die Infektionsrate anhand des GFP Signals ermittelt. Gezeigt sind Durchschnittswerte von drei biologischen Replikaten mit der jeweiligen Standardabweichung im Verhältnis zur dazugehörigen Negativkontrolle. Signifikanz zur miRNA Negativkontrolle wurde mit einem 2-way ANOVA mit Sidak Korrektur berechnet. n.s. = nicht signifikant.

### 3.1.4.3 miRNA-107 zeigt keinen Effekt bei Variante des Mikroskopie-Screenings

miRNA-107 Transfektion zeigte im Screening eine signifikante Steigerung der Infektionsrate und hatte in den CFU-Assays den höchsten Unterschied zur miRNA Negativkontrolle. Aus diesem Grund wurde eine Platte mit abwechselnden Spalten von mit miRNA Negativkontrolle oder miRNA-107 transfizierten THP-1 Zellen erstellt. Abbildung 3.9 A zeigt, dass dabei die miRNA-107 transfizierten Zellen im Schnitt keinen höheren Anteil an infizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle aufwies. Die Infektionsrate war jedoch stark abhängig von der Position auf der 96 Well Mikrotiterplatte (Abbildung 3.9 B).

In Folge wurde ein vergleichbares Experiment in drei unabhängigen Replikaten mit Hilfe der Automatisierungsplattform durchgeführt. Dabei wurden die drei Validierungs-miRNAs und die Negativkontrolle in einem Muster gleichmäßig über die Platte verteilt transfiziert. Auch hier ergab sich im Schnitt bei keiner der drei miRNA Transfektionen eine erhöhte Infektionsrate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.9 C). Die Abhängigkeit der Infektionsrate von der Position war auch bei gemittelten Werten von drei biologischen Replikaten zu beobachten (Abbildung 3.9 D), wobei sich in diesen Experimenten die Verteilung hoher und niedriger Werte änderte. Diese Variation könnte auf unterschiedliche Lagerbedingungen zurückzuführen sein. Bei automatisiertem Pipettieren wurden die Platten zwischen den einzelnen Prozessen in Stapelvorrichtungen in einem Inkubator gelagert. Diese könnten Einfluss auf den Luftzug, im Gegensatz zur Lagerung beim händischen Pipettieren ohne diese Vorrichtungen, haben.



**Abbildung 3.9: miRNAs-101, 106a und 107 verändern die Infektionsrate nicht.** THP-1 Zellen wurden händisch mit 50 nM Negativkontrolle (ungerade Spaltenzahlen) oder miRNA-107 (gerade Spaltenzahlen) transfiziert (A/B). Alternativ wurde per Robotik 50 nM miRNAs-101, 106a, 107 oder miRNA Negativkontrolle in einem gleichmäßigen Muster (vierer-Blöcke der miRNAs) über eine 96-Well Platte transfiziert (C/D). Nach 24 h wurde mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Die Auswertung der Infektionsrate erfolgte aufgrund zeitlichen Unterschieds zwischen den Experimenten über die Nikon NIS-Elements Software (A/B) oder durch die AG Freisleben angefertigten Auswertesoftware (C/D). (B/D) zeigen die Infektion der transfizierten Zellen in % per Well der 96 Well Mikrotiterplatte. Gezeigt sind Durchschnittswerte bzw. Einzelwerte von 48 technischen Replikaten (A bzw. B) und Durchschnittswerte von drei biologischen mit jeweils 20-24 technischen Replikaten (C/ D) mit der dazugehörigen Standardabweichung. Signifikanz zur miRNA Negativkontrolle wurde mit einem ungepaarten t-Test ( $\alpha = 0,05$ ) (A) oder einem 2-way ANOVA (C) ermittelt. n.s. = nicht signifikant.

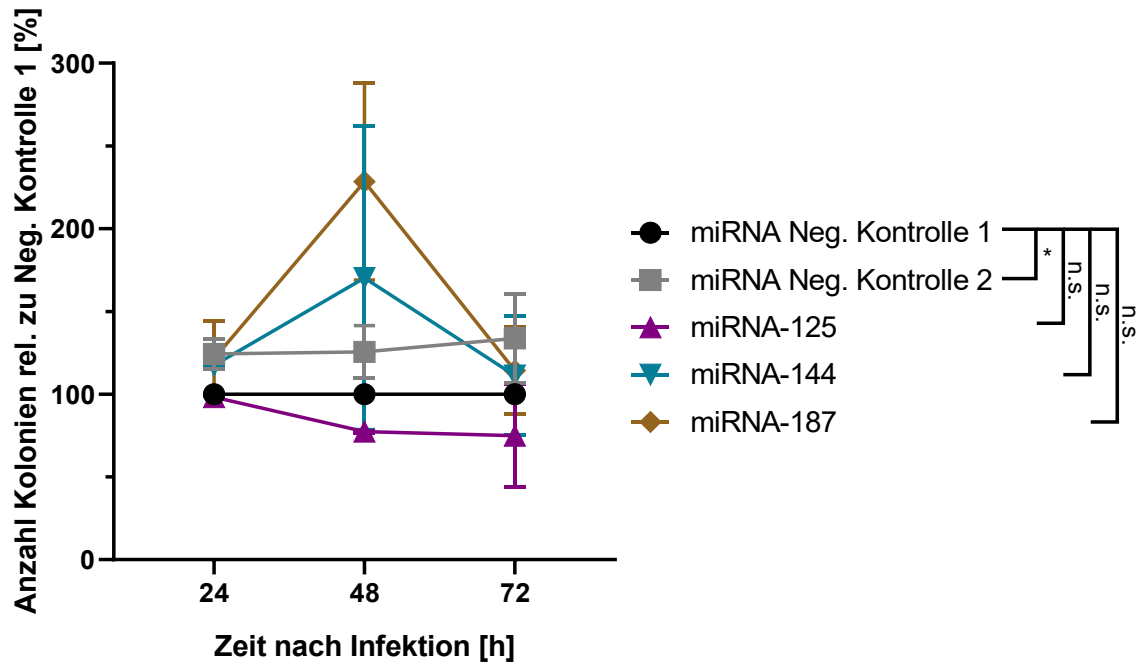
#### 3.1.4.4 miRNAs-125a-5p, 144-3p und 187-3p beeinflussen *L. pneumophila* Infektion

Da alle zuvor getesteten miRNAs zur Validierung der Screening Ergebnisse in CFU-Assays erfolgreich in ihrer Validierung waren und auch mit dieser Methode einen Anstieg im Vergleich zur miRNA-Negativkontrolle ergeben haben, sollten weitere miRNAs getestet werden von denen entweder kein oder ein negativer Einfluss auf die Replikation der Legionellen erwartet wurde.

Ausgewählt wurden miRNAs-125a, 144 und 187. miRNA-125a zeigte im Screening keine Veränderung zur Negativkontrolle (Wert: 0,986; Standardabweichung: 0,007; n = 3). miRNA-144 zeigte eine Reduktion der Infektionsrate (Wert: 0,664; Standardabweichung: 0,157; n = 3). miRNA-187 war auf den bisher gescreenten Platten nicht vorhanden, zeigte jedoch in vorherigen Experimenten von Wilhelm Bertrams aus der AG Schmeck keine Veränderung gegenüber der dazugehörigen Kontrolle. Gegenüber diesen Vorexperimenten wurden jedoch hier miRNAs von einem anderen Hersteller sowie ein anderes Transfektionsreagenz verwendet. Zusätzlich wurde eine weitere Negativkontrolle (miRNA Negativkontrolle 2) getestet um einen möglichen Einfluss von Kontroll-miRNAs feststellen zu können.

Wie in Abbildung 3.10 gezeigt regulierte miRNA-125a die Koloniezahl leicht negativ und lag damit im Rahmen der Erwartungen. miRNA-144 zeigte einen unerwarteten Anstieg in Kolonien 48 h nach Infektion was gegenteilig zu den Screening Ergebnissen steht. Diesen Anstieg gegenüber der Negativkontrolle 1 zeigte auch miRNA-187 wo keine Regulation erwartet worden war. In allen drei Fällen war die Regulation jedoch nicht signifikant, was potentiell durch größere Schwankungen der Ergebnisse zu erklären ist.

Die zusätzliche miRNA Negativkontrolle 2 zeigte bei drei biologischen Replikaten zu allen untersuchten Zeitpunkten rund 25 % höhere Werte als die ursprünglich verwendete Kontrolle.



**Abbildung 3.10: miRNAs-125a, 144 und 187 beeinflussen *Legionella pneumophila* Infektion.** THP-1 Zellen wurden mit den jeweiligen miRNAs in einer Konzentration von 50 nM transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 0,5 für 24, 48 und 72 h infiziert. Koloniebildende Einheiten wurden nach der jeweiligen Infektionsdauer bestimmt. Gezeigt sind Durchschnittswerte von zwei bis drei Replikaten mit dem dazugehörigen SEM. Signifikanz zur miRNA Negativkontrolle wurde mit einem angepassten gemischten Modell mit Dunnett's Korrektur auf multiples Testen berechnet. n.s. = nicht signifikant, \* =  $p \leq 0.05$

### 3.1.5 Durch Randeffekte und Validierung bedingter Fokuswechsel

Die in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Randeffekte, welche die Infektionsrate in den äußeren Wells einer Mikrotiterplatte senken, konnten nicht behoben werden. Als leichte Verbesserung des Assays können Ergebnisse mathematisch, entsprechend ihrer Position auf der Platte, korrigiert werden. Drei der miRNAs, welche im ersten Teilscreening mit drei *Library* Platten signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle zeigten, sollten in Kapitel 3.1.4 validiert werden. Dabei zeigte sich in Ergebnissen von CFU-Assays die erwartete Steigerung der Kolonienanzahl und somit der intrazellulären Replikation der Legionellen. Einer erfolgreichen Validation sprach allerdings entgegen, dass bei Durchführung des Screeningverfahrens mit vielen Replikaten mit den ausgewählten miRNAs, der Effekt auf die Infektionsrate nicht mehr detektierbar war.

Zusammengenommen führten die im Teilscreening erhobenen Daten zwar zu miRNAs mit potentieller Wirkung auf die Infektion von Makrophagen durch Legionellen, doch erscheint das Verfahren als zu unsicher, um verlässlich damit nach weiteren miRNAs zu suchen. Die gefundenen miRNAs könnten trotz ursprünglicher Signifikanz im Screening aufgrund von Randeffekten ausgewählt worden sein und durch Zufall zu späteren Zeitpunkten eine Wirkung auf die Infektion haben. Der Nachweis der veränderten Infektion nach 16 h Inkubation mit *Legionella pneumophila* über das Screening-Verfahren, kann somit nicht wirksam dazu genutzt



werden miRNAs mit einem Einfluss auf die Infektion zu ermitteln. Aus diesem Grund wurde das weitere miRNA-Screening mit dem geplanten Verfahren eingestellt.

Eine Alternative zur miRNA-*Library* war es eine selbst zusammengestellte Sammlung bioreaktiver Substanzen zu untersuchen. Aufgrund ihres geringeren Umfangs bat dies die Möglichkeit die etablierte Methode weiter zu verwenden und ihre Anwendung bei kleineren Umfängen zu untersuchen. Da bei den zu validierenden miRNAs aber signifikante Steigerungen der Legionellenreplikation auch in CFUs detektiert wurden, sollte deren Wirkung auf die Legionellen-Makrophagen Interaktion trotzdem weiter untersucht werden.

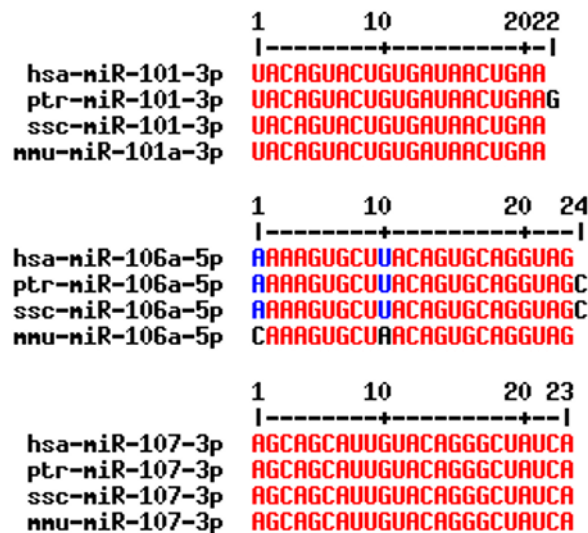
Dementsprechend teilt sich diese Arbeit im Folgenden in zwei Themen auf. In Kapitel 3.2 wird beschrieben wie die ursprünglich zur Validierung verwendeten miRNAs-101, 106a und 107 auf ihren Einfluss auf die Infektion durch *L. pneumophila* hin analysiert wurden. In Kapitel 3.3 wird dargestellt, wie die Transfektion von miRNAs durch bioreaktive Substanzen und Inhibitoren verschiedener Stoffwechsel- sowie Signalwege im Screeningverfahren ersetzt, und dieses entsprechend modifiziert wurde. Zudem wird beschrieben wie dadurch ermittelte Stoffe die Infektion von *Legionella pneumophila* regulieren.

### **3.2 Funktionelle Analyse der miRNAs-101, 106a und 107 mit Bezug auf die *Legionella pneumophila*-Replikation**

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurden trotz der Einstellung des geplanten miRNA-Screenings miRNAs-101, 106a und 107 als interessante Kandidaten für die weitere Untersuchungen bestimmt. Dabei war die Steigerung der Koloniezahlen von mit *Legionella pneumophila* infizierten Makrophagen in CFUs der Ausgangspunkt. In Folge sollten die durch die miRNAs regulierten mRNAs identifiziert werden und so Proteine als mögliche Verursacher der gesteigerten Legionellenreplikation auffindig gemacht werden.

Abbildung 3.11 zeigt, dass die ausgewählten miRNAs in Säugetieren praktisch komplett konserviert sind. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass diese aufgrund von Selektionsdruck für die Zelle relevante Funktionen ausüben und Signalwege oder Prozesse regulieren, die für die Zelle von entscheidender Bedeutung sind.

Zur Identifikation der von den miRNAs beeinflussten Proteinen wurden zunächst qRT-PCRs sowie Western Blots verwendet, bevor im Anschluss Protein-Proben einer Versuchsreihe über Massenspektrometrie gemessen und analysiert wurden.



**Abbildung 3.11: Konservierung der miRNAs-101, 106a und 107.** miRNA Sequenzen des Menschen, Schimpansen, Schweins und Maus (*Homo sapiens* [hsa], *Pan troglodytes* [ptr], *Sus scrofa* [ssc], *Mus musculus* [mmu]) wurden über mirbase.org bezogen und mittels des Webtools <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> verglichen.

### 3.2.1 Identifizierung regulierter Ziele mittels qRT-PCR und Western Blots

#### 3.2.1.1 qRT-PCRs

Um die Auswirkungen eines erhöhten miRNA-101, 106a oder 107 Levels auf Signalwege, welche zur Steigerung der Infektion beitragen, zu bestimmen, wurden verschiedene Transkripte als mögliche Ziele dieser miRNAs ausgewählt. Eine Auswahl erfolgte anhand von Vorhersagen und Literaturrecherche. Mögliche Veränderungen in der Expression dieser Transkripte sollten zunächst per qRT-PCRs analysiert werden.

Dafür wurden IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  als M1 Polarisationsmarker, S100A8 und TREM2 als Differenzierungsmarker für jeweils Mono- bzw. Makrophagen sowie IL-6 und IL-10 als Entzündungsmarker ausgewählt. Polarisations- und Differenzierungsmarker wurden unabhängig von der miRNA Behandlung und Vorhersagen gewählt, da eine verminderte Spezialisierung der Zellen auf eine Infektion durch bakterielle Pathogene Einfluss auf deren Replikation haben könnte. Die beiden Entzündungsmarker wurden aufgrund von Vorhersagen zur möglichen Bindung zwischen miRNA und mRNA ausgewählt.

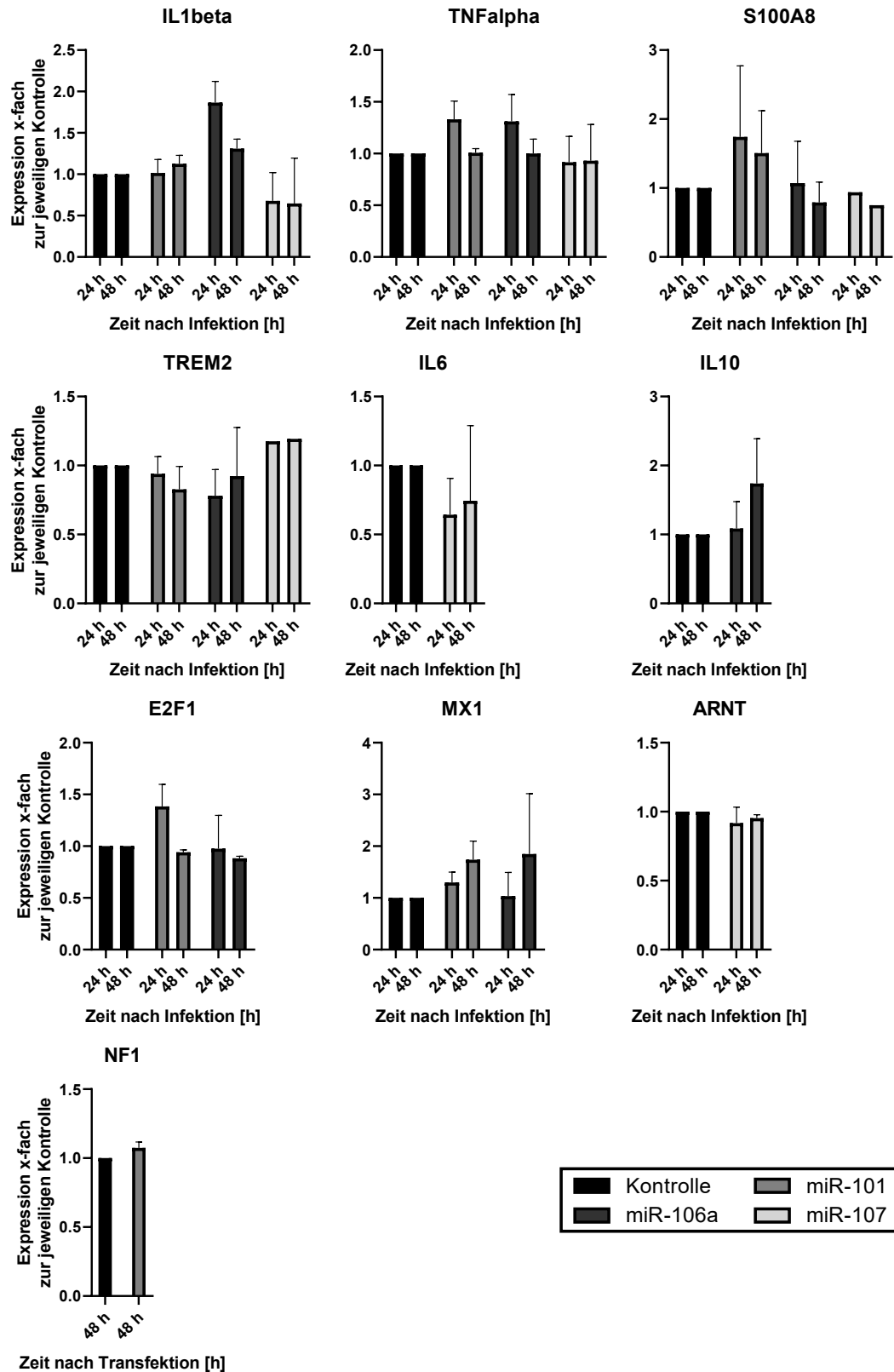
miRNA-106a weist dieselbe Seed-Region wie miRNA-17 und miRNA-107 dieselbe Seed-Region wie miRNA-103 auf. E2F1 und MX1 wurden als Bindungspartner für miRNA-17 vorhergesagt. Ebenso ARNT und NF1 als Bindungspartner für miRNA-103 (Scheller, Herold et al. 2019). Über eine Analyse mittels der Ingenuity pathway analysis Software wurden die vier mRNAs ebenfalls als potentielle Bindungspartner der miRNAs-106a beziehungsweise 107 identifiziert.

Über mehrere Datenbanken (miRTarBase) beziehungsweise Algorithmen (TargetScan7, TargetMiner, miRDB, miRWalk) wurden potentielle miRNA Bindestellen in den untranslatierten Regionen (UTRs) vorhergesagt. Dabei wurden HIF1A und APP (miRNA-101/106a), ATM (miRNA-106a), CDK6 (miRNA-107) ermittelt. AKT1, AKT2 sowie MTOR (miRNA-106a) wurden aufgrund des in Abbildung 3.4 gezeigten Signalweges und entsprechender Vorhersagen für miRNA-101 getestet. NOTCH1 und EZH2 wurden in der Literatur als potentielle Bindungspartner für miRNA-101 gefunden (Qian, Zhang et al. 2016, Wang, Meng et al. 2016, Hou, Li et al. 2017).

Wie in Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13 zu sehen ist, wurde bei Erhöhung des jeweiligen miRNA-Levels für IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , S100A8, TREM2, IL-6, IL-10, ARNT, NF1, HIF1A, ATM, CDK6, MTOR, NOTCH1 und EZH2 keine, eine unverhältnismäßig kleine oder eine inkonsistente Änderung der Expression gegenüber der miRNA-Negativkontrolle gemessen.

E2F1 wies bei miRNA-101 Transfektion 24 h nach Infektion eine Steigerung gegenüber der Negativkontrolle auf. MX1 und APP zeigten ebenso zu 48 h nach Infektion erhöhte Signale bei angegebenen Transfektionen. CDK6 zeigte bei erhöhtem miRNA-101 Level eine leichte Reduktion und AKT1 sowie AKT2 Expression sank nach Transfektion mit miRNA-106a 48 h nach Infektion leicht.

Durch die Funktionsweise von miRNAs mittels eines Proteinkomplexes mRNAs zu binden und die Translation dieser zu hemmen wurden für die ausgewählten Gene eine Signalreduktion gegenüber der Kontrolle erwartet. Davon ausgenommen waren die Polarisations- und Differenzierungsmarker, da diese unabhängig von Vorhersagen gewählt wurden. Reduzierte Werte waren nur für CDK6 sowie AKT1 und AKT2 zu messen, welche aber schwach ausfielen und so keinen deutlichen Aufschluss über die Interaktionen der drei Test-miRNAs zuließen.



**Abbildung 3.12: qRT-PCRs nach miRNA-101, 106, 107 Transfektion.** THP-1 Zellen wurden mit den angezeigten miRNAs in einer Konzentration von 50 nM transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden, wenn angegeben, mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 0,5 für 24 h bzw. 48 h infiziert und zu diesen Zeitpunkten, oder schon nach der Differenzierung RNA isoliert sowie anschließend qRT-PCRs durchgeführt. Gezeigt sind Durchschnittswerte von zwei bis vier biologischen Replikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung.

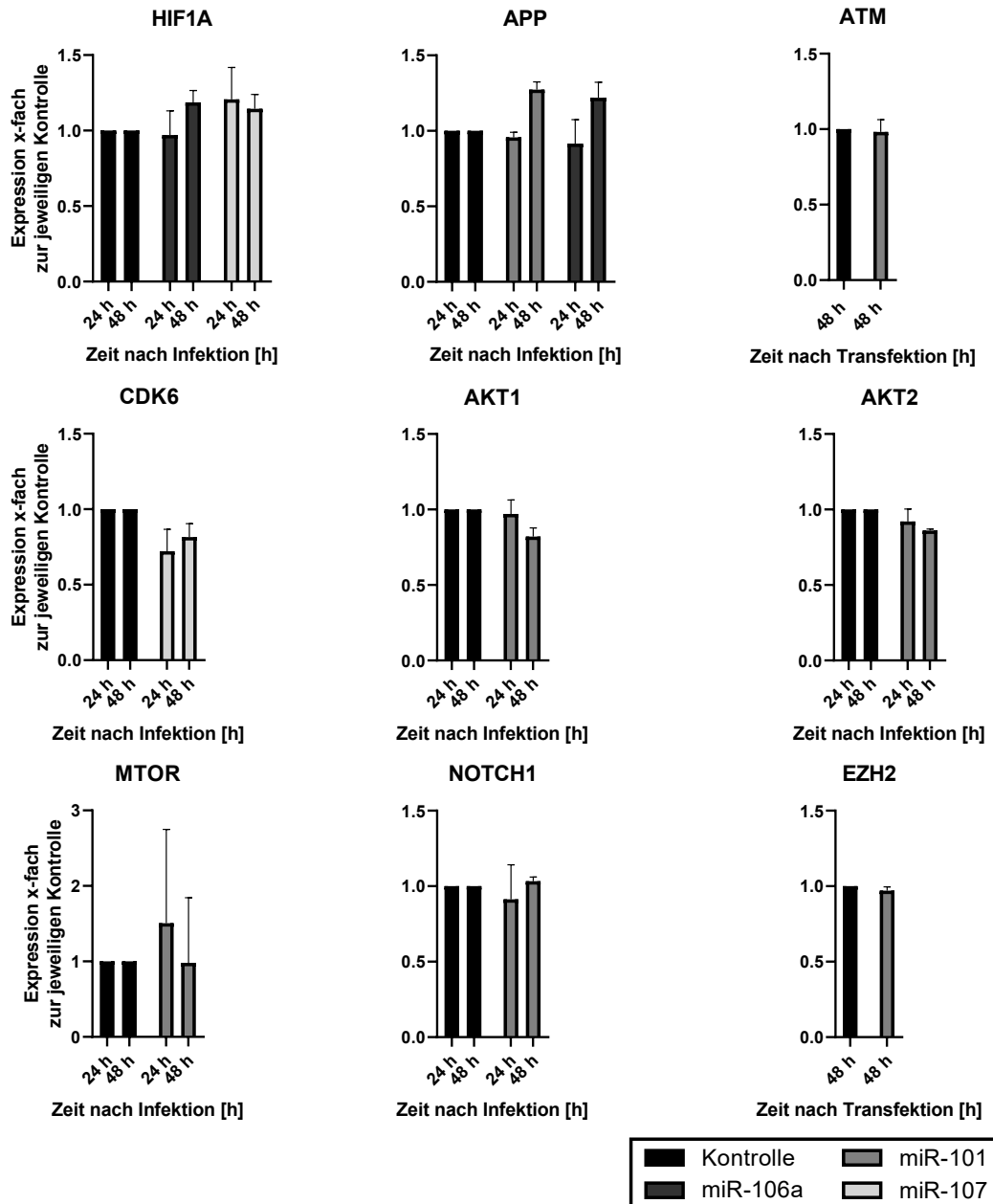
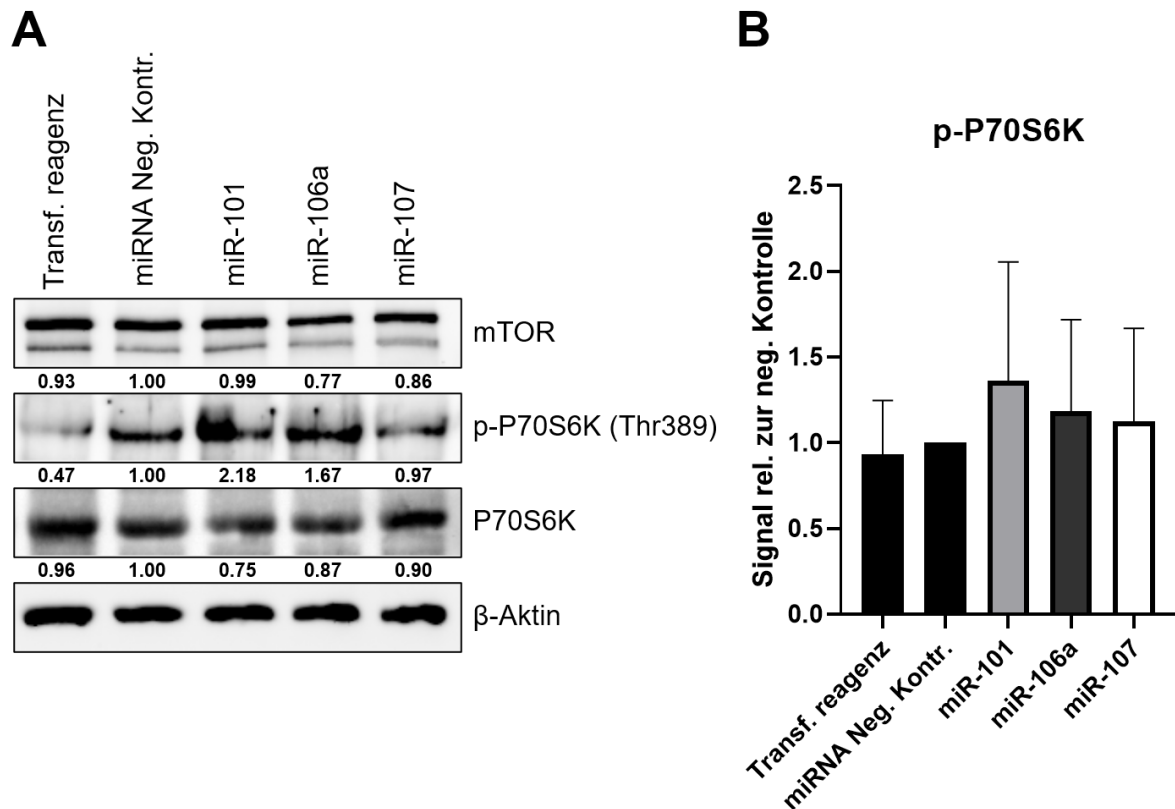


Abbildung 3.13: qRT-PCRs nach miRNA-101, 106, 107 Transfektion. Fortsetzung der Grafik der vorherigen Seite.

### 3.2.1.2 Western Blots

Da zuvor schon wie in Abbildung 3.4 gezeigt miRNAs-101, 106a und 107 in der Regulation des mTOR Signalweges involviert sein könnten, sollte die Aktivität des mTORC1 Komplexes gemessen werden. Dieser Komplex enthält neben weiteren Proteinen mTOR und phosphoryliert die Kinase P70S6K (Saxton und Sabatini 2017). Obwohl P70S6k an mehreren Positionen phosphoryliert werden kann ist besonders die Phosphorylierung an Threonin 389 repräsentativ für die Aktivität des Proteins (Pullen und Thomas 1997, Weng, Kozlowski et al. 1998). Diese Position wurde somit für die Analyse der Aktivität über Western Blots ausgewählt.

Abbildung 3.14 zeigt einen repräsentativen Western Blot und die Quantifizierung von vier Replikaten in denen die Transfektion der miRNAs, v.a. miRNA-101, die Aktivität des mTORC1 Komplexes tendenziell steigerte ohne die Expression von mTOR selbst zu beeinflussen.



**Abbildung 3.14: Western Blot zur Aktivität des mTORC1 Komplexes.** THP-1 Zellen wurden mit den jeweiligen miRNAs transfiziert bzw. mit gleicher Menge Transfektionsreagenz versetzt und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Zellen wurden nach Differenzierung mit RIPA lysiert, gleiche Mengen an Proteinen aufgetrennt und mittels Immunmarkierung detektiert. Signale für mTOR und P70S6K wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert, phosphoryliertes P70S6K (p-P70S6K) auf P70S6K und Signale relativ zur Negativkontrolle berechnet. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot (A) sowie Durchschnittswerte von vier Replikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung (B).

### 3.2.2 Identifizierung regulierter Ziele mittels Massenspektrometrie

Wie zuvor gezeigt, ermöglichten die mittels qRT-PCR ermittelten Gene mit reduzierter Expression keine Aussage über die Interaktionen der drei Test-miRNAs. Die inkonsistenten Western Blot Ergebnisse zur Aktivität des mTORC1 Komplexes zeigten nur eine potentielle Involvierung dieses Signalweges in der Infektion mit *Legionella pneumophila*.

Durch die Methode bedingt eignen sich qRT-PCRs und Western Blots, um jeweils einzelne, potentiell unterschiedlich stark vorhandene, mRNAs beziehungsweise Proteine zu messen. Um mittels eines Hochdurchsatzverfahrens das gesamte Proteom der Zellen zu analysieren, wurden

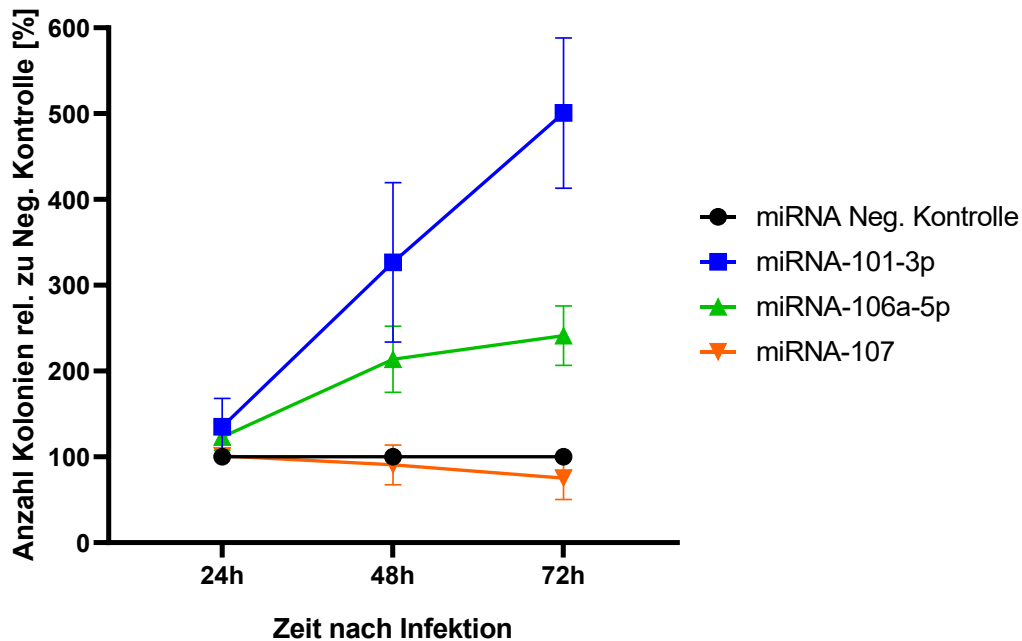
Proben von transfizierten Makrophagen mittels markierungsfreier Massenspektrometrie untersucht und Proteinkonzentrationen quantifiziert.

Da weitere Versuche mit qRT-PCRs und Western Blots nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit notwendige Informationen ergeben hätten, um die beteiligten Signalwege aufzudecken, wurde zu einem ganzheitlicheren Ansatz gewechselt.

### 3.2.2.1 Wechsel des Transfektionsreagenzes und Probenvorbereitung

Bei der Erstellung der für die Massenspektrometrie benötigten Proben wurde beobachtet, dass die mit siPORT Neo FX durchgeführten Transfektionen nicht mehr den zuvor beobachteten Transfektionseffizienzen erreichten. So fielen Werte der Überexpression unabhängig von der transfizierten miRNA nach einem Chargenwechsel auf jeweils unter 25 % der vorher beobachteten Werte (miRNA-101: 1600-fach; miRNA-106a: 140-fach; miRNA-107: 1600-fach). Im Zuge dessen, wurde auf Viromer GREEN als neues Transfektionsmittel gewechselt, womit die ursprünglichen oder sogar höhere Level an Transfektionseffizienz erreicht wurden. Das Transfektionsprotokoll wurde entsprechend angepasst und ist unter Kapitel 1.1.1 zu finden.

Abbildung 3.15 zeigt CFU-Assays in denen THP-1 Zellen mit miRNA-101, 106a und 107 transfiziert wurden. Als Transfektionsreagenz wurde Viromer GREEN verwendet. Der zuvor in Abbildung 3.7 gezeigte Effekt, dass miRNA-101, 106a und 107 die Anzahl der koloniebildenden Einheiten erhöhen, lies sich für miRNA-101 sowie miRNA-106a replizieren oder verstärkte sich sogar. Warum eine Steigerung der Kolonienanzahl für miRNA-107, trotz nachgewiesener Überexpression, ausblieb konnte nicht geklärt werden.



**Abbildung 3.15: miRNA-101 und 106a steigern Kolonienanzahl in CFU-Assays mit Viomer GREEN.** THP-1 Zellen wurden mit den jeweiligen miRNAs transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 0,5 für bis zu 72 h infiziert. Koloniebildende Einheiten wurden nach der jeweiligen Infektionsdauer bestimmt. Gezeigt sind Durchschnittswerte von drei bis sieben Replikaten mit dem dazugehörigen SEM.

Da miRNA-101 und miRNA-106a auch bei Transfektion mit Viomer GREEN eine Veränderung der intrazellulären Replikation von Legionellen verursachten, sollte eine massenspektrometrische Untersuchung des Proteoms durchgeführt werden. Proben, die mit miRNA-107 transfiziert waren, wurden trotz fehlender Validierung im CFU-Assay ebenfalls untersucht.

Die Zellpellets für die Massenspektrometrie wurden wie folgt erstellt: THP-1 Zellen wurden mit 50 nM der jeweiligen miRNA (101, 106a, 107, neg. Kontrolle) transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für weitere 24 h differenziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden nicht infizierte Zellpellets eingefroren ( $t_{0h}$ ). Anschließend wurden die restlichen Zellen mit *Legionella pneumophila* bei einer MOI von 0,5 infiziert. Nach 18 h und 36 h Infektion wurden Zellpellets infizierter Zellen gewonnen und weggefroren ( $t_{18h}$  und  $t_{36h}$ ). Alle Proben wurden in vier Replikaten erstellt, was insgesamt in 48 Proben resultierte.

In vorherigen Experimenten lag das Wirkungsmaximum bei 48 h nach Infektionsstart. Da erwartet wurde, dass dafür verantwortliche Prozesse auf Proteinebene früher ihr Maximum erreichen, wurde der 36 h Zeitpunkt gewählt. Um einen graduellen Verlauf der Proteinkonzentrationen zu bestimmen wurden Proben auch nach der Hälfte der Zeit, also 18 h nach Infektion erstellt. Obwohl die Kurven des mit Viomer Green durchgeführten CFUs in



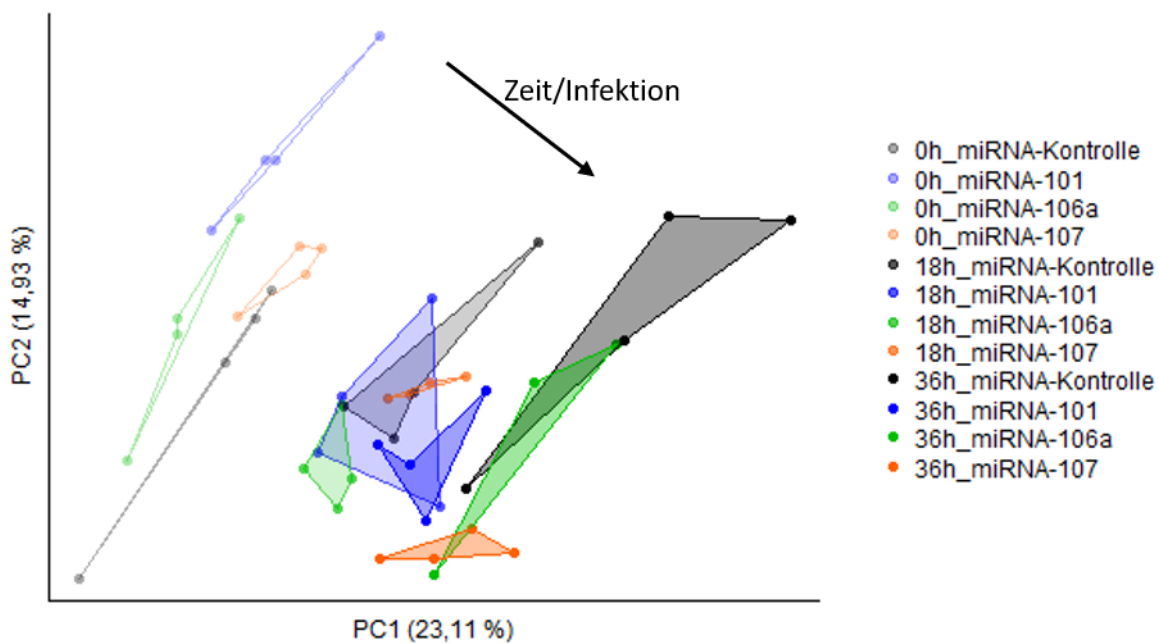
Abbildung 3.15 nicht die Reduktion der Replikation nach 48 h wie in Abbildung 3.7 zeigen, wurden die ursprünglich geplanten Zeitpunkte beibehalten.

Durch die beschriebene Zusammenstellung der Proben wurden zwei unterschiedliche Analysemethoden möglich. Zum einen ermöglicht der Vergleich zwischen  $t_{0h}$ ,  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$  der mit miRNA Kontrolle transfizierten Zellen, den Effekt der Infektion auf die Proteinkonzentrationen zu untersuchen. Zum anderen kann durch den Vergleich der miRNA-101, 106a oder 107 transfizierten Zellen zur miRNA Negativkontrolle, der Effekt der jeweiligen miRNA bestimmt werden.

Die Analyse der durch miRNA Transfektion regulierte Proteine, Proteinklassen oder Signalwege mit Bezug zur Infektion waren das vorwiegende Ziel der Auswertung.

### 3.2.2.2 Hauptkomponentenanalyse der Massenspektrometrie-Daten

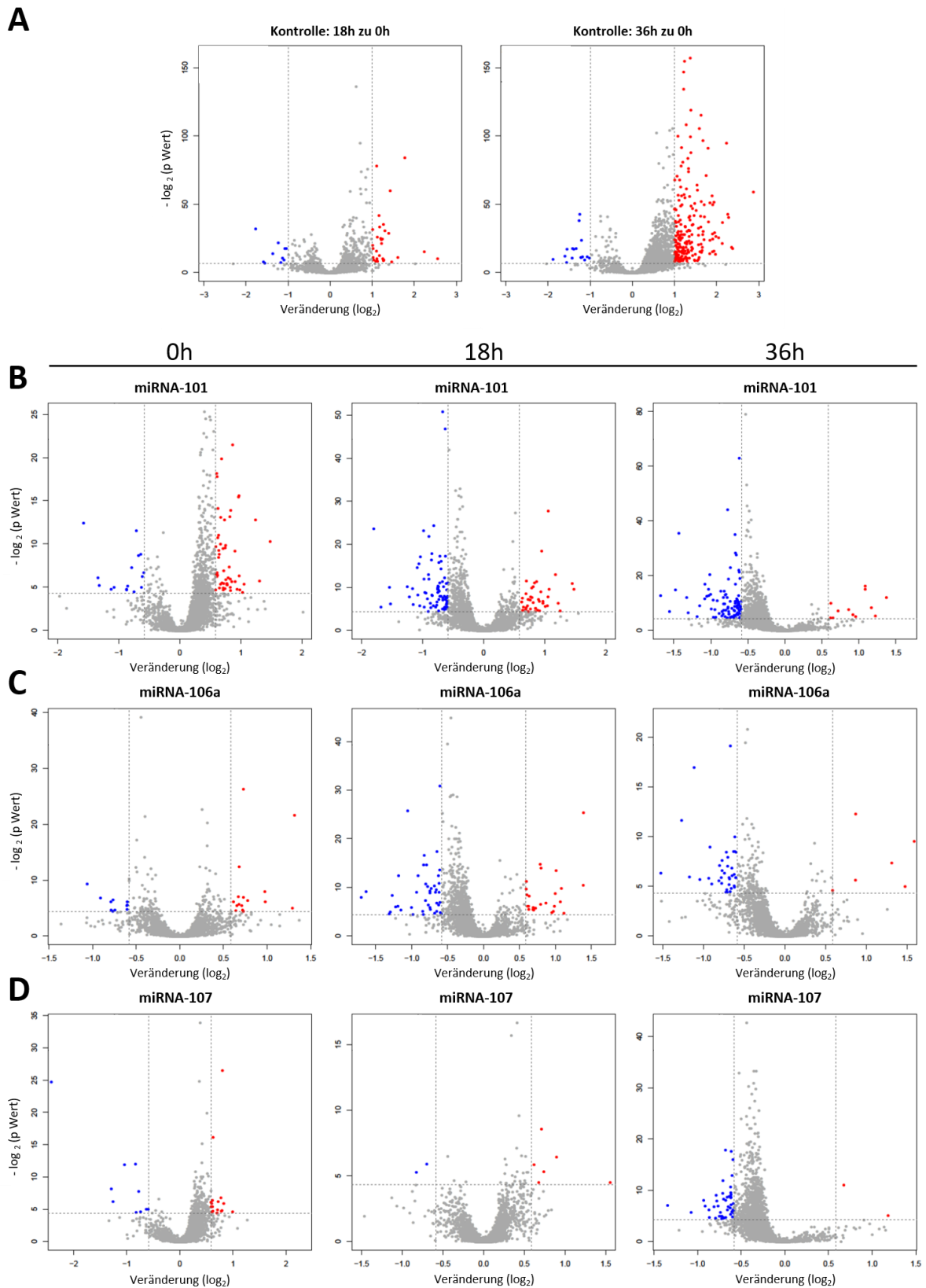
Um zu ermitteln wie ähnlich die erhobenen Datensätze zueinander sind wurden diese mittels einer Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principal component analysis*; PCA) analysiert. Diese zeigte, dass eine der vier mit miRNA-106a transfizierten Proben zu  $t_{36h}$  weit abseits der restlichen Proben lokalisierte, sich somit deutlich von den anderen Replikaten in ihren Proteinkonzentrationen unterschied und dementsprechend aus den folgenden Analysen entfernt wurde. Abbildung 3.16 zeigt eine Hauptkomponentenanalyse nach Entfernen dieser Probe. Daraus wird ersichtlich, dass sich die Proben hauptsächlich entsprechend ihres Zeitpunktes an denen sie erhoben wurden, also  $t_{0h}$ ,  $t_{18h}$  beziehungsweise  $t_{36h}$ , aufteilen. Die durchgeführten miRNA Transfektionen haben untereinander einen kleineren Effekt auf die Gesamtheit der Proteinkonzentrationen als die durch die Infektion bzw. den zeitlichen Verlauf verursachten Änderungen. miRNAs binden mRNAs mit entsprechenden Sequenzen spezifisch und regulieren deren Translation, was eher zur Veränderung von einzelnen Proteinmengen als zu generellen Änderungen über alle Proteinmengen hinweg führt. Das beobachtete Clustern nach Infektionsdauer entsprach somit den Erwartungen.



**Abbildung 3.16: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Massenspektrometrie-Daten.** Zur Erstellung wurden die mittleren Intensitäten der drei abundantesten Peptide verwendet.

### 3.2.2.3 Volcano plots der Massenspektrometrie-Daten

Um zu bestimmen in welche Richtung die einzelnen Proteine tendenziell durch die Behandlung mit miRNAs bzw. die Infektion mit *Legionella pneumophila* reguliert sind wurden *Volcano plots* erstellt. Abbildung 3.17 A zeigt, dass bei Proben, die mit der miRNA Negativkontrolle transfiziert wurden, im Vergleich zu  $t_{0h}$  über 36 h die Expression einer Vielzahl an Proteinen ansteigt und bei deutlich weniger Proteinen eine Reduktion der Proteinmenge erfolgt. Abbildung 3.17 B-D zeigt die selbe Analyse, mit angepassten Grenzwerten der Signifikanz, für die miRNA-101, 106a oder 107 transfizierten Proben im Vergleich zur Kontroll-miRNA des selben Zeitpunkts. Daraus ist ersichtlich, dass miRNA-101 mehr signifikante Veränderungen an Proteinkonzentrationen ausgelöst hat als miRNA-106a oder miRNA-107. Zudem sind zum Zeitpunkt der Infektion ( $t_{0h}$ ) mehr Proteine erhöht, was sich im Verlauf von 36 h umdreht. Zu  $t_{36h}$  ist für jede Probe mit transfizierter miRNA der Großteil der Proteine im Vergleich zur Kontrolle reduziert.



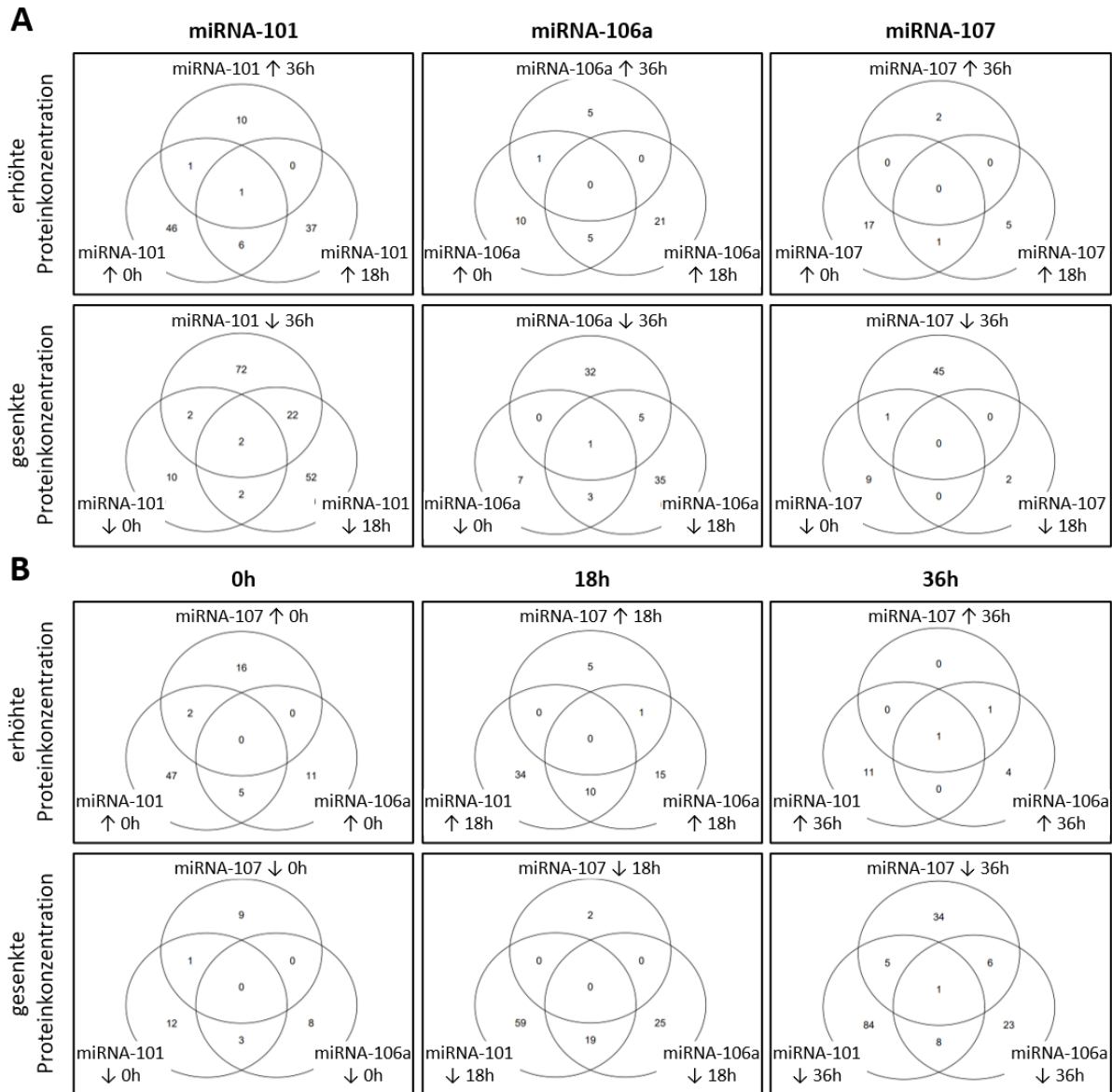
**Abbildung 3.17: Volcano plot der Massenspektrometrie Proben zu den jeweiligen Kontrollen.** Proteinmengen wurden als signifikant gewertet, wenn  $p \leq 0,01$  (A) oder  $p \leq 0,05$  (C-D). Veränderungen der Proteinmenge wurden farblich gekennzeichnet, wenn  $|\log_2| \geq 1$  (A) oder  $0,585$  ( $\pm 50\%$ ; C-D) und signifikant. Grenzen für p-Werte und Mengenänderungen wurden abhängig von der Anzahl signifikant regulierter Proteine gesetzt. Rot entspricht einer Steigerung, blau einer Reduktion der jeweiligen Proteinmenge im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

### 3.2.2.4 Venn Diagramme der Massenspektrometrie-Daten

Da aus den Volcano plots nur der generelle Trend der Regulation sowie die Anzahl der veränderten Proteine je Zeitpunkt und Transfektionsbedingung hervorgeht, wurden Venn Diagramme erstellt. In Abbildung 3.18 A wurden die zuvor gezeigten Proteine mit Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) und einer minimalen Änderung der Proteinmenge um 50 % aufgetrennt in gesteigerte/reduzierte Abundanz und die drei Zeitpunkte  $t_{0h}$ ,  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$  verglichen. Daraus ist wieder ersichtlich, dass miRNA-101 transfizierte Proben zu jedem Zeitpunkt am meisten regulierte Proteine zeigten. Es zeigten sich prozentual mehr Überschneidungen zwischen zwei Zeitpunkten bei Proteinen mit gesenkter Abundanz. Dabei gab es eine besonders hohe Überlappung zwischen dem  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$  Zeitpunkten für Proteine die durch miRNA-101 reguliert wurden.

In Abbildung 3.18 B wurden mit der selben Methodik die drei Transfektionen untereinander zu jeweils einem der Zeitpunkte verglichen. Die Transfektionen mit miRNA-101, 106a und 107 wiesen untereinander wenig geteilte Proteine mit derselben Regulation auf. Die Überschneidung zwischen miRNA-101 und miRNA-106a war aber ausgeprägter als mit miRNA-107.

Tabelle 3.2 listet alle signifikant regulierten Proteine auf, die bei einer Transfektion zu allen drei Zeitpunkten oder zu einem Zeitpunkt von allen drei miRNA-Transfektionen reguliert wurden. Mit HBA1, PLG, F2 und SERPINF2 sind unerwartet eine Untereinheit des Hämoglobins sowie drei Bestandteile des Blutgerinnungssystems in dieser Liste vertreten. PLG ist bekannt dafür durch Regulation der Makrophagen-Polarisation an der Auflösung von Entzündungen beteiligt zu sein (Sugimoto, Ribeiro et al. 2017). SERPINF2 stellt einen Inhibitor von Plasmin, einer aktivierten Version von PLG, dar (Carpenter und Mathew 2008). Die Regulation der beiden Proteine ist somit nicht zueinander schlüssig, aber könnte auf eine feinere Abstimmung der Regulation in diesem System hindeuten.



**Abbildung 3.18: Venn-Diagramme der regulierten Proteine.** Gezeigt sind gesteigerte/reduzierte Proteinkonzentrationen mit  $p \leq 0,05$  und 50 % Variation ( $|\log_2| \geq 0,585$ ) zur jeweiligen Kontrolle. Venn-Diagramme sind für je eine miRNA-Behandlung zu drei Zeitpunkten  $t_{0h}$ ,  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$  gezeigt (A) bzw. die Überschneidungen der drei miRNA-Behandlungen zu jeweils einem Zeitpunkt (B).

Tabelle 3.2: Proteine mit signifikanter Regulation zu drei Zeitpunkten bzw. in jeder Transfektion

| Protein  | miRNA Transfektion | Regulationsrichtung | Zeitpunkte               |
|----------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| HMGB1    | miRNA-101          | Erhöht              | $t_{0h}/t_{18h}/t_{36h}$ |
| HBA1     | miRNA-101          | Reduziert           | $t_{0h}/t_{18h}/t_{36h}$ |
| PLG      | miRNA-101          | Reduziert           | $t_{0h}/t_{18h}/t_{36h}$ |
| F2       | miRNA-106a         | Reduziert           | $t_{0h}/t_{18h}/t_{36h}$ |
| ATOX1    | miRNA-101/106a/107 | Erhöht              | $t_{36h}$                |
| SERPINF2 | miRNA-101/106a/107 | Reduziert           | $t_{36h}$                |

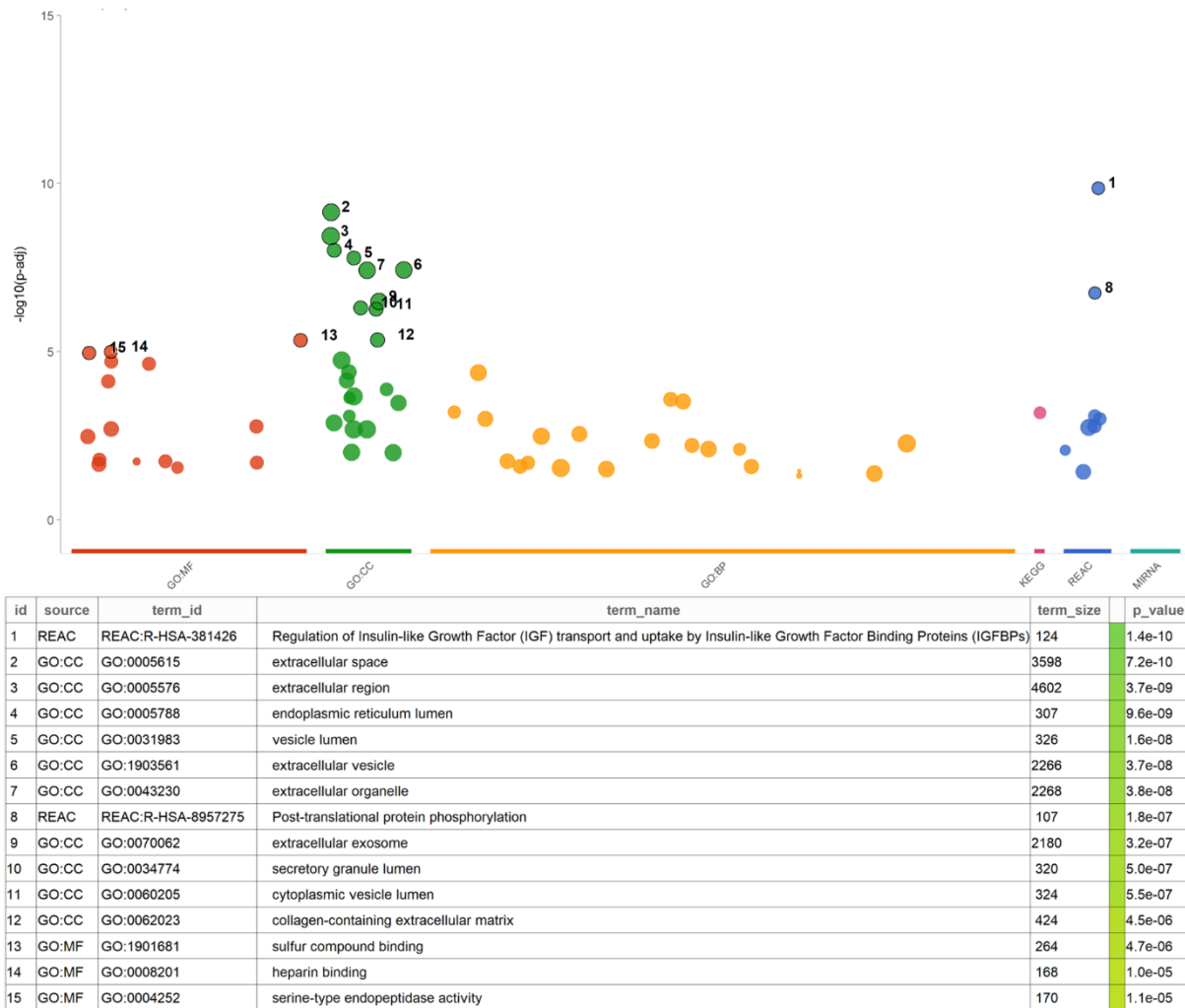
### 3.2.2.5 Analyse der involvierten Signalwege

Über die in 3.2.2.4 gezeigten Venn-Diagramme und den daraus erstellten Listen an regulierten Proteinen ließen sich keine einzelnen Vertreter bestimmen, die maßgeblich die Infektion durch *Legionella pneumophila* beeinflussen. Daher sollten entsprechende Signalwege beziehungsweise Proteinklassen ermittelt werden, die durch die einzelnen miRNA Transfektionen angereichert wurden und in Bezug zu einer Infektion stehen können.

Dafür wurde hauptsächlich das gProfiler2 Paket in R verwendet. Dieses Paket nutzt den Webservice g:Profiler (Raudvere, Kolberg et al. 2019) und stellt Ergebnisse wie in Abbildung 3.19 exemplarisch gezeigt dar. Die zuvor über die Venn-Diagramme erstellten Proteinlisten wurden dabei mit Listen von Signalwegen und zellulären Funktionen verglichen und bei ungewöhnlicher Anzahl an Überschneidungen diese Listen sortiert nach geringster zufälliger Wahrscheinlichkeit ausgegeben. Als hinterlegte Datenbanken wurden KEGG, Reactome, Gene Ontology (Molecular Function, Cellular Component, Biological Process) sowie miRTarBase verwendet.

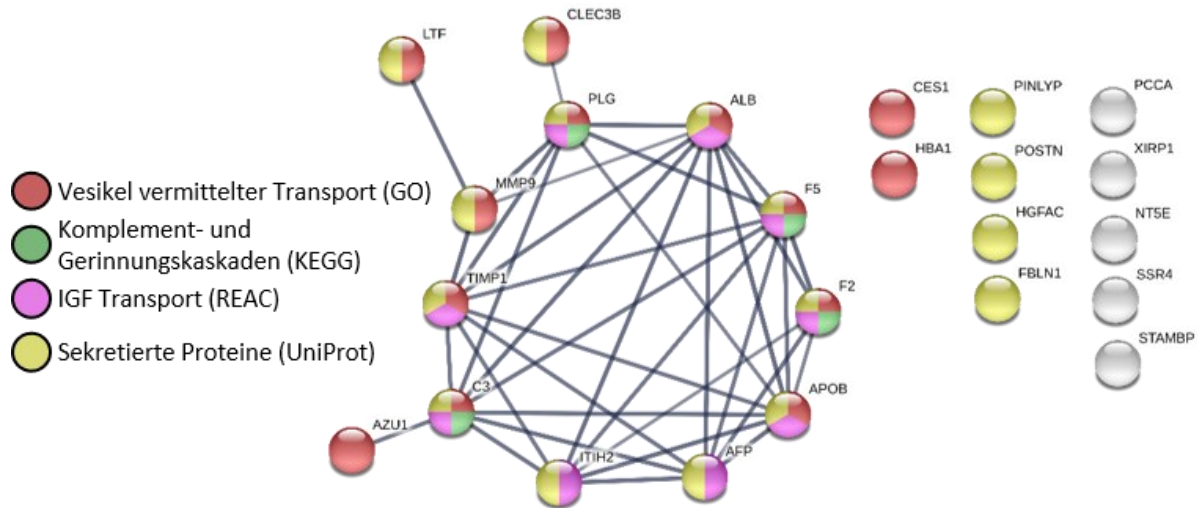
Die Analyse wurde vorwiegend mit den Proteinen durchgeführt, die zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten veränderte Konzentrationen gegenüber der Kontrolle aufwiesen, um eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zu haben, dass diese Proteine tatsächlich im Zusammenhang mit der miRNA Transfektion stehen. Da der Wirkmechanismus von miRNAs eine Reduktion ihrer Ziele zur Folge hat, wurden zudem vorwiegend Proteinlisten mit reduzierten Konzentrationen analysiert.

Als Kontrolle, ob durch diese Analyse relevante Ergebnisse entstehen, wurden alle 3594 detektierten Proteine in einer Liste an gProfiler2 übergeben. Dabei wurden nur Listen für intrazelluläre Lokalisationen über Gene Ontology Cellular Component ausgegeben. Dies beruht vermutlich auf der Anreicherung von Proteinen aus dem Zytoplasma und Nukleus, da Zellen bei der Probenvorbereitung zur Massenspektrometrie lysiert und zentrifugiert wurden. Proteine, welche extrazellulär oder in der Zellmembran lokalisiert sind wurden zuvor beziehungsweise dadurch größtenteils aus dem Datensatz entfernt. Die Nennung von Signalwegen oder Proteinklassen bei der Analyse der übergebenen Proteinlisten stellen somit Ergebnisse dar, die signifikant in den jeweiligen Listen angereichert sind. Ein Beispiel für eine solche Analyse ist in Abbildung 3.19 gezeigt. Dabei spiegelt die Liste die besten Treffer anhand des berechneten p-Wertes wider.



**Abbildung 3.19: Signalweganalyse über gProfiler2 für miRNA-101 regulierte Proteine zu  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$ .** Farben entsprechen den verschiedenen hinterlegten Datenbanken wobei die einzelne Position eines Terms zudem durch den jeweiligen p-Wert bestimmt ist. Rot: Gene Ontology (GO) Molecular Function, Grün: GO Cellular Component, Gelb: GO Biological Process, Pink: KEGG, Blau: Reactome, Türkis: miRTarBase. Gelistet sind die Daten der 15 Signalwege bzw. Funktionen mit dem geringsten p-Wert.

Zur Verifizierung der durch gProfiler2 berechneten Ergebnisse wurden die gleichen Proteinlisten über die STRING Datenbank analysiert (Szklarczyk, Gable et al. 2019). Dieses Webtool vergleicht analog zu gProfiler2 Listen von Proteinen mit einer Datenbank und identifiziert signifikante Anreicherungen in einzelnen Signalwegen. Die zu analysierenden Proteine werden zudem bei direkter Interaktion zueinander grafisch als Interaktionsnetzwerk dargestellt. Abbildung 3.20 stellt dabei ein beispielhaftes Interaktionsnetzwerk von 13 der 24 Proteine dar, die auch für Abbildung 3.19 verwendet wurden. Insgesamt wurden über STRING vergleichbare Ergebnisse wie bei gProfiler2 erzielt.



**Abbildung 3.20: STRING Database Signalweg Analyse für miRNA-101 regulierte Proteine zu  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$ .** Die gleichen 24 Proteine mit reduzierter Proteinmenge nach miRNA-101 Transfektion wie bei der Analyse durch gProfiler2 wurden übergeben. Clusterbildung und Färbung durch STRING.

Tabelle 3.3: Ausgewählte Signalwege und Proteinklassen mit Signifikanz durch gProfiler2

| Bezeichnung                                | Datenbank     | Code          |
|--|---------------|---------------|
| Komplement- und Gerinnungskaskaden         | KEGG          | hsa04610      |
| Regulation des IGF Transports und Aufnahme | Reactome      | R-HSA-381426  |
| Posttranslationale Proteinphosphorylierung | Reactome      | R-HSA-8957275 |
| Signaltransduktion durch Rho GTPasen       | Reactome      | R-HSA-194315  |
| Apoptose                                   | Reactome      | R-HSA-109581  |
| Serinproteasen Aktivität                   | Gene Ontology | 0004252       |
| Bindung von/an Schwefelverbindungen        | Gene Ontology | 1901681       |
| Aktivität von Endopeptidase Inhibitoren    | Gene Ontology | 0004866       |
| Lsm2-8 Komplex                             | Gene Ontology | 0120115       |
| negative Regulation von Proteolyse         | Gene Ontology | 0045861       |
| Regulation von apoptotischen Signalwegen   | Gene Ontology | 2001233       |
| Abtötung von Zellen                        | Gene Ontology | 0001906       |



Aus den Ergebnissen aller gProfiler2 Analysen wurden die in Tabelle 3.3 gelisteten Signalwege und Proteinklassen ausgewählt. Da diese nach einer miRNA Transfektion unterschiedlich zur miRNA Negativkontrolle reguliert waren und diese miRNAs Einfluss auf die Infektion haben, besteht die Annahme, dass ein Teil dieser Signalwege und Proteinklassen bei einer Infektion involviert ist. Einträge mit ähnlichem Hintergrund wurden oftmals zusammengefasst und ein repräsentativer gewählt.

In Abbildung 3.21 wurden die detektierten Proteine die in diesen Einträgen gelistet sind mit ihrem jeweiligen Wert zu den einzelnen Zeitpunkten beziehungsweise Bedingungen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass bis auf die Proteine des Lsm2-8 Komplex Eintrages alle anderen Einträge im Schnitt eine Reduktion über den Zeitraum von 36 h aufweisen. Diese Regulation ist in der Regel stärker, je später die Proben gewonnen wurden, was eine Beeinflussung eines Eintrages durch die miRNA Transfektionen aufgrund des linearen Verlaufs wahrscheinlicher macht. Interessanterweise startet der Schnitt aller Proteinkonzentrationen häufig knapp über dem der Kontrolle und dreht sich zum  $t_{18h}$  Zeitpunkt ins Negative.

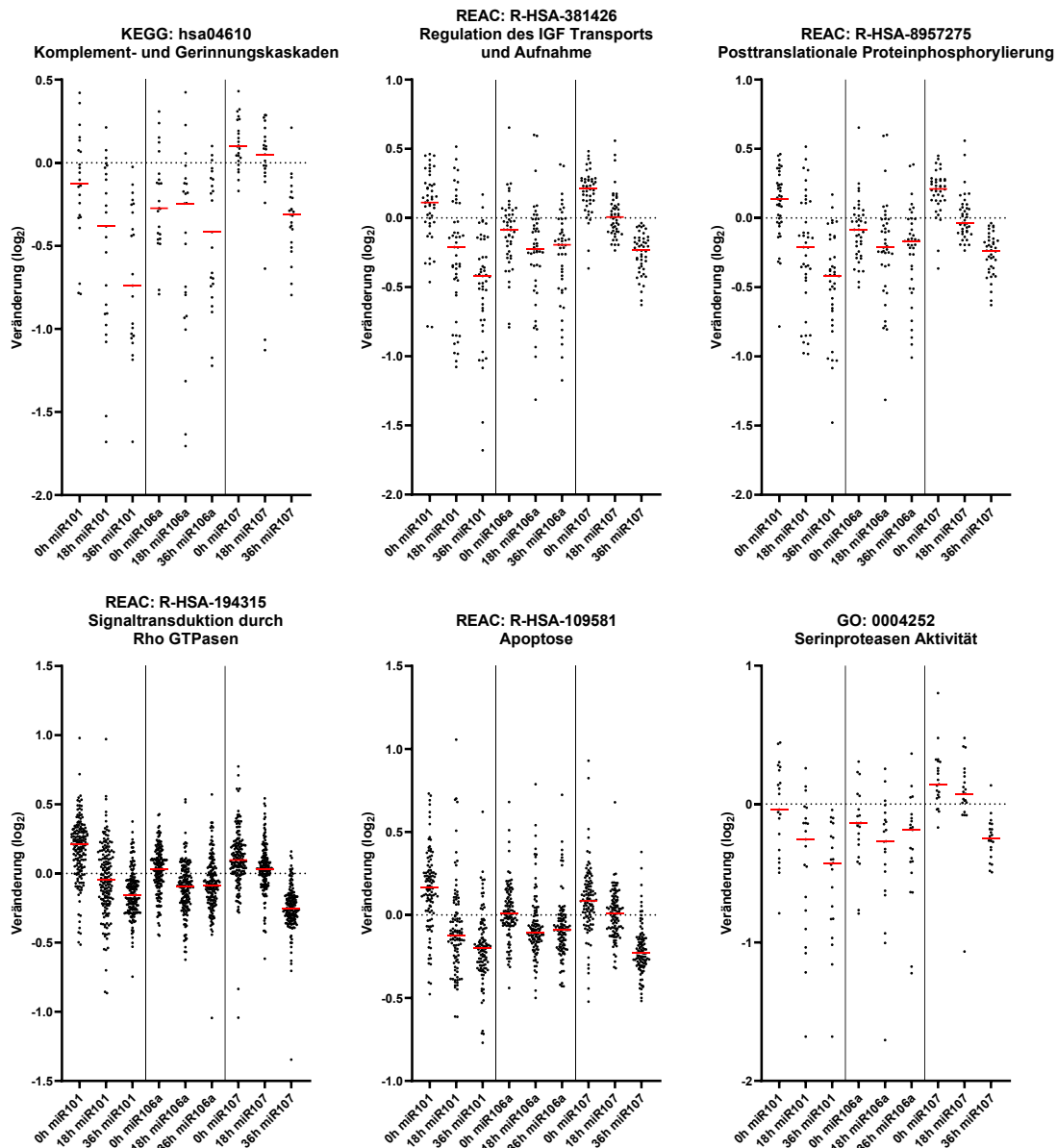


Abbildung 3.21: Regulation aller hinterlegten Proteine der genannten Einträge. Gezeigt sind die durch die Massenspektrometrie gewonnenen Konzentrationen relativ zur jeweiligen Kontrolle desselben Zeitpunkts. Die rote Linie zeigt den Median der jeweiligen Spalte an.

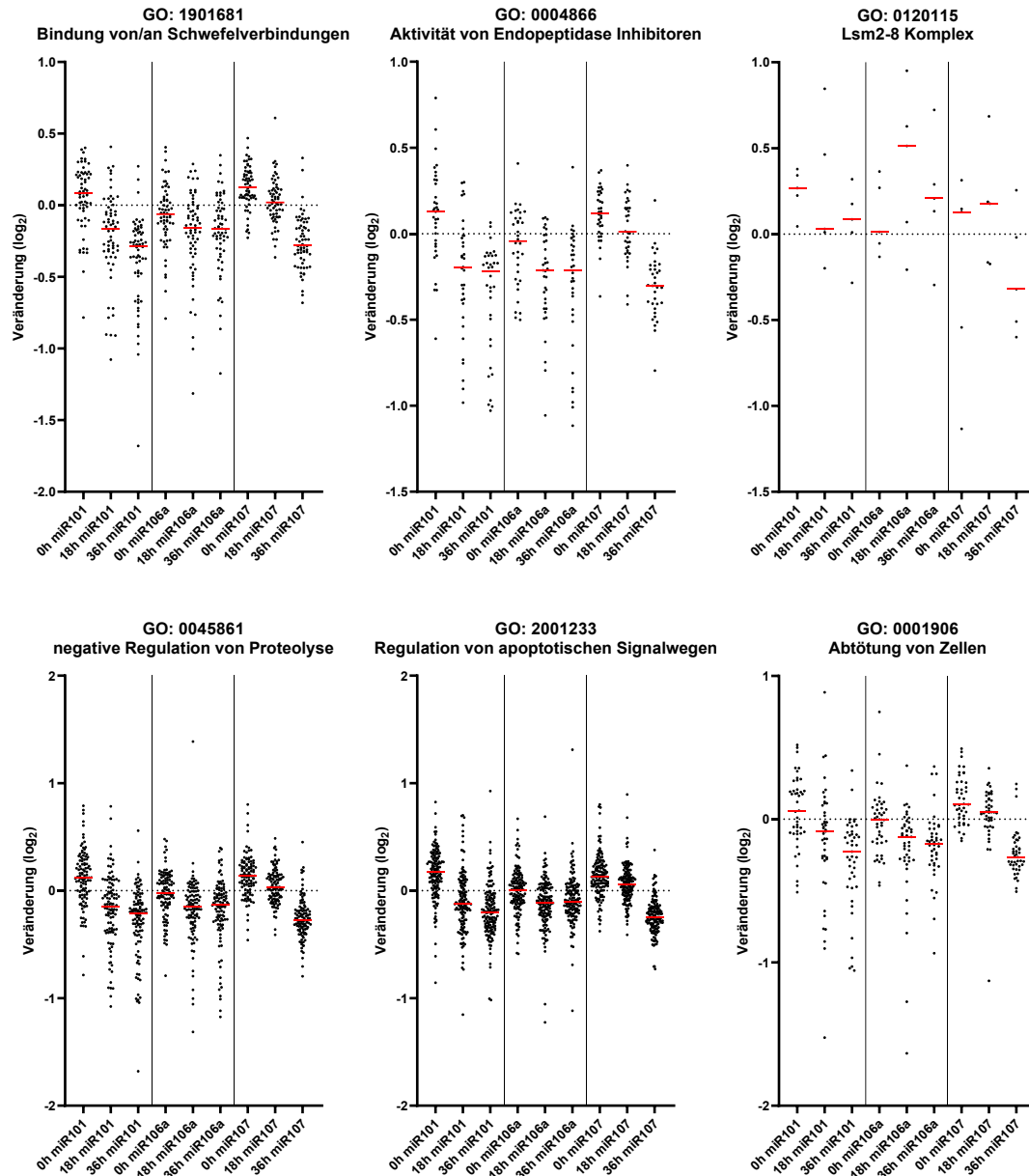


Abbildung 3.22: Regulation aller hinterlegten Proteine der genannten Einträge. Fortsetzung der Grafik der vorherigen Seite.

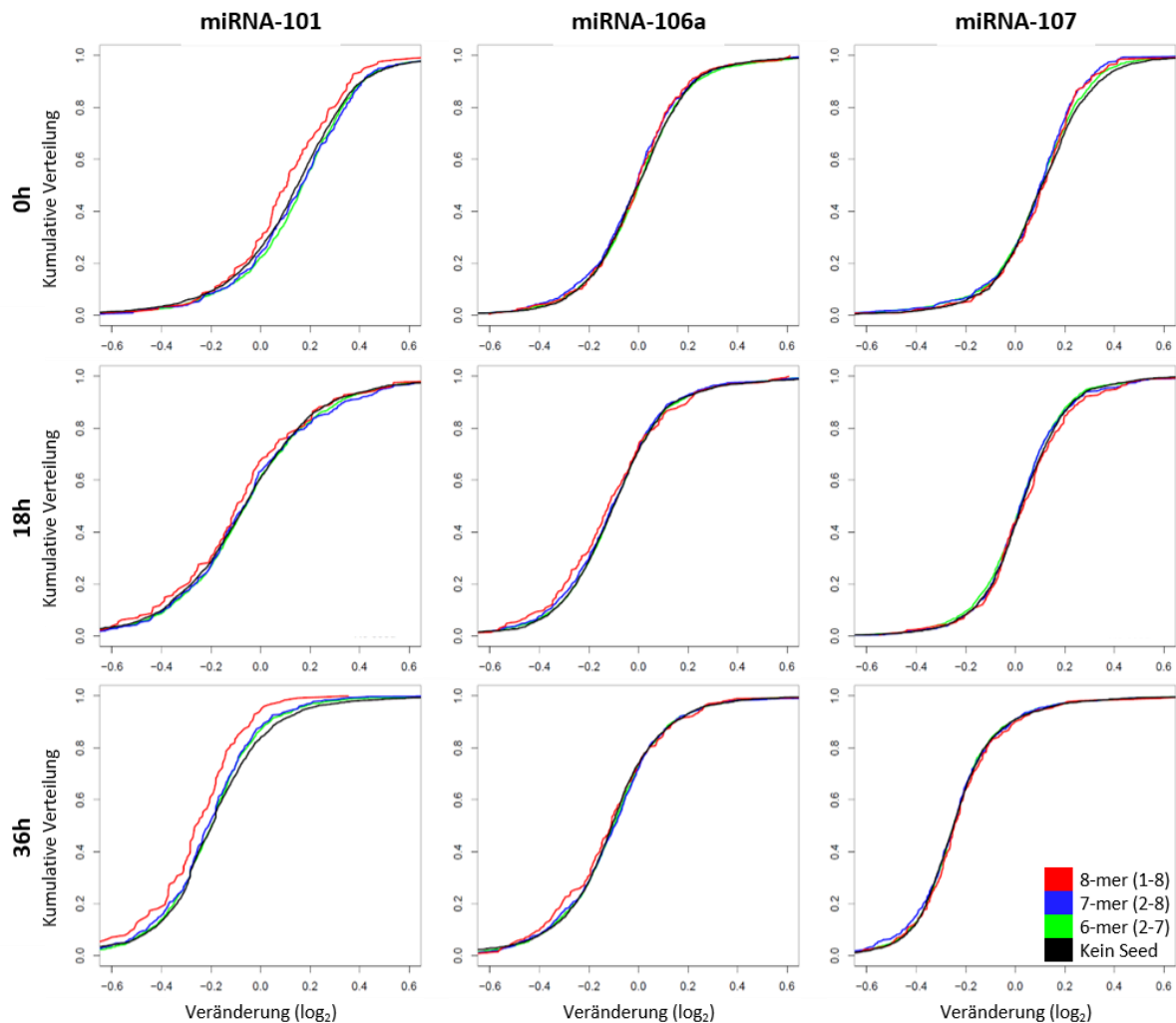
### 3.2.2.6 Analyse durch regulierte Proteine mit miRNA-Bindestellen in ihrer mRNA

Die zuvor durchgeführten Untersuchungen betrachteten die Gesamtheit aller regulierten Proteine abhängig von der durchgeführten miRNA Behandlung. Es stellte sich die Frage ob Proteine mit einem entsprechenden Bindestellen-Motiv in der 3' UTR ihrer mRNA eine stärkere Ausprägung der Regulation gegenüber Proteinen ohne Bindestelle zeigen.

Dafür wurde eine zuvor publizierte Methode verwendet (Selbach, Schwanhäusser et al. 2008), bei der die detektierten Proteinmengen im Vergleich zur miRNA Negativkontrolle gegenüber dem Prozentsatz der Proteine mit stärkerer Reduktion stehen. Dies wurde, wie in Abbildung

3.23 dargestellt, abhängig von dem Vorhandensein einer entsprechenden miRNA Bindestelle durchgeführt. Dabei sollten Proteine mit Bindestellen-Motiv in ihrer mRNA aufgrund der durch miRNAs verursachten Translationshemmung, Degradation oder Stabilitätsveränderung stärker reduziert sein als Proteine ohne entsprechendes mRNA Motiv. Dies zeigt sich im Graphen durch eine Verschiebung der Kurve gegenüber der schwarzen Linie, die die Gesamtheit aller mRNAs ohne Bindestellen-Motiv enthält, nach links. Die Analyse wurde für unterschiedliche Ausprägungen an Bindestellen durchgeführt. Dabei stellen 8-mere perfekt komplementäre Sequenzen der miRNA Seed-Region (Nukleotide 1-8) dar und sollten die höchste Affinität zur miRNA und stärkste Verschiebung der Kurve aufweisen. Da für 6- beziehungsweise 7-mere eine kürzere komplementäre Sequenz vorhanden ist, wurde eine dementsprechend schwächere Verschiebung der Kurve erwartet.

Aus den erstellten Graphen ließ sich ablesen, dass bei miRNA-101 Transfektion zu allen Zeitpunkten Proteine mit einer 8-mer Bindestelle im Schnitt niedrigere Konzentrationen gegenüber Proteinen ohne, oder schwächeren Bindestellen aufwiesen. Dies war für miRNA-106a nur schwach zu  $t_{18h}$  und  $t_{36h}$  erkennbar. miRNA-107 Transfektion führte zu keiner Veränderung in den jeweiligen Kurven. Die Ergebnisse könnten darauf schließen lassen, dass die erhöhte Replikation der Legionellen nach miRNA Transfektion bei miRNA-101 durch direkt regulierte Proteine erfolgt, während miRNA-106a indirekt Proteine beeinflusst die zur Variation der Replikation beitragen.

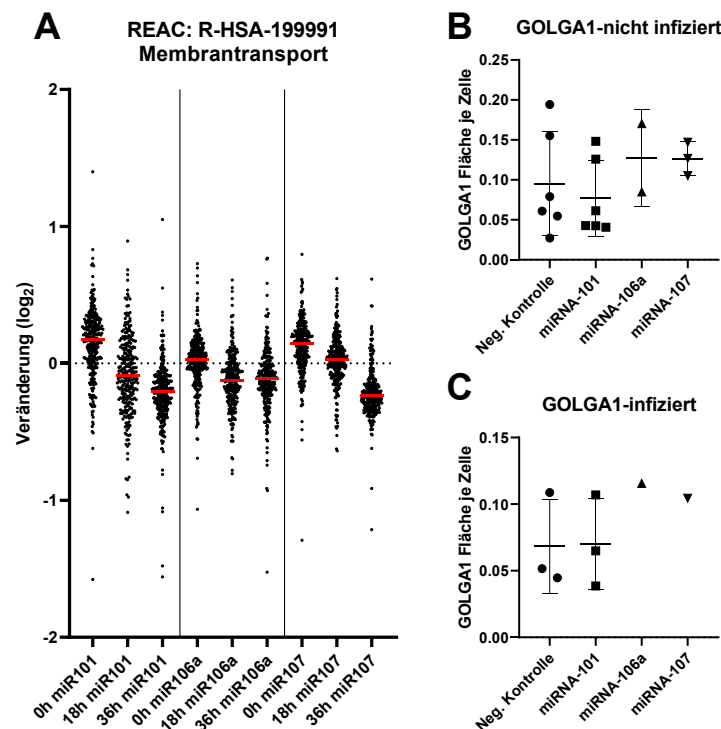


**Abbildung 3.23: Kumulative Verteilung von k-meren Bindestellen in den detektierten 3' UTRs.** Die x-Achse stellt die relative Veränderung jedes Proteins im Vergleich zur entsprechenden miRNA-Negativkontrolle des gleichen Zeitpunkts dar. Auf der y-Achse ist der Anteil der Proteine dargestellt, die eine der x-Achse entsprechende Veränderung oder stärker ausgeprägte Reduktion der Proteinmenge aufweist. Somit ergibt sich auf der y-Achse eine kumulative Verteilung.

Im Anschluss wurden Proteine mit miRNA-Bindestellen und einer  $|\log_2|$  Variation  $\geq 0,3$  über gProfiler2 analysiert. Dabei zeigte sich für miRNA-101 transfizierte Proben eine Anreicherung von Proteinen mit Bezug zum Membrantransport und Vesikelaktivität. Diese Anreicherung war umso ausgeprägter je länger die komplementäre Sequenz der miRNA Bindestelle gewählt wurde. Abbildung 3.24 A zeigt alle detektierten Proteine eines repräsentativen Reactome Ausdrucks abhängig von Behandlung und Zeitpunkt.

Da Änderungen des Vesikeltransports u.a. durch eine Schädigung des Golgi-Apparats verursacht werden wurde in Folge untersucht, ob nach miRNA Transfektion eine solche mikroskopisch detektierbar ist (Petrosyan 2019). Dafür wurden transfizierte THP-1 Zellen differenziert und wahlweise mit oder ohne anschließende Infektion mit *Legionella pneumophila* mittels Immunfluoreszenz gefärbt. GOLGA1, welches auf der Zytoplasma-zugewandten Seite des Golgi-Apparats lokalisiert, diente zur Visualisierung einer Golgi-Apparat Fragmentierung.

Abbildung 3.24 B und C zeigen die durchschnittliche Fläche des detektierten GOLGA1 Signals je Zelle. Eine erhöhte GOLGA1 Fläche je Zelle zeigt dabei eine Fragmentierung und somit Schädigung des Golgi-Apparats an. Dabei zeigten miRNA-101 transfizierte Zellen ohne Infektion sogar eine leicht reduzierte Fläche gegenüber der Kontroll-Transfektion. Dieses Verhalten konnte nach Infektion nicht festgestellt werden. Eine Veränderung des Vesikeltransports über eine Fragmentierung und somit Schädigung des Golgi-Apparats und dessen Transportfunktion ist somit aus diesen Daten nicht ersichtlich.



**Abbildung 3.24: Membrantransport nach miRNA-Transfektion.** Gezeigt sind die Proteinkonzentrationen der im Ausdruck enthaltenen Proteine relativ zur jeweiligen Kontrolle desselben Zeitpunkts (A). Die rote Linie zeigt den Median der jeweiligen Spalte an. THP-1 Zellen wurden mit den jeweiligen miRNAs transfiziert und nach 24 h mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert. Differenzierte THP-1 Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 10 für 24 h infiziert und gefärbt (C) oder ohne Infektion gefärbt (B). Gezeigt sind Durchschnittswerte der GOLGA1 Fläche je Zelle von mindestens 100 Zellen aus 1-6 biologischen Replikaten und zugehöriger Standardabweichung (B/C).

### 3.2.3 Zusammenfassung des miRNA-101, 106 und 107 Projekts

Die drei miRNAs-101, 106a und 107 wurden durch das miRNA Teilscreening als signifikant bewertet. Nachdem diese Erkenntnis widerrufen wurde zeigte sich trotzdem eine in CFUs messbare Steigerung der Legionellenreplikation, woraufhin die Analyse dieser drei miRNAs fortgesetzt wurde. Über qRT-PCRs und Western Blots ließen sich keine Rückschlüsse ziehen wie die Transfektion der miRNAs die Legionelleninfektion beeinflusst und in Folge wurde eine Analyse über Massenspektrometrie durchgeführt um eine breitere Übersicht über regulierte Proteine zu erhalten. Dabei zeigte sich anhand einer PCA, dass der Einfluss der Infektion

stärkere Proteinregulationen auslöste als die Transfektion der miRNAs. Bei transfizierten Proben, v.a. bei miRNA-101 Transfektion sowie späten Zeitpunkten, wiesen regulierte Proteine vorwiegend eine Reduktion der Proteinmenge auf. Über gProfiler2 und die STRING Datenbank wurden Signalwege und Proteinklassen identifiziert, die durch die miRNAs signifikant unterschiedlich zur miRNA Negativkontrolle reguliert waren. Wurden nur Proteine mit einer Bindestelle für eine der drei miRNAs betrachtet so zeichnete sich eine hohe Anreicherung dieser Proteine bei Stoffwechselwegen mit Bezug auf den Vesikeltransport ab. Eine Fragmentierung des Golgi-Apparats und eine damit einhergehende Veränderung des Vesikeltransports konnte nicht nachgewiesen werden.

### **3.3 Identifikation von Inhibitoren mit Einfluss auf die intrazelluläre *Legionella pneumophila*-Replikation**

Wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben zeigte das ursprüngliche miRNA-Screeningverfahren Probleme in der Replizierbarkeit. Insbesondere das Vorhandensein von oftmals nur einem Replikat je Bedingung auf einer Mikrotiterplatte sowie Randeffekte senkten die Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse. In Folge wurde das Screening von miRNAs eingestellt einzelne miRNAs weiter untersucht. Alternativ zu miRNAs sollten Inhibitoren und bioreaktive Substanzen untersucht werden. Da die Anzahl der geplanten Substanzen deutlich geringer ausfiel als die der miRNAs war es möglich das etablierte Verfahren weiter zu verwenden, mehrere technische Replikate über die Platte verteilt anzuordnen und so Randeffekte herauszumitteln. Durch den Wegfall der Transfektion und das Hinzukommen der Chemikaliengabe mussten einzelne Prozessschritte des Screening-Verfahrens angepasst werden. Details der Anpassungen sind Kapitel 1083.3.2.1 zu entnehmen.

#### **3.3.1 Aufbau eines Substanz-Screenings**

##### **3.3.1.1 Auswahl der Substanzen**

Für das Screening sollten Substanzen aus drei Kategorien ausgewählt werden: Stoffe mit bekanntem beziehungsweise sehr wahrscheinlichem Einfluss auf die Infektion mit *Legionella pneumophila*, Stoffe bei denen eine Datengrundlage durch Fachliteratur vorliegt, die darauf schließen lässt, dass in diesem Kontext eine Regulation auftritt, sowie Substanzen bei denen keine bisherigen Daten im Infektionskontext vorliegen.

Als Kontrollen dienten Wortmannin, ein PI3K Inhibitor, welcher in vorangegangenen Experimenten der AG Schmeck in Marburg die Infektion gesenkt hat, und LY294002, was ebenfalls als PI3K Inhibitor fungiert. Sirolimus wurde als Inhibitor von mTOR und auf Grund

der Involvierung in der Infektion mit Legionellen ausgewählt (Abshire, Dragoi et al. 2016, Ivanov 2017). Dihydroergocristin, Amitriptylin und Bepridil zeigten in einer vorhergegangenen Studie eine Inhibition der Infektion von Makrophagen durch Legionellen von mehr als 80 % (Czyż, Potluri et al. 2014).

Insgesamt zeigten in dieser Studie 32 Substanzen eine Reduktion des Legionellenwachstums von über 80 %. Über eine Analyse mit der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) wurden weitere Stoffe gefunden, welche die gleichen Ziele wie diese 32 Substanzen adressieren. Dabei wurde festgestellt, dass viele der über IPA neu gefundenen Substanzen einen Serotonin- oder Dopaminrezeptor binden. Insbesondere fiel dabei der Fokus für Serotonin auf den 5-HT<sub>2</sub> sowie für Dopamin auf den D2 Rezeptor. Ziprasidon, Iloperidon, Lisurid und das strukturverwandte Tergurid wurden aufgrund ihrer Bindung an beide dieser Rezeptoren für das Substanz-Screening ausgewählt, wobei sich die Affinität der Stoffe zu den Rezeptoren teilweise stark unterscheidet. Ropinirol und Talipexol binden praktisch ausschließlich den Dopaminrezeptor, wohingegen Fluoxetin als selektiver Serotonin-Wiederaufnahme Inhibitor praktisch ausschließlich den Serotonin Rezeptor bindet. Alle genannten Substanzen mit Bezug zu Serotonin oder Dopamin stellen dabei etablierte und zugelassene Medikamente dar.

Leukotrien D4, ein Molekül das in der Vermittlung von Entzündungen involviert ist, Deferoxamin, ein Eisenchelator, Trichostatin A, ein HDAC Inhibitor, und Bortezomib, welches einen Inhibitor des Proteasoms darstellt, wurden ebenfalls aufgrund von IPA als potentielle Kandidaten identifiziert. 25-hydroxycholesterol (25-HC) erhöht die Synthese von Cholesterol und ist ebenfalls bei der IPA Analyse gefunden worden. Zudem zeigten Veränderungen der Cholesterolverteilung Effekte auf das Wachstum von *Coxiella burnetii* und eingeschränkt auf das von *Legionella pneumophila* (Czyż, Potluri et al. 2014).

W-7, ein Calmodulin Inhibitor, und der N-WASP Inhibitor Wiskostatin wurden getestet, da sie die Sekretion verschiedener Effektoren über das Dot/Icm System der Legionellen einschränken, aber bisher keine Analyse der intrazellulären Replikation erfolgt ist (Charpentier, Gabay et al. 2009). Forskolin, ein Agonist der Adenylylcyclase, und 8-bromo-cAMP wurden aufgrund ihres positiven Einflusses auf das intrazelluläre cAMP Level ausgewählt. cAMP hat dabei das Potential regulatorisch im hier ausgewählten Rahmen zu wirken, da es in murinen Makrophagen eine Inhibition der Infektion aufhob (Egawa, Klein et al. 1992).

Der PKA Inhibitor H-89, der MEK1/2 Inhibitor Trametinib, das Antioxidans und entzündungshemmende Agens N-acetylcystein (NAC), der Calciumantagonist Nifedipin sowie



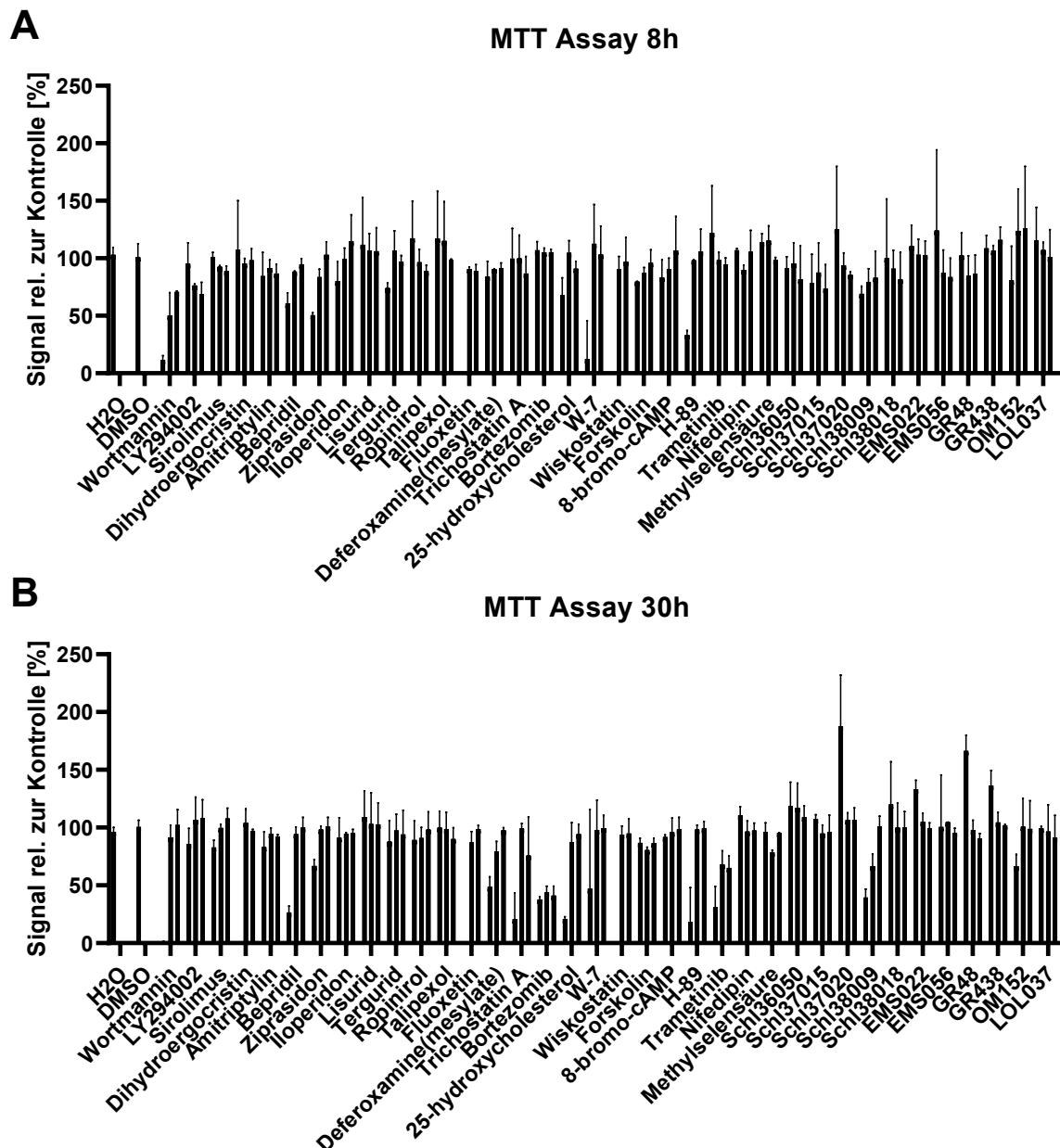
Methylselensäure wurden aufgrund persönlicher Empfehlungen und vorheriger Erfahrungen mit diesen Stoffen inkludiert.

Zusätzlich zu den Substanzen bei denen ein Einfluss auf die Infektion mit Legionellen abzusehen war, wurden 11 Stoffe nach Auswahl durch Prof. Dr. M. Schlitzer übernommen. Dabei handelt es sich um unterschiedliche Substanzklassen deren molekulare Bindungspartner weitgehend unbekannt sind. Die Stoffe leiten sich entfernt von bestehenden Arzneistoffen ab oder wurden als Inhibitoren von Helikasen entworfen. Die Laborinternen Bezeichnungen und Strukturformeln sind im Anhang zu finden.

Insgesamt handelt es sich mit 6 Kontrollen, 21 Stoffen mit potentielltem Einfluss und 11 Stoffen mit unbekanntem Hintergrund um 38 unterschiedliche Substanzen. Aufgrund der weitaus geringeren Anzahl gegenüber den miRNAs wurde es möglich, mehrere technische Replikate jeder Substanz auf einer Mikrotiterplatte zu positionieren und so positions-abhängige Effekte weitestgehend zu eliminieren. Eine Liste der verwendeten Substanzen sowie deren eingesetzte Konzentration findet sich in Tabelle 3.4 auf Seite 108.

#### 3.3.1.2 Bestimmung der optimalen Konzentrationen

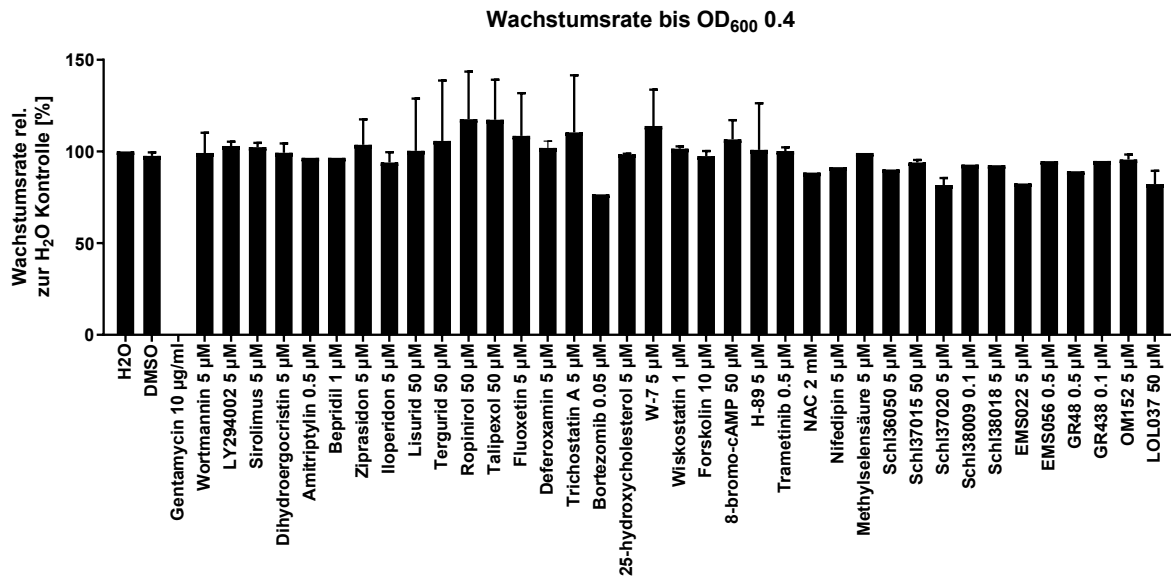
Um eine für die THP-1 Zellen und die Legionellen verträgliche Konzentration der 38 Substanzen zu finden wurden zwei experimentelle Methoden verwendet. Zunächst wurden alle Substanzen mittels eines MTT Assays in verschiedenen Konzentrationen gemessen um einen Einfluss der Substanzkonzentrationen auf die Vitalität der Makrophagen auszuschließen. Ausgewählt wurden 50, 5 und 0,5  $\mu\text{M}$  für einen Zeitraum von 8 h oder 30 h. Der 30 h Zeitpunkt wurde gemessen um zu gewährleisten, dass auch bei einer kürzeren Dauer von 18 h im Screen (Zugabe 2 h vor Infektion und 16 h während Infektion) keine Beeinträchtigung der Zellvitalität zu erwarten ist.



**Abbildung 3.25: Einfluss der Substanzzugabe auf die THP-1 Vitalität.** THP-1 Zellen wurden mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert und Substanzen nach einem Mediumswechsel in Konzentrationen von 0,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M zugegeben. Zellen wurden nach Inkubationszeit gewaschen und der MTT Assay durchgeführt. Gezeigt sind Werte von 2-3 biologischen Replikaten mit Inkubationszeiten von 8 h (A) und 30 h (B). Aufsteigende Konzentrationen jedes Stoffes von links nach rechts. H<sub>2</sub>O und DMSO wurden in der geringsten Verdünnung aller Stoffe eingesetzt. NAC zeigte, vermutlich aufgrund der antioxidativen Wirkung, unabhängig von der Konzentration kein Signal und wurde aus diesem Grund nicht in der Grafik dargestellt.

Die durch den MTT Assay ermittelten Konzentrationen, welche die Vitalität der THP-1 Zellen nicht beeinträchtigen, wurden im Anschluss verwendet um potentielle Einschränkungen beim Wachstum von *L. pneumophila* in Flüssigkultur zu messen. Dies wurde durchgeführt um Substanzen zu identifizieren welche intrazelluläre Stoff- und Signalwege während der Infektion beeinflussen. Dazu wurden Wachstumskurven erstellt und entsprechende Konzentrationen der Substanzen zugegeben. Für den Fall, dass sich das Wachstum der Bakterien veränderte, wurde

die Konzentration reduziert bis keine Veränderung größer als 20 % gegenüber der Lösemittelkontrolle auftrat. Die Wachstumsrate wurde berechnet indem die Zeit, in der OD<sub>600</sub> 0,4 (Mitte der logarithmischen Wachstums-phase) erreicht wurde, ins Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle gesetzt wurde. Als Positivkontrolle für ein verändertes beziehungsweise gestopptes Wachstum diente 10 µg/ml Gentamicin.



**Abbildung 3.26: Wachstumsrate nach Substanz Zugabe.** Legionellen wurden in einer Flüssigkultur kultiviert und nach Verdünnung bei einer OD<sub>600</sub> von 0,03 mit Substanzen in angegebenen Konzentrationen versetzt. Gesamtvolumen 150 µl je Well einer 96 Well Mikrotiterplatte. Gezeigt ist die Dauer bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde relativ zur unbehandelten Lösemittelkontrolle. Gezeigt sind 1-2 Replikate der Konzentrationen bei denen es keine Veränderungen  $\geq 20\%$  gegenüber der Lösemittelkontrolle gab.

Nach Ermittlung der Konzentration, welche sowohl für THP-1 Zellen als auch *L. pneumophila* geeignet war, wurde diese mit mindestens drei Literaturwerten verglichen in denen die Substanzen *in vitro* bei eukaryotischen Zellen, unabhängig von der Zugabe von Bakterien eingesetzt wurden. Das Ziel war anerkannte bzw. physiologisch nutzbare Konzentrationen zu verwenden. Lagen diese im Schnitt unter den im MTT Assay oder Wachstumskurven gefundenen, wurde die Konzentration entsprechend angepasst. Tabelle 3.4 zeigt die für die 38 Testsubstanzen ausgewählten und später verwendeten Konzentrationen.

Tabelle 3.4: Testsubstanzen mit verwendeten Konzentrationen

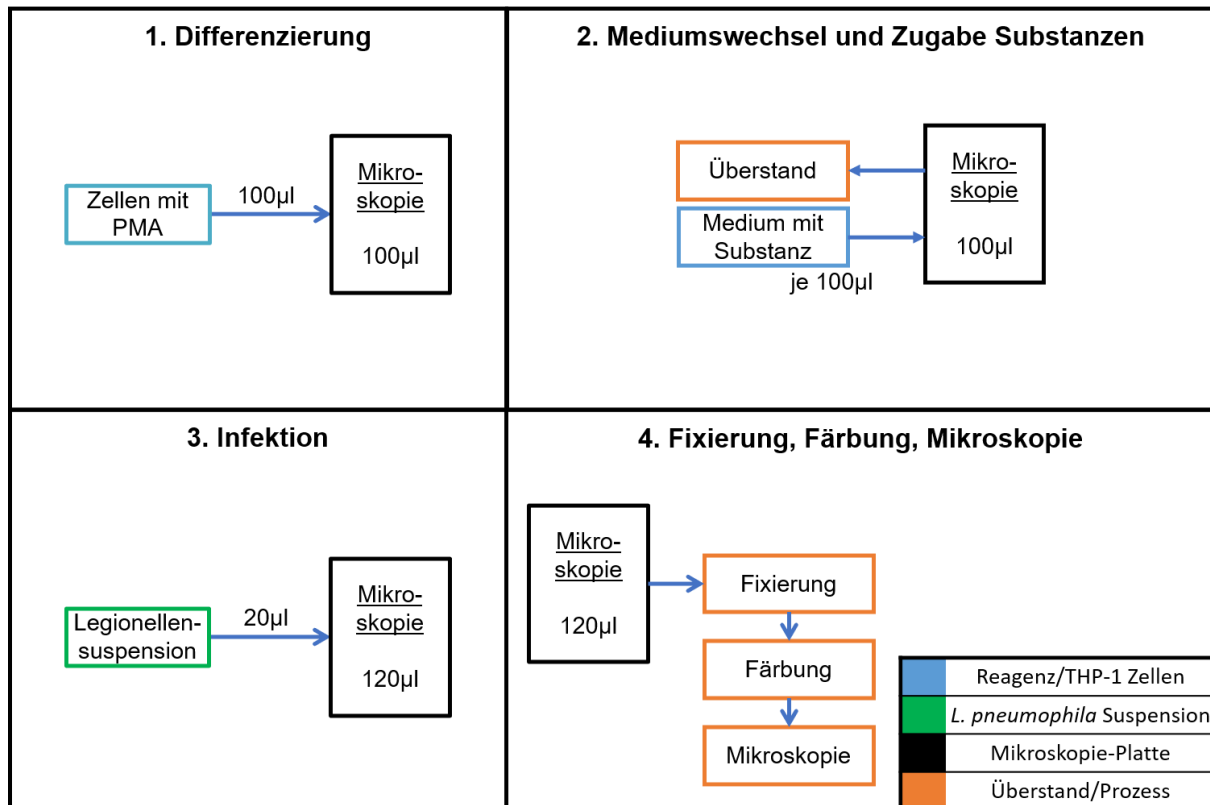
| <b>Substanz</b>    | <b>Konz.</b> | <b>Substanz</b> | <b>Konz.</b> | <b>Substanz</b>  | <b>Konz.</b> |
|--------------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|
| Wortmannin         | 2 $\mu$ M    | Leukotrien D4   | 100 nM       | Methylselensäure | 3 $\mu$ M    |
| LY294002           | 10 $\mu$ M   | Deferoxamin     | 5 $\mu$ M    | Schl36050        | 5 $\mu$ M    |
| Sirolimus          | 100 nM       | Trichostatin A  | 100 nM       | Schl37015        | 50 $\mu$ M   |
| Dihydroergocristin | 5 $\mu$ M    | Bortezomib      | 30 nM        | Schl37020        | 1 $\mu$ M    |
| Amitriptylin       | 20 $\mu$ M   | 25-HC           | 5 $\mu$ M    | Schl38009        | 100 nM       |
| Bepidil            | 1 $\mu$ M    | W-7             | 5 $\mu$ M    | Schl38018        | 5 $\mu$ M    |
| Ziprasidon         | 200 nM       | Wiskostatin     | 1 $\mu$ M    | EMS022           | 1 $\mu$ M    |
| Iloperidon         | 5 $\mu$ M    | Forskolin       | 20 $\mu$ M   | EMS056           | 500 nM       |
| Lisurid            | 5 $\mu$ M    | 8-bromo-cAMP    | 50 $\mu$ M   | GR48             | 500 nM       |
| Tergurid           | 500 nM       | H-89            | 5 $\mu$ M    | GR438            | 100 nM       |
| Ropinirol          | 10 $\mu$ M   | Trametinib      | 80 nM        | OM152            | 5 $\mu$ M    |
| Talipexol          | 50 $\mu$ M   | N-acetylcystein | 2 mM         | LOL037           | 20 $\mu$ M   |
| Fluoxetin          | 5 $\mu$ M    | Nifedipin       | 5 $\mu$ M    |                  |              |

### 3.3.2 Durchführung und Datengenerierung

#### 3.3.2.1 Durchführung des Screenings

Der experimentelle Aufbau des Screenings wurde vergleichbar mit dem des miRNA-Screenings gewählt. In diesem Fall wurden die THP-1 Zellen zuerst differenziert und nach 24 h Inkubation ein Mediumswechsel durchgeführt. Anschließend wurden die Substanzen in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und die Mikrotiterplatten für 2 h weiter inkubiert. Dies ermöglichte den Substanzen mit ihren Bindungspartnern zu interagieren bevor es zur Infektion mit *Legionella pneumophila* kam. Diese erfolgte bei einer MOI von 20 für 16 h. Im Anschluss wurden wie beim zuvor durchgeführten miRNA-Screening Zellen mit PFA fixiert und gefärbt. Auch die darauffolgenden Mikroskopieprozesse wurden unverändert übernommen. Die Auswertung der Mikroskopiebilder erfolgte über die speziell angefertigte Softwarelösung.

Insgesamt wurden 38 Substanzen neben H<sub>2</sub>O und DMSO gescreent. Dabei befanden sich jeweils sechs technische Replikate der Substanzen und neun technische Replikate der Kontrollen verteilt auf jeder Mikrotiterplatte. Für jede Substanz wurden drei bis sieben zeitlich unabhängige biologische Replikate erstellt. Ein schematischer Ablauf der Prozessschritte ist in Abbildung 3.27 gezeigt.



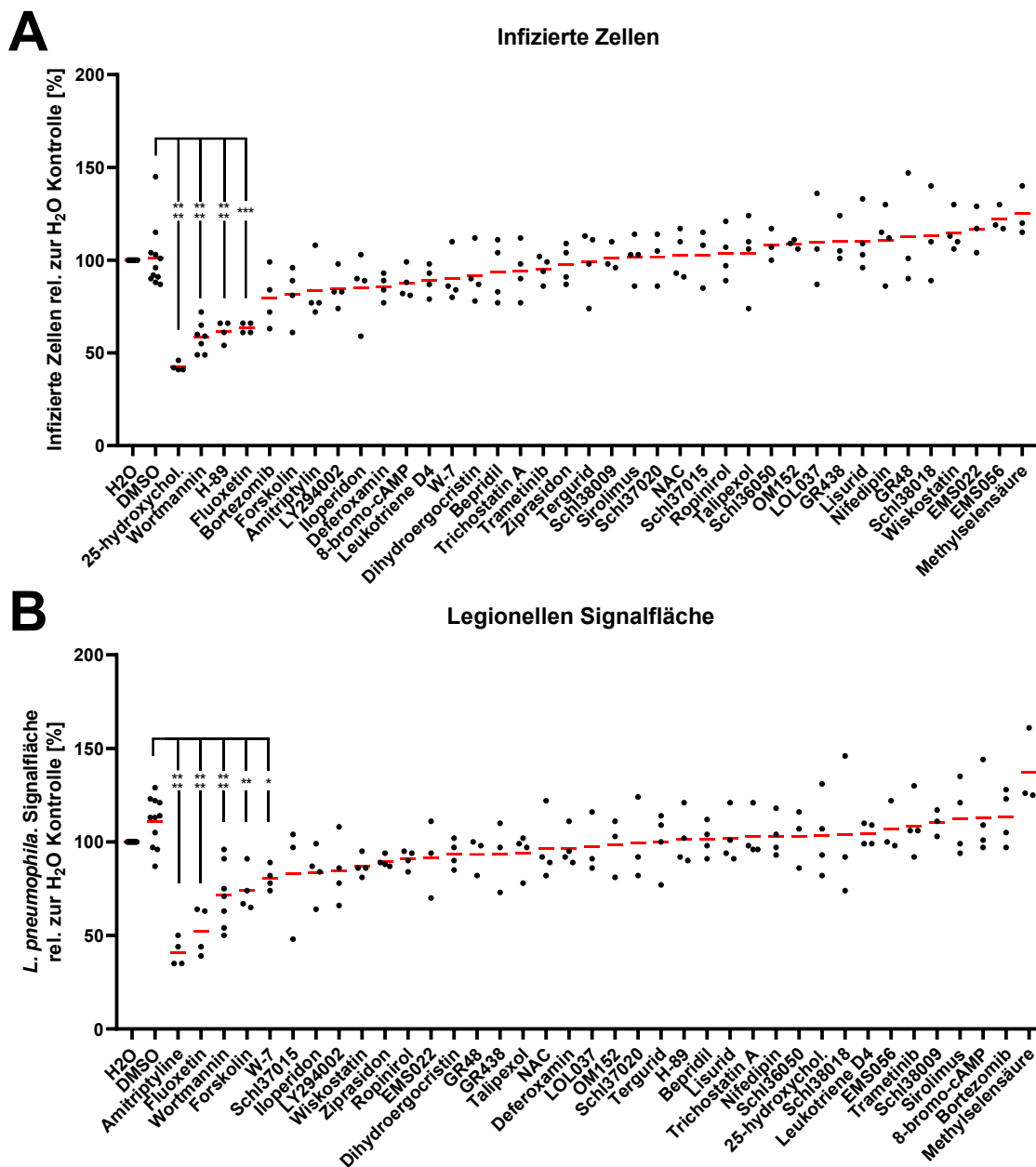
**Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der Prozessschritte des Substanz-Screens.** Im ersten Schritt wurden THP-1 Zellen mit 20 nM PMA in einer Sensoplate Plus Mikroskopieplatte ausgesät und differenziert. Nach 24 h Inkubation erfolgte ein Mediumswechsel, wobei im Falle der Zugabe einer Substanz diese bereits im Medium in entsprechender gelöst war. Zwei Stunden nach Mediumswechsel wurden 20 µl einer Legionellensuspension zugegeben um eine MOI von 20 zu erreichen. Nach weiteren 16 h Inkubation wurden die Zellen gewaschen, fixiert, gefärbt und mikroskopiert.

### 3.3.2.2 Ergebnisse des Screenings

Die Analyse der Bilddaten erfolgte auf zwei Arten. Zunächst wurde für jede Behandlung der Prozentsatz an infizierten Zellen berechnet und dieser mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (H<sub>2</sub>O oder DMSO) verglichen. Abbildung 3.28 A zeigt die durch diese Analyse gewonnenen Prozentsätze. 25-HC, Wortmannin, H-89 und Fluoxetin zeigten eine signifikante Reduktion der Infektionsrate. Für Abbildung 3.28 B wurde für jede infizierte Zelle das GFP-Signal der Legionellen ausgewertet. Dabei wurden für Signale über einem Intensitätsschwellenwert die Pixelflächen berechnet und die durchschnittliche Fläche je infizierter Zelle mit der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle verglichen. Dabei zeigten wie zuvor Wortmannin und Fluoxetin eine signifikante Reduktion der Legionellenfläche pro Zelle. Zusätzlich zeigten auch Amitriptylin, Forskolin und W-7 eine Senkung der Legionellen Signalfläche.

Eine Veränderung des Prozentsatzes an infizierten Zellen oder der durchschnittlichen Signalfläche der Legionellen lassen noch keine Rückschlüsse zu, wie die genannten Substanzen mit dem Infektionsmodell interagieren. Beide Analysen können zum Beispiel unter anderem

durch eine Variation der Aufnahme der Bakterien oder ein verändertes Verhalten der Legionellen beim Austritt aus den Makrophagen mit folgender Reinfektion beeinflusst werden.



**Abbildung 3.28: Ergebnisse des Substanz Screenings.** THP-1 Zellen wurden mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert, gewaschen und mit Substanzen in entsprechender, zuvor ermittelter, Konzentration behandelt. Nach 2 h Inkubation wurde mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Die Fixierung der infizierten Zellen erfolgte mit 4 % PFA für 15 min und Färbung nach Protokoll. Gezeigt sind Durchschnittswerte von sechs bis neun technischen Replikaten von drei bis sieben biologischen Replikaten der Testsubstanzen. Signifikanz zur dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle wurde mit einem 1-way ANOVA mit Korrektur auf multiples Testen über Sidak berechnet. \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \* =  $p \leq 0.05$ , n.s. = nicht signifikant.

### 3.3.3 Validierung und Untersuchung signifikanter Inhibitoren

#### 3.3.3.1 Validierung durch Durchflusszytometrie

Der Effekt der durch das Substanz Screening identifizierten Substanzen, welche alle eine Reduktion der Infektion verursachten, sollte über etablierte Methoden validiert werden. Dazu wurden, vergleichbar mit dem Vorgehen des Screenings, differenzierte THP-1 Zellen mit den Substanzen behandelt und für 16 h mit *L. pneumophila* infiziert. Statt einer Fixierung und Färbung der Zellen wurden diese gewaschen, von der Platte abgelöst und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 3.29 A zeigt die dabei gewonnenen Ergebnisse. Eine Reduktion des Prozentsatzes infizierter Zellen war nur für die Positivkontrollen Wortmannin und Amitriptylin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant nachweisbar, wobei Fluoxetin und 25-HC einen Trend zur Reduktion zeigten.

#### 3.3.3.2 Validierung über CFU-Assays

Neben der Durchflusszytometrie wurden auch CFU-Assays zur Validierung durchgeführt. Vergleichbar zum Screening wurde auch hier ein 16 h Zeitpunkt gewählt. Da Effekte aufgrund einer geringeren MOI bei diesem Assay potentiell später zu erwarten waren, wurde zusätzlich nach 24 weiteren Stunden, also 40 h nach Infektion Proben genommen. Zu den selben Zeitpunkten wurden auch Proben für LDH Assays gewonnen um einen möglichen Effekt auf die Zellvitalität nachzuweisen. Abbildung 3.29 B-E zeigen die Ergebnisse der CFU- und LDH-Assays zu den beiden Zeitpunkten.

Nach 16 h Infektion zeigte neben den Positivkontrollen Wortmannin und Amitriptylin nur Forskolin eine wie aus dem Screening erwartete Reduktion der Kolonienanzahl. Nach weiteren 24 h Infektion zeigten zum 40 h Zeitpunkt neben den Kontrollen auch Fluoxetin, 25-HC und H-89 eine Reduktion, wobei der zuvor beobachtete Effekt von Forskolin nicht mehr auftrat. W-7 zeigte eine Tendenz zur Reduktion der Kolonien, war aber nicht signifikant.

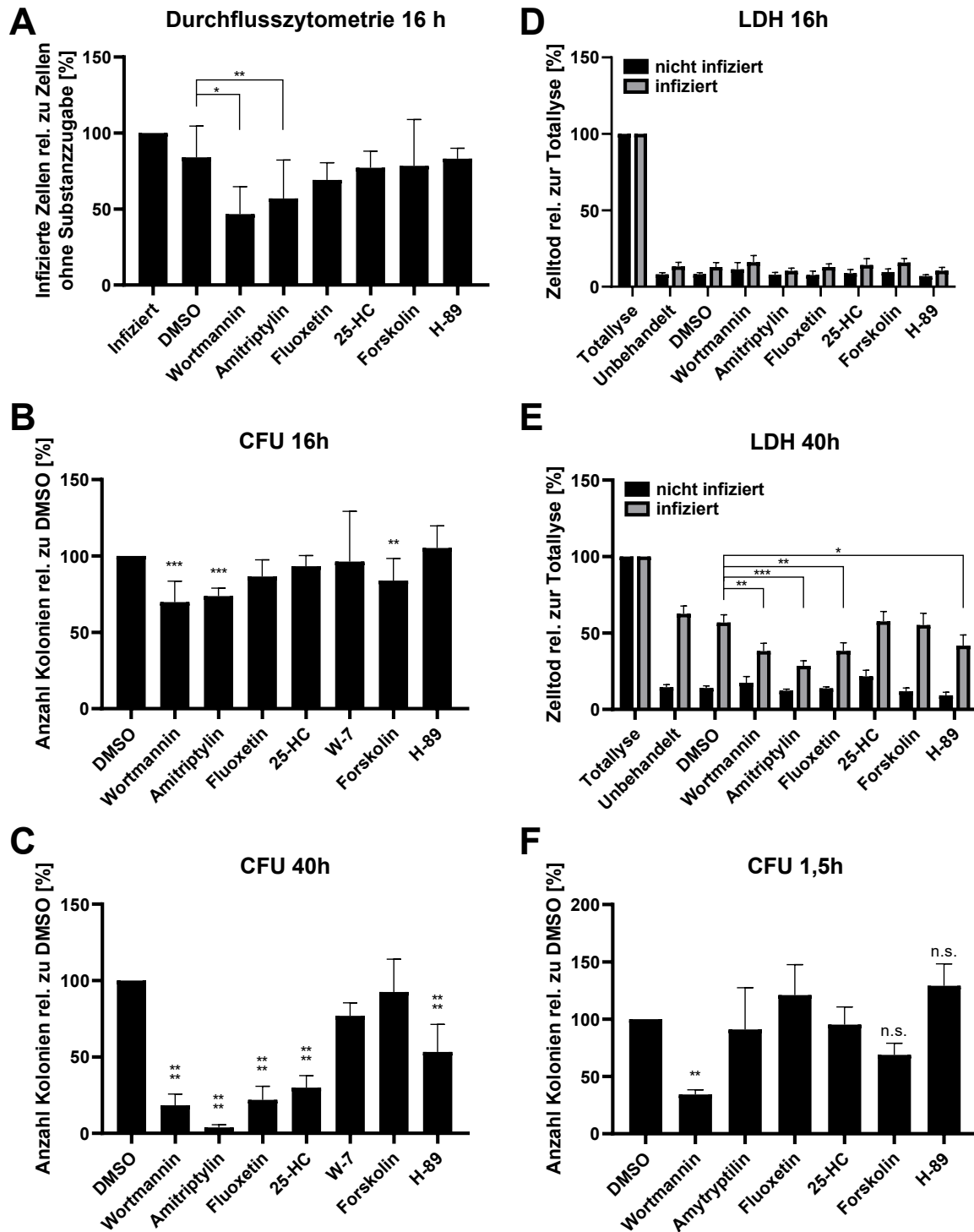
In den LDH Assays zeigte sich sowohl 16 h als auch 40 h nach Zugabe der Substanzen keine Veränderung des Zelltods. Wurden die Zellen neben der Behandlung mit den Inhibitoren zusätzlich infiziert, zeigte sich eine kleine Erhöhung des Zelltods 16 h nach Zugabe der Legionellen. Der Zelltod erhöhte sich 40 h nach Infektion deutlich gegenüber nicht infizierten Zellen. Diese Steigerung war jedoch abhängig von der vorherigen Behandlung der Zellen. Zugabe von Wortmannin, Amitriptylin, Fluoxetin und H-89 schwächten den durch die Infektion verursachten Zelltod signifikant ab. Im Rückschluss könnte diese Reduktion des Zelltods durch die verringerte bakterielle Replikation nach Zugabe genannter Substanzen bedingt sein.

### 3.3.3.3 Bestimmung des Einflusses auf Aufnahme oder Replikation

Um zu bestimmen, ob die Reduktion der Infektionsrate beziehungsweise der Legionellen Signalfläche nach Behandlung mit den Substanzen auf eine Veränderung der Aufnahme der Bakterien oder eine gesenkte intrazelluläre Replikation zurückzuführen ist wurde ein CFU-Assay durchgeführt. Dabei wurden differenzierte THP-1 Zellen für 2 h mit den Substanzen behandelt und anschließend, aufgrund eines sehr kurzen Infektionszeitraums, mit einer hohen MOI von 100 mit *Legionella pneumophila* infiziert. Nach 1,5 h wurden die Zellen gewaschen um extrazelluläre Legionellen zu entfernen und das Antibiotikum Gentamicin zugegeben, um zusätzlich anhaftende extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach 1 h weiterer Inkubation wurde Gentamicin entfernt, die Zellen lysiert, und wie für einen gewöhnlichen CFU-Assay weiter verfahren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 F zu sehen.

Eine signifikant veränderte Aufnahme der Legionellen konnte nur für Wortmannin nachgewiesen werden. Forskolin zeigte eine Tendenz dazu die Aufnahme der Bakterien zu senken und H-89 die Aufnahme zu steigern.





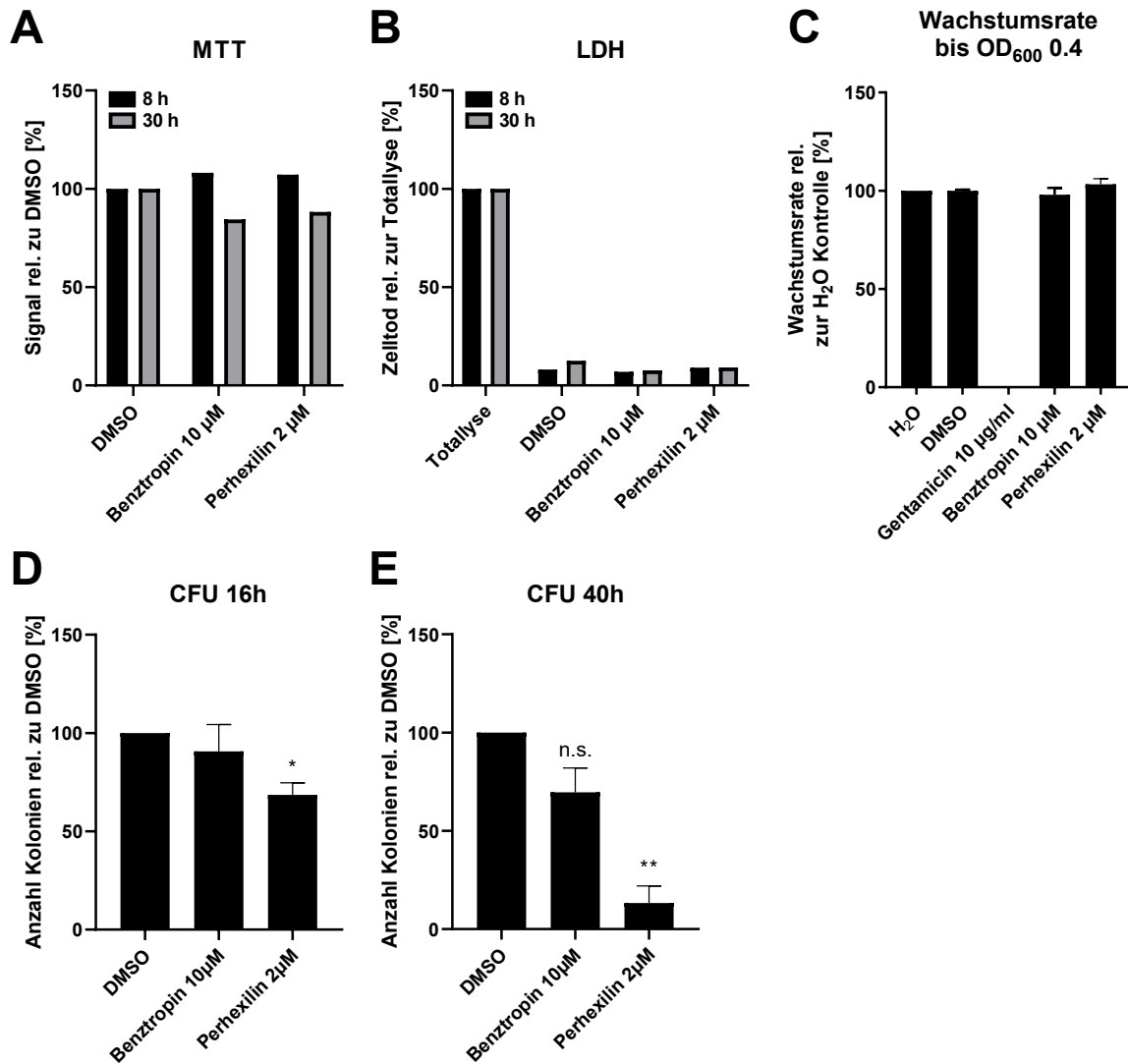
**Abbildung 3.29: Validierungsexperimente zeigen Einfluss der Substanzen bei Legionelleninfektion.** THP-1 Zellen wurden mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert, gewaschen und mit Substanzen in entsprechender Konzentration behandelt. Nach 2 h Inkubation wurde mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 20 (A), 0,5 (B-E) oder 100 (F) für 16 h (A/B/D), 40 h (C/E) oder 1,5 h (F) infiziert. Die Infektion wurde durch Waschen und Zugabe von 50 µg/ml Gentamicin gestoppt (F). Gezeigt sind Durchschnittswerte von drei Replikaten (A/D-F) bzw. drei bis zehn Replikaten (B-C) mit der dazugehörigen Standardabweichung. Signifikanz zur Lösungsmittelkontrolle DMSO wurde mit nicht-normalisierten Daten mit einem 1-way ANOVA mit Korrektur auf multiples Testen über Dunnett (A/E-F) oder einem angepassten gemischten Modell mit Dunnett's Korrektur (B-C) berechnet. n.s. = nicht signifikant, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

### 3.3.4 Nachtestung von Benztropin und Perhexilin

Die positiv validierte Substanz Fluoxetin wurde ursprünglich ausgewählt, da sie ähnlich zu Amitriptylin als selektiver Wiederaufnahme Inhibitor am Serotonin Transporter SERT agiert (Tatsumi, Groshan et al. 1997). Die untersuchten Stoffe Ziprasidon, Iloperidon, Lisurid und Tergurid weisen, in unterschiedlicher Ausprägung, ebenfalls eine Regulation des Serotonin Spiegels auf, welche jedoch durch eine Bindung an Serotonin-Rezeptoren zustande kommt (Roth, Kroeze et al. 2000). Fluoxetin und Amitriptylin senkten die Infektion durch Legionellen deutlich stärker, was darauf schließen lässt, dass der 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor nicht in der Infektion involviert ist. Die Regulation kann daher durch SERT oder eine andere gemeinsame Eigenschaft der beiden Stoffe verursacht werden.

Neben der Inhibition der Serotonin Aufnahme wurden Amitriptylin und Fluoxetin als Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (*engl. functional inhibitors of acid sphingomyelinase; FIASMA*) identifiziert (Kornhuber, Muehlbacher et al. 2011). Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase ist relevant für die Infektion von anderen intrazellulären Bakterien wie *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia trachomatis* oder *Chlamydia pneumoniae* (Cockburn, Green et al. 2019). Aus diesem Grund wurden zwei weitere Inhibitoren getestet, welche ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die saure Sphingomyelinase haben, aber nicht in die Regulation des Serotoninspiegels eingreifen.

Ausgewählt wurden Benztropin, ein Antagonist von M1 muskarinergen Acetylcholinrezeptoren, und Perhexilin, ein Inhibitor der Carnitinpalmityltransferase I. Beide agieren zusätzlich als starke FIASMA (Kornhuber, Tripal et al. 2008). Für beide Substanzen wurden wie zuvor Vitalitätstests bei unterschiedlichen Konzentrationen, Wachstumskurven und CFU-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.30 zu sehen. Die ausgewählten Konzentrationen änderten die Vitalität der THP-1 Zellen nicht (Abbildung 3.30 A-B) und hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *Legionella pneumophila* in Flüssigkultur (Abbildung 3.30 C). In CFU-Assays zeigte Perhexilin sowohl 16 h als auch 40 h nach Infektion eine signifikante Reduktion der Kolonienzahl. Ergebnisse für Benztropin waren nicht signifikant, zeigten aber ebenfalls eine Tendenz die intrazelluläre bakterielle Replikation abzuschwächen.



**Abbildung 3.30: Benztropin und Perhexilin senken Legionelleninfektion.** THP-1 Zellen wurden mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert, gewaschen und mit Substanzen in entsprechender Konzentration behandelt. Nach 8 h/30 h Inkubationszeit wurde der MTT Assay (A) bzw. LDH Assay (B) durchgeführt. Legionellen wurden in einer Flüssigkultur angezogen und nach Verdünnung bei einer OD<sub>600</sub> von 0,03 mit Substanzen in angegebenen Konzentrationen versetzt. Gezeigt ist die Dauer bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde relativ zur unbehandelten Kontrolle (C). Für CFU-Assays wurde nach 2 h Inkubation mit Substanzen mit *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 0,5 für 16 h (D) oder 40 h (E) infiziert und anschließend ausplattiert. Gezeigt sind Durchschnittswerte von einem Replikat (A-B), zwei Replikaten (C) bzw. vier Replikaten (D-E) mit der dazugehörigen Standardabweichung. Signifikanz zur Lösungsmittelkontrolle DMSO wurde mit nicht-normalisierten Daten mit einem angepassten gemischten Modell mit Dunnett's Korrektur (D-E) berechnet. n.s. = nicht signifikant, \*\* =  $p \leq 0.01$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

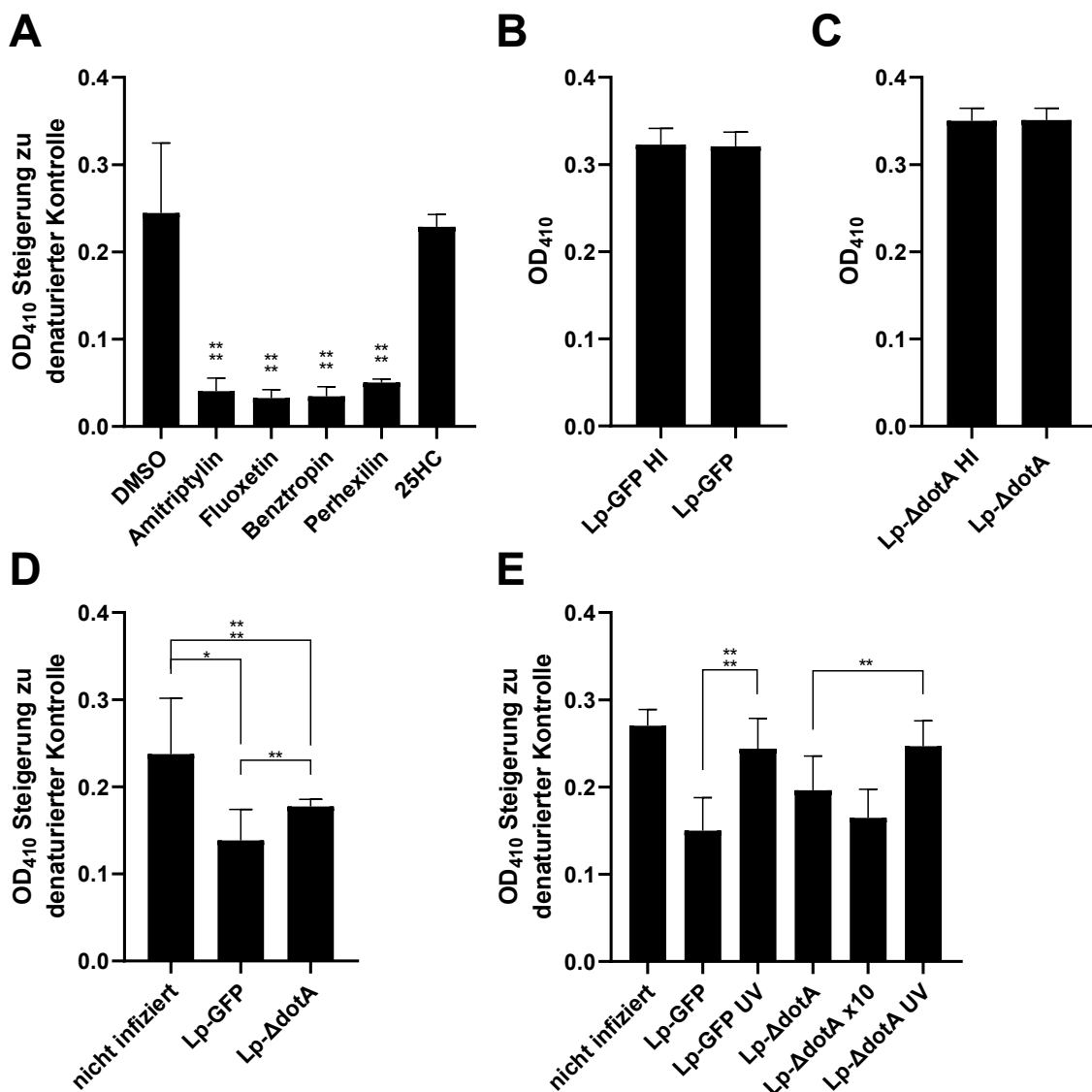
### 3.3.5 Einfluss von ASMase auf die Infektion

Nachdem neben Amitriptylin und Fluoxetin zwei weitere FIASMA die Infektion durch Legionellen gesenkt haben sollte der Einfluss dieser Inhibitoren auf die saure Sphingomyelinase (*engl. acidic sphingomyelinase*; ASMase) untersucht werden. Dazu wurde die ASMase Aktivität in THP-1 Zellen nach Zugabe der Substanzen gemessen. Wie in Abbildung 3.31 A gezeigt, inhibierten alle FIASMA Substanzen wie erwartet die Aktivität, nicht aber 25-HC, welches keine Regulation der ASMase aufweisen sollte und als Negativkontrolle verwendet wurde.

Weder die üblicherweise verwendeten GFP-exprimierenden Legionellen noch eine  $\Delta$ dotA Mutante mit inaktiviertem Typ IV Sekretionssystem beeinflussten das etablierte Testsystem (Abbildung 3.31 B-C). Dementsprechend war bei Messungen mit infizierten THP-1 Zellen keine Verzerrung der Ergebnisse durch die reine Anwesenheit der Bakterien zu erwarten. Bei einer Infektion von differenzierten THP-1 Zellen mit der GFP-exprimierenden oder  $\Delta$ dotA Mutante zeigte sich eine Reduktion der ASMase Aktivität (Abbildung 3.31 D). Diese war bei Infektion mit der  $\Delta$ dotA Mutante jedoch weniger stark ausgeprägt. Da die Bakterien alleine keinen Einfluss auf die ASMase Aktivität hatten lässt dieses Verhalten darauf schließen, dass über das Typ IV Sekretionssystem sekretierte Proteine intrazellulär in Makrophagen zur Reduktion der ASMase Aktivität führen. Es bestand die Möglichkeit, dass entsprechende Proteine nur während einer Infektion sekretiert werden und nur in dieser Situation die ASMase Aktivität durch Legionellen beeinflusst wird.

Es stellte sich die Frage ob die verminderte ASMase Aktivität nach bakterieller Infektion durch Legionellen-sekretierte Effektoren verursacht wurde oder eine Reaktion der Wirtszelle auf die Anwesenheit des Pathogens. Um diesen Einfluss zu untersuchen wurden wie zuvor THP-1 Zellen mit den zwei Legionellen Mutanten infiziert. Zusätzlich erfolgten Infektionen mit durch UV-Licht inaktivierten Bakterien. Da die  $\Delta$ dotA Mutante nicht intrazellulär repliziert, wurde eine weitere Probe mit der zehnfachen Dosis verwendet, um eine ähnliche Bakterienlast wie bei GFP-exprimierenden Legionellen zu bieten. Wie in Abbildung 3.31 E gezeigt, ist bei Zugabe der zehnfachen Menge an Bakterien die Reduktion der Enzymaktivität weiter verringert und der Effekt auf die ASMase Aktivität dementsprechend dosisabhängig. Durch die Inaktivierung der Bakterien wurde der Effekt auf die ASMase Aktivität größtenteils aufgehoben und die verbliebene Aktivität befand sich bei beiden Bedingungen knapp 10 % unter unbehandelten Zellen.

Die Inhibition der ASMase geschieht dementsprechend vorwiegend durch eine Einflussnahme der Bakterien auf die Wirtszelle. Sekretierte Effektorproteine spielen dabei eine Rolle, da sich bei Inaktivierung des Sekretionssystems die Inhibition verringert, können aber nicht allein dafür verantwortlich sein. Zudem widersprachen die Ergebnisse den Erwartungen, da damit gerechnet wurde, dass sich eine verminderte ASMase Aktivität negativ auf die Infektion auswirkt. Da bei UV-Inaktivierung der Effekt auf die ASMase Aktivität nicht ganz aufgehoben wurde, kann es sein, dass auch Makrophagen zu einem kleineren Teil zur Reduktion der Enzymaktivität beitragen und womöglich verstärkt auf lebende Bakterien reagieren.



**Abbildung 3.31: Messungen der ASMase Aktivität.** THP-1 Zellen wurden mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert, gewaschen und mit Substanzen in entsprechender Konzentration behandelt. Nach 2 h Inkubationszeit wurde der ASMase Assay durchgeführt (A). GFP-exprimierende bzw.  $\Delta$ dotA Legionellen wurden mit gleichen Mengen an Hitze-inaktivierten Legionellen (HI) verglichen (B-C). THP-1 Zellen wurden mit 20 nM PMA für 24 h stimuliert, gewaschen und mit angegebenen *Legionella pneumophila* mit einer MOI von 10 für 24 h infiziert (D-E). Gezeigt sind Durchschnittswerte von zwei bis vier (A), drei (B), zwei (C), vier bis sieben (D) oder vier Replikaten (E) mit der dazugehörigen Standardabweichung. Signifikanz zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (A) oder unbehandelten Zellen (D-E) wurde mit einem angepassten gemischten Modell mit Korrektur nach Dunnett (A) oder Sidak (D-E) berechnet. \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

### 3.3.6 Zusammenfassung des Substanz-Screening Projekts

Mit 38 unterschiedlichen Substanzen, bestehend aus 6 Kontrollen, 21 Stoffen mit potentielltem Einfluss und 11 Stoffen ausgewählt durch die AG Schlitzer, wurde der Substanz-Screen im Vergleich zum miRNA Screening deutlich kleiner entwickelt. Dies ermöglichte verlässlichere Ergebnisse der Infektionsrate durch eine erhöhte Anzahl an technischen Replikaten je Mikrotiterplatte. Die Substanzen Wortmannin, Amitriptylin, 25-HC, H-89, Fluoxetin, Forskolin und W-7 zeigten signifikante Änderungen der Infektionsrate oder der Legionellen Signalfäche. Die Validierung wurde über CFUs und Durchflusszytometrie durchgeführt und zeigte, abhängig von den verwendeten Methoden und Zeitpunkten eine erfolgreiche Validierung aller Substanzen außer W-7, was nur leichte Tendenzen zur Reduktion der Legionellenreplikation in CFU-Assays aufwies. Im Anschluss wurde die Relevanz von Substanzen, welche als FIASMA agieren und so die saure Sphingomyelinase inhibieren, für die Infektion von Makrophagen durch Legionellen entdeckt und untersucht. Es zeigte sich, dass dieses Protein sowohl durch Legionellen als auch Makrophagen im Rahmen einer Infektion reguliert ist.

## 4 Diskussion

Legionellen stellen opportunistische intrazelluläre Pathogene dar, die nach Aufnahme von kontaminierten Aerosolen beim Menschen alveolare Makrophagen infizieren können. Sie sind weltweit verbreitet und lösen das Pontiac-Fieber, oder in schwerwiegenderen Fällen die Legionärskrankheit aus. Diese ist charakterisiert durch eine schwere Pneumonie und stellt rund 4 % aller nachgewiesenen Lungenentzündungen dar (von Baum, Ewig et al. 2008). Legionellen sind weltweit verbreitet und Fallzahlen stiegen innerhalb der letzten Jahre konsistent, was aber auch auf eine verbesserte Datenlage durch intensiviertes Testen zurückzuführen sein könnte (Bodhun und Buchholz 2020, ECDC 2020). Obwohl die Krankheit mit Antibiotika behandelbar ist verlaufen 10-15 % der nachgewiesenen Fälle tödlich, wobei es durch unterschiedliche starke Ausprägungen der Symptome zu einer hohen Dunkelziffer an Fallzahlen kommt (RKI 2019).

Für *Legionella pneumophila* wurden mehrere Antibiotikaresistenzen identifiziert, die die üblich verwendeten Antibiotika betreffen. Obwohl die Datenlage, ob diese Resistenzen zunehmen, aufgrund unterschiedlicher Messmethoden nicht ganz klar ist und Infektionen mit Legionellen aktuell gut mit Antibiotika behandelbar sind, stellen Resistenzen bei einer Ausbreitung eine Gefahr für zukünftige Behandlungen dar (Pappa, Chochlakis et al. 2020). Im Zuge dessen ist es von Vorteil ein breites Verständnis über die Wirt-Pathogen Interaktionen zu gewinnen, um auch unabhängig von bestehenden Medikamenten, Infektionen alternativ oder kombinatorisch handhaben zu können. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass weitere miRNAs, Inhibitoren und relevante Signalwege gefunden wurden, die die Infektion durch Legionellen beeinflussen oder für diese relevant sind. Diese stellen somit einen Ansatz für weitere Untersuchungen dar.

### 4.1 Etablierung eines miRNA-Screening Verfahrens

Um Substanzen und involvierte Signalwege zu finden, sollte ein Hochdurchsatzverfahren entwickelt werden, das es erlaubt eine hohe Probenzahl im Rahmen der Legionellen-Makrophagen Infektion zu untersuchen. Die Anwendung sollte anhand einer miRNA-Library sowie einer kleineren, selbst erstellten Sammlung an bioreaktiven Substanzen getestet werden. Automatisierte Verfahren zur Identifikation von miRNAs sind notwendig, da die Anzahl der zu untersuchenden Proben mit über 2700 miRNAs nicht mehr mit konventionellen Methoden praktikabel ist. Nach einem vorläufigen Test, bei dem drei der 36 miRNA *Library* Platten gescreent wurden, zeigten sich Probleme in den generierten Daten. So waren die gemessenen Infektionsraten, gegenüber am Rand der 96-Well Platten befindlichen Kontrollen, bei mittig gelegenen Proben unabhängig von der durchgeführten Behandlung erhöht.

Obwohl verschiedene Methoden zur Eindämmung dieses Randeffekts versucht wurden, konnte der Effekt nicht verhindert werden. Es wurde in Erwägung gezogen die Daten mathematisch anhand eines größeren Datensatzes mit unbehandelten Proben auf jeder Position zu korrigieren. Da drei in CFU-Assays validierte miRNAs bei weiteren Tests mit dem Screening Verfahren keine Signifikanz mehr ergeben haben, wurde diese Idee jedoch verworfen, da das System als zu unsicher für diese Art von Behandlungen empfunden wurde.

Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit von stabilen Screening Methoden bei Hochdurchsatz-Screenings. Dies kann durch zwei unterschiedliche Techniken erreicht werden, die hier nicht ausreichend umgesetzt wurden. Zum einen sollten die endgültigen Werte, welche nach Durchführung gemessen werden, sich stark von denen der Kontrollen unterscheiden oder, bei kleinerer Effektstärke, dies durch eine entsprechende Anzahl an Replikaten ausgeglichen werden.

Bei der Analyse des Randeffekts mit unbehandelten Proben ergab sich für das Verfahren, welches auch für die drei Testplatten eingesetzt wurde, eine durchschnittliche Infektionsrate von 22,67 % infizierten Zellen mit einer Standardabweichung von 6,35 %. Bei gleichbleibender Standardabweichung wären die maximalen Veränderungen gegenüber der Kontrolle das 3,5-beziehungsweise 4,1-fache nach unten oder oben. Mit 8,6 % und 35,7 % infizierten Zellen als Minimum beziehungsweise Maximum im Screen der drei miRNA *Library* Platten, wurden die genannten maximalen Veränderungen nicht ausgenutzt, obwohl der Randeffekt diese Werte vermutlich in Richtung der Extreme verstärkt hat. Die Effektstärke der miRNA Behandlungen blieb demnach deutlich unter dem was hätte gemessen werden können. Möglichkeiten zur Verstärkung der Wirkung von miRNAs bieten sich nur durch eine Erhöhung der Transfektionseffizienz, welche durch eine höhere Konzentration an transfizierter miRNA, einer erhöhten Menge an Transfektionsreagenz oder einem besseren Transfektionsreagenz erreicht werden kann. Keiner der genannten Punkte war in dieser Situation durchführbar, da nachweislich höhere Konzentrationen an miRNAs oder des verwendeten Transfektionsreagenz siPORT Neo FX zu einem erhöhten Zelltod führten. Die Auswahl des Transfektionsreagenz erfolgte über vorherige ausführliche Tests durch Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Schreck und stellte das bekannte Optimum für Transfektionen im System mit THP-1 Zellen und miRNAs dar.

Wie zuvor beschrieben können kleine Effektstärken durch eine erhöhte Anzahl an Replikaten ausgeglichen werden. Für das Testscreening wurden drei biologische Replikate im zeitlichen



Abstand von jeweils einer Woche durchgeführt. In seltenen Fällen befand sich eine miRNA aufgrund des Designs der *Library* doppelt auf einer Platte. Um Randeffekte zu vermeiden beziehungsweise diese durch variierende Positionen einer Probe rechnerisch zu entfernen bedarf es mehrerer technischer Replikate verteilt auf einer Platte oder biologische Replikate verteilt über mehrere Platten. In beiden Fällen hätte die Anordnung der miRNA Proben gegenüber dem der *Library* verändert werden müssen. Da Proben in einem der ersten automatisierten Pipettierschritte von einer Ursprungsplatte auf eine Arbeitsplatte übertragen wurden, wäre die Positionsvariation für biologische Replikate möglich gewesen. Ein logistischer sowie informatischer Aufwand Probenpositionen zu variieren wäre jedoch gegeben gewesen. Zudem hätte sich die Pipettierzeit für diesen Schritt massiv erhöht, was bei 12 µl je Well eine hohe prozentuale Verdunstung bedingt hätte. Diese hätte wiederum zu den gleichen Problemen der Positionsabhängigkeit führen können, da die Verdunstung nicht gleichmäßig über die Platte erfolgt.

Der Anstieg an logistischem und informatischem Aufwand, sowie erhöhter Pipettierzeit gilt auch für die Durchführung mit mehreren technischen Replikaten verteilt auf einer Platte. In diesem Fall werden insgesamt mehr Messkonditionen erstellt, da eine zeitliche Variation mit biologischen Replikaten beibehalten werden sollte um Umgebungsvariationen auszugleichen. Dementsprechend hätten Duplikate oder Triplikate zu einer Verdoppelung oder Verdreifachung der Proben und nötigen Materials geführt. Unabhängig von den deutlich erhöhten Kosten wäre das Vorhaben personell nicht mehr in einem sinnvollen zeitlichen Rahmen umsetzbar gewesen. Der Grund ist dabei der, aufgrund räumlicher Bedingungen, nötige Arbeitsaufwand die Infektion und Fixierung der Proben händisch durchzuführen. Dies limitierte die maximale Anzahl an Proben die in einer Woche prozessiert werden konnten.

Aus diesen Gründen wurde das für das miRNA Screening angedachte Verfahren nicht abgeändert. Dies resultierte in der Einstellung der Versuche eine miRNA-*Library* mittels des entwickelten Hochdurchsatzverfahrens zu screenen. Das geplante Screening der bioreaktiven Substanzen löste eine der zwei hier aufgezeigten Limitationen der Methode. Obwohl die möglichen Veränderungen der Infektionsrate gegenüber der Kontrolle unverändert blieben, konnten technische Replikate in hoher Anzahl die technisch bedingten Schwankungen ausgleichen.

## 4.2 Einfluss der miRNAs-101, 106a und 107 auf die Legionellen-Replikation

### 4.2.1 Detektion der validierten miRNAs

Dadurch, dass im Teilscreening die miRNA *Library* Platten der Reihenfolge nach ausgewählt wurden, haben die im miRNA Screening untersuchten Proben eine systematische Zusammenstellung. Von den 234 im Teilscreening untersuchten miRNAs verbleiben nach Abzug von doppelt vorkommenden miRNAs 202 Proben. Darin enthalten waren 17 Varianten der let-7 miRNA und 185 weitere miRNAs, von denen 5 eine ein- oder zweistellige, 76 eine dreistellige und 104 eine vierstellige Nummer hatten. Bis auf die let-7 Vertreter starten alle Proben mit einer 1. Wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben wurden miRNAs in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert. Niedrige Nummern weisen aufgrund der damals eingesetzten Methoden eine höhere Expression auf oder regulieren für die Zelle relevante mRNAs und wurden so früher als andere miRNAs entdeckt. Im Schnitt ist über diese miRNAs mehr bekannt als über später gefundene Vertreter.

miRNAs-101, 106a und 107 wurden 2002 bei Untersuchungen zur spinalen Muskelatrophie entdeckt. Diese Krankheit bricht bei einer Reduktion des Proteins SMN aus und man erkannte, dass damit assoziierte Proteine Gemin3 und Gemin4 zusammen mit Ago2 und mehreren RNAs einen Ribonukleinkomplex bilden (Mourelatos, Dostie et al. 2002). Dabei wurden 32 neuartige miRNAs als Teil dieses Komplexes gefunden und miRNA-106a sowie miRNA-107 durch Sequenzhomologie mit miRNA-91 beziehungsweise miRNA-103 identifiziert.

miRNAs werden abhängig von ihrer *seed region*, den Nukleotiden 2 bis 7, in Familien eingeteilt, wobei die drei miRNAs-101, 106a und 107 sich jeweils in einer anderen Familie befinden. miR-101 ist der alleinige Vertreter der miRNA-101 Familie und wird aus zwei primären miRNAs aus unterschiedlichen genomischen Orten prozessiert. miRNA-106a gehört zur miR-17 Familie die auch miRNAs-17, 18a/b, 20a/b, 93 und 106b enthält. Die miRNA-103 Familie enthält neben miRNA-107 auch miRNA-103a-1/2 und 103b-1/2. Aufgrund unterschiedlicher *seed regions* in den drei analysierten miRNAs binden diese geeignete mRNAs nicht an derselben Position. Eine mRNA kann theoretisch aber durch mehr als eine miRNA an unterschiedlichen Positionen gebunden werden.

Obwohl die drei miRNAs ursprünglich durch den miRNA Screen gefunden und anschließend über CFUs validiert wurden, zeigten sie bei Wiederholung des Screenings mit mehreren Replikaten pro Platte keine Änderung gegenüber der miRNA Negativkontrolle. Erklärt werden

kann dies durch die erst zu einem späteren Zeitpunkt messbare Steigerung der Legionellenreplikation, welche in CFUs erst nach 48 h ihr Maximum erreicht hat. Diese Regulation der Replikation war nach 16 h Infektion im Screen nicht messbar, was allerdings die Frage aufwirft, ob die drei zur Validierung ausgewählten miRNAs zufälligerweise im CFU-Assay ein gegenüber der Kontrolle verändertes Ergebnis aufweisen. Aufgrund der Anzahl an Replikaten und der damit verbundenen Signifikanz der CFU-Assay Ergebnisse ist der Befund der erhöhten Replikation höchstwahrscheinlich valide. Wie in Abbildung 3.9 C gezeigt, war bei der Validierung der miRNAs mit dem Screening Verfahren bei keiner der drei miRNAs ein Effekt zu sehen. Auch hier wurden mehrere biologische und technische Replikate angefertigt was die Ergebnisse entsprechend sicher macht. Die zuvor beobachtete Steigerung der Infektionsrate ist demnach ausschließlich auf durch Randeffekte vermittelte Auswirkungen zurückzuführen. Die aus dem Screening stammenden miRNAs wurden somit abhängig von ihrer Lokalisation auf den Platten und durch Umwelteinflüsse generierte Auswirkungen ausgewählt.

Ungewöhnlich scheint, dass alle zur Validierung ausgewählten miRNAs bei einer Transfektion mit siPORT Neo FX in CFUs signifikante Steigerungen aufwiesen. Da die drei miRNAs durch verhältnismäßig niedrige Nummern wie zuvor beschrieben eher für die Zelle wichtige oder höher exprimierte miRNAs darstellen und sie zudem unterschiedliche Bindungsstellen adressieren, wird ein Einfluss der miRNAs auf die Infektion etwas wahrscheinlicher. Da miRNAs meist viele mRNAs binden und regulieren, können sie einen breit gestreuten Einfluss aufweisen. Da Legionellen aufgrund ihres Infektionsgeschehens und nötiger Nährstoffversorgung auf korrekte Aktivität vieler Signalwege der Wirtszelle angewiesen sind, beeinflusst eine Deregulation dieser Homöostase die Bakterien vermehrt. Die hohen gemessenen Werte von 40-70 % Steigerung gegenüber der Kontrolle nach 48 h Infektion weisen jedoch eher auf einen spezifischeren Einfluss der miRNAs hin.

Bekannt ist über miRNA-101 vorwiegend eine Aktivität als Tumorsuppressor in verschiedenen Krebserkrankungen. Sie weist zudem Beteiligungen, unter anderem in der Regulation der Zellproliferation und Apoptose auf (Wang, Deng et al. 2018). Dabei scheint vor allem der in mTOR mündende PTEN/AKT Signalweg durch miRNA-101 beeinflusst zu sein, wobei eine Überexpression der miRNA in einer PTEN Senkung resultiert (Wang, Yao et al. 2017, Wei, Jin et al. 2021). Interessanterweise wird durch miRNA-101 auch das in Kapitel 4.3 diskutierte Sphingolipidlevel der Zelle modifiziert (Chen, Yang et al. 2015). Auch miRNA-106a weist unnatürliche Konzentrationen in Tumorgeweben auf und ist unter anderem in der Regulation

der Zellproliferation und Apoptose involviert. Dabei spielt hauptsächlich eine Beeinflussung über FASTK eine Rolle. Mehrere durch miRNA-106a adressierte Proteine sind in der Resistenz gegen verschiedene Arzneimittel beteiligt. Unter anderem wird auch PTEN im Rahmen von Darmkrebs inhibiert (Pan, Zhuang et al. 2016). miRNA-107 agiert wie die zwei anderen miRNAs als Tumorsuppressor (Song, Ma et al. 2015) und inhibiert Zellproliferation über CDK8 (Li, Luo et al. 2014). Zudem hat sie eine Funktion in der Homöostase von Insulin und Glukose und agiert dabei über Inhibition von Caveolin-1 und Dicer (Rottiers und Näär 2012). Zusammengenommen stellen alle hier näher analysierten miRNAs eine Verbindung zur Zellproliferation über Regulation des AKT/mTOR Signalweges her. Dieser Signalweg scheint durch eine Vielzahl an miRNAs sowohl positiv als auch inhibierend adressiert zu werden, was auch durch seine zentrale Funktion zu erwarten ist (Ghafouri-Fard, Abak et al. 2021). Ob eine Regulation dieses Signalweges ausschlaggebend für die gesteigerte intrazelluläre Replikation der Legionellen ist konnte hier nicht beantwortet werden.

Nachdem das Transfektionsreagenz von siPORT Neo FX auf Viromer Green gewechselt wurde, konnte wie in Abbildung 3.15 die Steigerung der Legionellenreplikation für miRNA-101 und miRNA-106a bestätigt werden. Der zuvor beobachtete Effekt von miRNA-107 war jedoch nicht mehr replizierbar. Während die Anzahl an gebildeten Kolonien in CFU-Assays bei Transfektion mit siPORT Neo FX nach 48 h wieder auf das Level der Kontrolle sank, resultieren mit Viromer Green transfizierte miRNAs in einer dauerhaft ansteigenden Replikation. Warum die Auswahl des Transfektionsreagenz einen Unterschied in diesem System macht ist nicht klar. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre der GC-Gehalt, der bei miRNA-107 mit 48 % etwas höher liegt als bei miRNA-101 mit 33 % und miRNA-106a mit 43 %. Der GC-Gehalt der *seed region* liegt mit 66 % doppelt so hoch wie bei den anderen miRNAs. Die Lokalisation von GC reichen Regionen sollte aber bei der Bildung von Vesikeln nicht bestimmend sein, zumal kein ungewöhnlich langer Bereich mit ausschließlich GC oder AU Nukleotiden vorliegt. Ausschlaggebend ist vermutlich eher die chemische Zusammensetzung des Transfektionsreagenzes. Während siPORT Neo FX kationische Lipide enthält und zusammen mit negativ geladener RNA Liposomen bildet enthält Viromer Green Polymere die mit der RNA Komplexe bilden. Bei Aufnahme durch Endozytose verbindet sich die Membran der Liposomen mit dem des Endosoms und enthaltene miRNA wird freigesetzt. Für Polymere erfolgt die Freisetzung über die sogenannte *proton sponge* Hypothese bei der eine pH-Pufferung der Polymere zum Einströmen von Wasser in das Endosom führt und dieses zum Platzen bringt (Wojnilowicz, Glab et al. 2019). Es ist möglich, dass bei Verwendung des in Viromer Green enthaltenen Polymers keine geeignete Komplexbildung zustande kommt, was die Funktion der

miRNA-107 einschränkt. Da aber eine erfolgreiche Transfektion mit Viromer Green für miRNA-107 mittels qRT-PCRs nachgewiesen wurde, stellte die Aufnahme in die Zelle kein Problem dar. Dementsprechend könnte eher die intrazelluläre Funktionalität nach Transfektion eingeschränkt sein.

#### 4.2.2 Diskussion der Massenspektrometrie-Daten

Für die Analyse der miRNAs-101, 106a und 107 über Massenspektrometrie wurden jeweils vier Replikate transfizierter und teilweise infizierter Makrophagen verwendet, und die Auswirkungen der miRNAs zum Zeitpunkt der Infektion sowie 18 h und 36 h nach Infektion untersucht. Die Daten wurden dabei immer mit Bezug auf die miRNA Negativkontrolle des jeweiligen Zeitpunkts analysiert.

Bei Verwendung einer zweidimensionalen PCA zeigte sich, dass sich die gemessenen Proteinlevel vorwiegend durch das Infektionsgeschehen und den damit verbundenen Auswirkungen verändern. Der Effekt der Transfektionen und eine Erhöhung der intrazellulären miRNA Mengen hatte vergleichsweise kleine Auswirkungen zur Folge. Dies ist übereinstimmend mit der Tatsache, dass bei Infektionen mit Legionellen über Effektoren eine Vielzahl an Signalwegen reguliert wird. Unter den, durch diese Effektoren betroffenen Proteinen befinden sich auch solche, die den gesamten Transkriptions-Haushalt der Wirtszelle modulieren (Mondino, Schmidt et al. 2020). Diese dadurch ausgelösten weitreichenden Veränderungen der Expression vieler Proteine führen zur beobachteten Auftrennung der Proben abhängig ihres Infektionszustandes.

Auch über die Volcano Plots zeigte sich, dass gegenüber dem generellen Infektionsgeschehen, durch die miRNA Transfektionen die Menge weniger Proteine erhöht oder gesenkt wurden. Die durchschnittliche Intensität, mit der einzelne Proteine reguliert wurden, war dabei zusätzlich niedriger. Bei Forschungen mit miRNAs wurde wiederholt festgestellt, dass durch einzelne miRNAs ausgelöste Regulationen eher geringe Auswirkungen auf die Konzentration von Proteinen haben und diese meist weniger als halbieren (Baek, Villén et al. 2008). Vermutet wird, dass aufgrund der geringen Effektstärke, miRNAs in den meisten Fällen der Feinregulation der Proteinproduktion dienen und kleine Fluktuationen ausgleichen oder induzieren können (Ebert und Sharp 2012). Die beobachteten Effektstärken sowie Richtungen sind somit mit Ergebnissen aus der Literatur und den bekannten Folgen einer Legionelleninfektion beziehungsweise Transfektion von miRNAs vereinbar. Dass der Trend der Regulation sich über den beobachteten Zeitraum von 36 h verstärkt, passt zu der Annahme, dass die Infektion durchgängigen Einfluss hat und miRNAs auch noch zu diesen Zeitpunkten

agieren. Dass Auswirkungen durch miRNAs erst zu späteren Zeitpunkten deutlich werden, könnte zum Teil auch daran liegen, dass bestehende Proteine erst langsam im Rahmen der natürlich vorkommenden Proteolyse abgebaut werden (Mathieson, Franken et al. 2018).

Während miRNA-101 und 106a transfizierte Proben 18 h nach Infektion einen Trend zu reprimierter Proteinexpression aufweisen, zeigen miRNA-107 transfizierte Proben dieses Verhalten interessanterweise bei 36 h erst zu einem späteren Zeitpunkt. Dies könnte eventuell auf eine Regulation von Proteinen mit höherer Halbwertszeit hinweisen. Alternativ könnte auch die Expression von üblicherweise durch die Infektion ansteigenden Proteinen blockiert werden. Da miRNA-107 bei Transfektion mit Viromer Green in CFUs aber keine Veränderung der Infektion bewirkte, und MS Proben durch solch eine Transfektion generiert wurden, ist unklar ob sich adressierte Proteine auf die Infektion auswirken.

Viele der über gProfiler2 und STRING identifizierten Signalwege und Proteinklassen bezeichnen Vorgänge deren Thematiken sich überschneiden. Deren Einfluss auf den Lebenszyklus von *Legionella pneumophila* ist oft aufgrund der bakteriellen Verhaltensweise verständlich. Eines der Ziele bei der Etablierung einer intrazellulären Nische ist die Regulation des Zelltods der Wirtszelle, um den für die Replikation nötigen Zeitraum ungestört zu überstehen. Von den in Tabelle 3.3 genannten Begriffen trifft dies auf Apoptose (Reactome), die Regulation von apoptotischen Signalwegen (GO) und Abtötung von Zellen (GO) zu. Die transfizierten miRNAs senkten die Expression beteiligter Proteine über den beobachteten Zeitraum und verhinderten so, zusätzlich zu den von den Legionellen getroffenen Maßnahmen, vermutlich den Zelltod der Wirtszelle und verbesserten die Aufenthaltsbedingungen des Pathogens. Die Regulation der in diesen Begriffen enthaltenen Proteine war im Schnitt zu späteren Zeitpunkten verstärkt reprimierend. Da *L. pneumophila* nach rund 16 h die Apoptose einleitet, um der Wirtszelle zu entkommen und den nächsten Infektionszyklus zu starten, und aus CFUs dieses Verhalten auch beobachtet wurde, überwindet die durch Legionellen induzierte Apoptose die Regulation der transfizierten miRNAs.

Um sich in der Wirtszelle erfolgreich zu replizieren, benötigen Legionellen eine große Menge an geeigneten Nährstoffen. Ein essentieller Bestandteil dieser Nährstoffe sind Aminosäuren (Fonseca und Swanson 2014). *Legionella pneumophila* nutzt Aminosäuren nicht nur zum Aufbau eigener Proteine, sondern verstoffwechselt diese auch zur Energiegewinnung. Dabei werden ausgewählte Aminosäuren wie Serin, Cystein und Alanin bevorzugt umgesetzt (Best und Abu Kwak 2019). Die ebenfalls aus Tabelle 3.3 stammenden Begriffe Serinproteasen Aktivität (GO), Aktivität von Endopeptidase Inhibitoren (GO) und die negative Regulation von

Proteolyse (GO) weisen darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Aminosäuren und kurzen Peptiden durch die miRNA Transfektionen beeinflusst wurde. Eine Reduktion der Aktivität von Inhibitoren der, durch Endopeptidasen vollzogenen Proteolyse, resultiert in einer Steigerung der Proteindegradation und einer Steigerung der Verfügbarkeit einzelner Aminosäuren. Dem entgegengesetzt steht eine Reduktion der Serinproteasen Aktivität. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch die transfizierten miRNAs bestimmte Proteine weniger degradiert werden als andere.

Durch die transfizierten miRNAs wurden Signalwege reguliert die durch darin enthaltene Rho GTPasen (GO) definiert sind. Als Signaltransduktoren beeinflussen diese eine Vielzahl an Signalwegen und Variationen in der Aktivität resultieren in Veränderungen, die die ganze Zelle betreffen. Rho GTPasen stellen aufgrund ihrer Funktion ein Ziel dar, das stark reguliert wird und von vielen miRNAs posttranskriptionell reguliert wird. Aufgrund des Einflusses von Rho GTPasen auf, unter anderem, den intrazellulären Vesikeltransport könnten diese realistische Auswirkungen auf die Infektion durch Legionellen haben (Liu, Bi et al. 2012). Vergleichbare, die ganze Zelle betreffende, Modifizierungen von Aktivitäten werden durch posttranslationale Phosphorylierungen (GO) verursacht, wobei eine Zuordnung zu infektionsrelevanten Signalwegen nicht möglich ist. Dasselbe gilt für den Begriff Bindung an/von Schwefelverbindungen (GO), welcher zu allgemein gefasst war, um Infektions-beeinflussende Zusammenhänge aufzudecken.

Auffällig signifikant ist der Begriff Regulation des IGF Transports und Aufnahme, da zu diesem Thema keine Forschungsergebnisse zu finden sind und bei Analyse der relevanten Proteine diese in keinem erkennbaren Zusammenhang mit diesem Begriff stehen. Auffällig geworden ist dieser Signalweg durch eine signifikante Regulation von neun Proteinen, welche Teil dieses Reactome Terms sind. Dabei handelt es sich um Proteasen (TIMP1, ITIH2), das Lipidbindende Apolipoprotein B(APOB), Albumin und dessen Strukturverwandten fötalen Version (ALB, AFP), Blutgerinnungs-faktoren und im Blutplasma aktive Peptidase Plasminogen (F2, F5, PLG) sowie eine Komponente des Komplementsystems (C3). Bei Analyse aller detektierten Proteine mit Bezug zu diesem Reactome Begriff zeigten sich, wie in Abbildung 3.21 gezeigt, mehrere über den beobachteten Zeitraum mit reduzierten Konzentrationen. Es ist unklar, ob und in welchem Zusammenhang dieser Signalweg aufgrund der hinterlegten Proteine mit einer Legionelleninfektion stehen könnte. Der Signalweg selbst resultiert in einer Regulation von MAPK und des bereits bekannten mTOR Signalwegs (Hakuno und Takahashi 2018).

1982 wurde berichtet, dass *Legionella pneumophila* bei einer Infektion die Produktion von gerinnungsfördernden Substanzen steigert (Miragliotta, Semeraro et al. 1982). In den Massenspektrometriedaten zeigte sich eine graduelle Reduktion der Komplement- und Gerinnungskaskaden (KEGG) durch miRNA Transfektion. Diese Systeme haben bei einem Befall mit Pathogenen immunoregulatorische Funktionen und stellen einen Teil des angeborenen Immunsystems dar, indem sie Entzündungsreaktionen fördern und die Produktion von antimikrobiellen Peptiden steigern. Ein für dieses System theoretisch mögliches „einfangen“ von Bakterien durch Produktion von Fibrin ist aufgrund der genutzten *in vitro* Methoden jedoch unrealistisch (Nordahl, Rydengård et al. 2004, Berends, Kuipers et al. 2014). Die durch die miRNA Transfektion verursachte Schwächung dieses Teils des Immunsystems könnte zu einer verbesserten Replikation der Legionellen beigetragen haben.

Während alle ausgewählten, über gProfiler2 signifikant gekennzeichneten, Signalwege und Proteinklassen über den beobachteten Zeitraum von 36 h nach Infektion eine meist graduell abbauende Konzentration von den im Begriff enthaltenen Proteinen aufwiesen, war dies einzig für den Lsm2-8 Komplex nicht der Fall. Nach miRNA-101 und miRNA-106a Transfektion waren die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erhöht. Lsm Proteine sind eine Familie von RNA-bindenden Proteinen die an der Prozessierung und Regulation vieler RNAs beteiligt sind. Sie bilden unter anderem den Lsm2-8 Komplex der die korrekte Faltung von tRNAs, snoRNAs, rRNAs und mRNAs als Chaperon unterstützt. Zudem wird durch diesen Komplex die U6 snRNA im Zellkern gehalten und ermöglicht so ein effizientes Spleißen von Introns (Spiller, Boon et al. 2007). Eine Förderung dieses Komplexes könnte der Aufrechterhaltung des Wirtszellstoffwechsels dienen und so unerwünschte Fluktuationen während der Legionellenreplikation verringern.

Zur Analyse, ob Proteine mit miRNA Bindestellen in ihrer mRNA Sequenz eine stärkere Reduktion in ihrer Konzentration erfahren als solche ohne Bindestelle, wurde mit Abbildung 3.23 eine kumulative Verteilung von Proteinen mit entsprechenden Bindestellen angefertigt. Dabei zeigte sich, dass es bei miRNA-101 behandelten Proben zu deutlichen Unterschieden in den Kurven kommt und Proteine mit perfekt komplementärer miRNA Bindestelle im Schnitt geringere Konzentrationen aufweisen. Dieser Effekt war schwächer auch für miRNA-106a, aber nicht bei miRNA-107 Transfektion zu beobachten. Die Ausprägung war selbst für miRNA-101 geringer als bei miRNA-155 Transfektion in der Studie aus der diese Methode übernommen wurde (Selbach, Schwanhäusser et al. 2008). Da der Effekt bei steigender Komplementarität der Bindestelle zunimmt, kann angenommen werden, dass die Bindung einer



miRNA erfolgreich zur Reduktion der Proteinkonzentration führt. Da miRNA-101 und miRNA-106a in allen CFUs die Legionellenreplikation gesteigert haben und bei dieser Analyse Unterschiede aufweisen, kann darauf geschlossen werden, dass Infektions-beeinflussende Proteine von den miRNAs unterschiedlich reguliert werden. Für miRNA-101 sind eher Proteine mit einer entsprechenden miRNA Bindestelle für den Effekt auf die bakterielle Replikation verantwortlich. miRNA-106a beeinflusst diese vermutlich eher über indirekte Effekte, indem zum Beispiel relevante Proteine von solchen mit Bindestelle reguliert werden. Dass trotzdem Überschneidungen zwischen den miRNAs, wie in Abbildung 3.18 gezeigt, entstehen, kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass eine sehr große Anzahl an Proteinen gemessen wurde und Überschneidungen dadurch praktisch vorkommen müssen. Alternativ zeigten sich viele Signalwege und Proteinklassen durch die Transfektionen ähnlichen Regulationen ausgesetzt. Die verwendeten miRNAs könnten dementsprechend, unabhängig von ihren direkten Bindungspartnern, über Signalkaskaden ähnliche Proteine regulieren.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass obwohl die drei miRNAs-101, 106a und 107 aufgrund von Randeffekten ausgewählt wurden, sie in CFU-Assays in einer signifikanten Steigerung der Replikation von Legionellen resultierten. Nach Verwendung eines alternativen Transfektionsreagenzes war dieser Effekt für miRNA-107 nicht mehr gegeben. Da weder über qPCRs noch aus Massenspektrometrie-daten Proteine mit direktem Einfluss auf die Infektion abgeleitet werden konnten, wurden durch die miRNA Transfektion regulierte Signalwege und Proteinklassen identifiziert. Diese stellen potentielle Verursacher der gesteigerten Legionellenreplikation dar, wobei auch ein durch die Transfektion veränderter Vesikeltransport ausschlaggebend sein kann.

### 4.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Infektion durch Legionellen

Da beim Screening der miRNA *Library* Probleme mit der Replizierbarkeit aufgrund von Randeffekten deutlich geworden sind, wurde das Verfahren abgewandelt und auf ein Screening von Chemikalien als Inhibitoren verschiedener Proteine angepasst. Da eine deutlich kleinere Anzahl an Proben untersucht wurde ermöglichte dies den Einsatz von mehreren technischen Replikaten verteilt auf derselben Mikrotiterplatte. Randeffekte konnten durch den Einsatz dieser Replikate rechnerisch ausgeglichen werden.

Insgesamt handelte es sich um 38 Substanzen von denen 32 bisher nicht im Zusammenhang mit einer *Legionella pneumophila* Infektion getestet wurden. Bekannte Literatur von Screening Verfahren bei denen Legionellen involviert waren, haben unterschiedliche Zielsetzungen verfolgt. Größere Screenings umfassen unter anderem: die sinkende Effizienz von 10 bekannten

antimikrobiellen Substanzen gegen verschiedene Legionellenstämme zwischen den Jahren 2000 und 2017 (Natås, Brekken et al. 2019), Echtzeit-Messungen der Effizienz von in anderen Organismen wirksamen antimikrobiellen Substanzen durch Lumineszenz und Fluoreszenzmarkierung basierte Screening Verfahren (Chiaraviglio und Kirby 2015, Chiaraviglio, Kang et al. 2016), den Einfluss von Legionellen sekretierten Effektoren auf die intrazelluläre Replikation in einem Transposon-Screening (Shames, Liu et al. 2017), den Einfluss von Chemikalien aus drei Substanz Libraries auf die Translokation von Legionellen sekretierten Effektoren (Charpentier, Gabay et al. 2009), zwei vorwiegend in *Acanthamoeba castellanii* durchgeführte Untersuchungen (Harrison, Chiriano et al. 2015, Hanna, Kicka et al. 2020) und einen genomweiten CRISPR Screen bei dem, in Abwesenheit von Makrophagenproteinen, das Wachstum von Legionellen untersucht wurde (Jeng, Bhadkamkar et al. 2019).

In allen bekannten Fällen, wurden gegenüber dem hier genutzten Verfahren andere Methoden, Organismen, oder Auswertungen verwendet. Größere methodische Ähnlichkeit hat eine 2014 veröffentlichte Untersuchung, bei der die Wirkung von 640 von der FDA freigegebenen Chemikalien auf vier bakterielle Infektionen untersucht wurde (Czyż, Potluri et al. 2014). Darin wurden ebenfalls die Einflüsse auf eine Legionelleninfektion von Makrophagen analysiert und eine Datenerhebung mittels Mikroskopie durchgeführt.

Differenzen gibt es beim genaueren Vorgehen der einzelnen Schritte des Protokolls. So haben Czyż et al. für alle Substanzen eine Konzentration von 33  $\mu\text{M}$  gewählt und diese nicht wie in dieser Arbeit an den Zelltod von Makrophagen, das Wachstum von Legionellen in Flüssigmedium und praxisübliche Konzentrationen aus der Fachliteratur angepasst. Als Novum gilt die hier verwendete Auswertung der Mikroskopiedaten durch die speziell entwickelte Software, bei der Zellgrenzen detektiert und einzelne Zellen voneinander unterschieden werden können. Dies erhöht gegenüber konventionellen Methoden, wie der Analyse über Verhältnisse von Flächen und der Normalisierung auf Zellkerne, die Aussagekraft der Daten. Neben der Analyse der Inhibition über infizierte zu nicht-infizierten Zellen ermöglichte die Unterscheidung einzelner Zellen eine genaue Zuordnung von Legionellensignalen und so die durchschnittliche von Legionellenvakuolen beanspruchte Fläche pro infizierter Zelle.

Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen wurden drei der am stärksten wirksamen Substanzen von Czyż et al. als Positivkontrollen übernommen. Dihydroergocristin, Amitriptylin und Bepridil zeigten in der Publikation eine Inhibition der *L. pneumophila* Infektion von mehr als 80 %, welche in der hier vorliegenden Arbeit nicht repliziert werden konnte. Dihydroergocristin

zeigte eine Reduktion gegenüber der Ladungskontrolle um 9,2 %, Amitriptylin um 17,4 % und Bepridil um 7,3 %. Die gemessenen Werte waren somit weitaus niedriger als erwartet. Dem gegenüber steht Fluoxetin, welches bei Czyż et al. eine Reduktion um 53,5 % bewirkte und schwächer war als oben genannte Substanzen, aber in dieser Arbeit mit 37,2 % Infektionsreduktion zu den am stärksten wirksamen Substanzen zählte. Eine Vergleichbarkeit der Daten ist somit sowohl in der durchschnittlichen Stärke als auch der einzelnen Stoffe zueinander nicht möglich.

Obwohl Amitriptylin keine Signifikanz durch die Rate an infizierten Zellen aufwies, zeigte sich, dass die durchschnittliche Fläche an Legionellensignal innerhalb infizierter Zellen signifikant sank. Da Czyż et al. wahrscheinlich keine solche Unterscheidung zwischen der Infektionsrate und der Infektionsstärke einzelner Zellen vornahmen stellen deren Daten eine Mischung dieser zwei Effekte dar. Vergleichbare Daten ließen sich in dem hier vorliegenden Fall herstellen, indem die beiden Messwerte multipliziert werden würden, da die Zugabe einer Substanz sowohl zur verringerten/gesteigerten Aufnahme von Bakterien als auch zu verringerter/gesteigerter intrazellulärer Replikation führen kann. Die Verrechnung wurde durchgeführt, was zu einer verstärkten sigmoidalen Kurve der Ergebnisse führte. Dies führte aber nicht dazu, dass weitere Substanzen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Messmethoden ist ein direkter Vergleich der Daten schwierig, wobei die hohe Differenz der Daten unerklärt bleibt.

Zur Validierung des Effektes auf das Infektionsgeschehen wurde zunächst die Durchflusszytometrie herangezogen. Dabei zeigten nur Wortmannin und Amitriptylin eine signifikante Senkung infizierter Zellen, wobei ein Trend für alle Substanzen vorhanden war. Die größten Abweichungen der infizierten Zellen gegenüber den aus dem Substanz-Screen erhaltenen Daten zeigte sich für 25-HC und H-89. Würden unterschiedliche Detektionslimits die beiden Methoden unterscheiden, müsste sich dies eher auf alle Proben auswirken, sodass unklar bleibt warum bei diesen zwei Stoffen mehr Abweichungen aufgetreten sind. Es wurde versucht eine äquivalente Auswertung der Durchflusszytometriedaten zur Legionellen Signalfläche des Screenings herzustellen. Dabei wurden die durchschnittlichen Intensitätswerte aller detektierten GFP Signale gemittelt und die Steigerung gegenüber nicht infizierten Zellen mit den Signalen des Screenings verglichen. Es zeigten sich trotz unterschiedlicher Skalen tendenziell vergleichbare prozentuale Abweichungen zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Validierung über Durchflusszytometrie zeigte zusammengefasst einige Schwierigkeiten die aus dem Screen gewonnenen Daten signifikant widerzuspiegeln, wobei generelle Tendenzen erkennbar waren.

In Folge wurde eine Validierung über CFU-Assays durchgeführt, die aufgrund der Methode nicht nur 16 h, sondern auch 40 h nach Infektion mit *L. pneumophila* angefertigt wurden. Während nach 16 h Infektion Wortmannin, Amitriptylin und Forskolin die Replikation der Legionellen erkennbar senkten, war dies nach 40 h auch für Fluoxetin, 25-HC und H-89 der Fall. Auch W-7 zeigte eine Tendenz die Replikation zu senken. Zusammengenommen mit reduziertem Zelltod in den LDH Messungen zeigte sich eine positive Validierung der Ergebnisse mittels CFU-Assays. Dabei waren Ergebnisse allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt aussagekräftig genug um signifikante Unterschiede zur Kontrolle festzumachen. Die nicht mehr erkennbare Reduktion der Replikation von 16 h zu 40 h für Forskolin könnte teilweise durch eine gesenkte Aufnahme der Bakterien zurückzuführen sein, die nach 1,5 h Infektion sichtbar wurde. In diesem Fall hätte Forskolin im Vergleich zu den anderen signifikant gemessenen Substanzen eher keine Auswirkung auf die Replikation der Legionellen. Eventuell wären solche Aussagen auch über die im Screen verwendete Methode machbar gewesen, solange verhindert werden kann, dass es bei der Färbung der Proben zu einer Ablösung gestresster Makrophagen kommt.

Amitriptylin wurde ursprünglich als Positivkontrolle aufgrund von bestehenden Forschungsergebnissen ausgewählt und Fluoxetin als ein alternativer Wiederaufnahme Inhibitor des Serotonin Transporters SERT in den Screen aufgenommen. Eine Inhibition von SERT führte bei anderen Bakterien wie *E. coli* und *Citrobacter rodentium* zu einer Reduktion in der Anzahl an Pathogenen (Kumar, Russell et al. 2020). Es zeigte sich, dass die beobachtete Reduktion der Infektionsrate und die Ausprägung der Infektion bei Legionellen mutmaßlich nicht abhängig vom Serotonin 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor ist, da Inhibitoren dieses Rezeptors keine wahrnehmbaren Auswirkungen zeigten. Vielmehr scheint die Aktivität von Amitriptylin und Fluoxetin als FIASMA Einflüsse auf die Legionelleninfektion zu haben, da mit Benzotropin und Perhexilin zwei weitere FIASMA, unabhängig von Serotonin, die Infektion beeinflussen. Dieses Enzym zeigt schon bei der Infektion durch andere intrazelluläre Bakterien eine Relevanz für deren Pathogenität (Cockburn, Green et al. 2019).

Durch Untersuchungen der ASMase Aktivität der Makrophagen wurde gefolgert, dass *L. pneumophila* diese, vermutlich über Effektorproteine, beeinflusst. *L. pneumophila* besitzt mit *legS1* ein Gen, das eine der sauren Sphingomyelinase ähnliche Phosphodiesterase (Gomez-Valero, Rusniok et al. 2014) codiert. Mit *lpp2641* existiert noch ein weiteres Gen, welches einen Effektor codiert und ebenfalls eine strukturelle Ähnlichkeit besitzt (Rolando, Escoll et al. 2016). Es wurde gezeigt, dass mit Legionellen infizierte Makrophagen geringere Mengen von

Sphingolipiden aufweisen und dass *L. pneumophila* aktiv eine Sphingosin-1-phosphat Lyase sekretiert, um einen Anstieg von Sphingosin zu vermeiden. Nach 6 h Infektion weisen Makrophagen zudem eine reduzierte Menge an Sphingomyelin und dessen Abbauprodukten auf, was aber nicht auf die durch Legionellen sekretierte Lyase zurückzuführen ist (Rolando, Escoll et al. 2016). Auch andere Bakterien nutzen modifizierte Sphingolipid Produktionen aus, um sich einen Vorteil zur Etablierung zu schaffen. So nutzen *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, und *N. gonorrhoeae* erhöhte Sphingolipidmengen um eine Aufnahme in die Zellen zu fördern (Simonis und Schubert-Unkmeir 2018). *L. pneumophila* senkt die Produktion hingegen um einer Degradation durch Autophagozytose zu entgehen (Young, Kester et al. 2013).

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Verhalten von Legionellen und Makrophagen: während einer Infektion von Makrophagen durch *L. pneumophila* senken sowohl Makrophagen, aber besonders die Legionellen die Aktivität der sauren Sphingomyelinase unabhängig von der bakteriellen Sphingosin-1-phosphat Lyase. Diese Lyase ist für eine Reduktion des Sphingolipidlevels verantwortlich und führt zu einer Inhibition von Autophagozytose durch die Wirtszelle. Die hier benutzten FIASMA Amitriptylin, Fluoxetin, Benzotropin und Perhexilin senken ebenfalls die Aktivität der sauren Sphingomyelinase. Obwohl dies das Legionellenwachstum scheinbar unterstützen müsste, ist die Replikation der Bakterien nach 16 h und 40 h Infektion gehemmt. Da Legionellen mit *legS1* und teilweise *lpp2641* eigene Gensequenzen besitzen, die der sauren Sphingomyelinase ähnliche Proteine codieren und diese aktiv sekretieren, wird davon ausgegangen, dass die Aktivität der sauren Sphingomyelinase entweder feinjustiert oder zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteigert werden soll. Eventuell wird durch dieses Zusammenspiel an Regulationen das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Autophagozytose angepasst (Young, Kester et al. 2013), welches durch die Zugabe von FIASMA beeinträchtigt wird und letztlich den optimierten Lebenszyklus von *L. pneumophila* inhibiert.

#### 4.4 Ausblick

Obwohl die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Messung des Effektes von miRNAs und bioreaktiven Substanzen auf die Infektion durch Legionellen, aufgrund von Randeffekten, nicht den erwünschten Erfolg zeigte, stellen die darin verwendeten Einzelschritte nutzbare Elemente dar. So sind die Protokolle der Automatisierungsplattform für vergleichbare Experimente anpassbar, wobei darauf geachtet werden muss bei gleichbleibendem Plattenformat Randeffekte über eine ausreichende Zahl von verteilten technischen Replikaten auszugleichen und Proben mit im besten Fall höherer Effektstärke zu verwenden. Die speziell für diese Arbeit

angefertigte Software zur Auswertung der Mikroskopiedaten ist für vergleichbare Anwendungen, in denen Makrophagen mit intrazellulären Bakterien infiziert werden sollen, anwendbar.

Aufgrund der komplexen Morphologie der Makrophagen und der damit verbundenen Herausforderung Mikroskopie-Ergebnisse geeignet auswerten zu können, stellt sie eine darauf angepasste Basis zur Untersuchung dieser Zellen dar. Der veröffentlichte Datensatz bietet die Möglichkeit auch andere neuronale Netze an Makrophagen anzupassen.

Nach Analyse der drei miRNAs-101, 106a und 107 ergaben sich nicht spezifische Proteine als direkte Verursacher der gesteigerten Legionellenreplikation. Vielmehr wurden die genannten Signalwege und Proteinklassen als potentiell verantwortlich für die Regulation dieser Infektion befunden und bieten in Folge die Möglichkeit zur weiteren Analyse. Unter der Annahme, dass die Negativkontrolle der miRNAs keine größeren Auswirkungen auf die Proteinkonzentrationen hat, ergibt sich mit diesen Proben zudem die Möglichkeit, durch die Infektion verursachte Variationen auf Proteinebene zu untersuchen.

Durch den Substanz Screen zeigten sich größere Differenzen zu einer Publikation mit vergleichbarem Vorgehen (Czyż, Potluri et al. 2014). Es wurden neben den Positivkontrollen Wortmannin und Amitriptylin auch 25-HC, H-89, Fluoxetin, Forskolin und W-7 als Inhibitoren mit Einfluss auf die Legionelleninfektion identifiziert, wobei der Großteil der molekularen Aufklärung noch aussteht. Sicher scheint die Relevanz der sauren Sphingomyelinase, deren Dysregulation zur Senkung der Infektion führt. Zukünftige Experimente müssen die Frage klären inwieweit die bakterielle Sphingomyelinase codiert durch legS1 den Stoffwechsel der Wirtszelle beeinflusst und ob sich diese Regulation womöglich zu bestimmten Phasen des Legionellen-Lebenszyklus verändert.

## Literaturverzeichnis

- Abdel-Nour, M., C. Duncan, D. E. Low und C. Guyard (2013). "**Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila.**" *Int J Mol Sci* 14(11): 21660-21675.
- Abshire, C. F., A. M. Dragoi, C. R. Roy und S. S. Ivanov (2016). "**MTOR-Driven Metabolic Reprogramming Regulates Legionella pneumophila Intracellular Niche Homeostasis.**" *PLoS Pathog* 12(12): e1006088.
- Ambros, V. (2001). "**microRNAs: tiny regulators with great potential.**" *Cell* 107(7): 823-826.
- Anderson, K. V., G. Jürgens und C. Nüsslein-Volhard (1985). "**Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product.**" *Cell* 42(3): 779-789.
- Arango Duque, G. und A. Descoteaux (2014). "**Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases.**" *Front Immunol* 5: 491.
- Archer, K. A., L. Alexopoulou, R. A. Flavell und C. R. Roy (2009). "**Multiple MyD88-dependent responses contribute to pulmonary clearance of Legionella pneumophila.**" *Cell Microbiol* 11(1): 21-36.
- Atri, C., F. Z. Guerfali und D. Laouini (2018). "**Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases.**" *Int J Mol Sci* 19(6).
- Auwerx, J. H., S. Deeb, J. D. Brunzell, R. Peng und A. Chait (1988). "**Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines.**" *Biochemistry* 27(8): 2651-2655.
- Baek, D., J. Villén, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi und D. P. Bartel (2008). "**The impact of microRNAs on protein output.**" *Nature* 455(7209): 64-71.
- Banga, S., P. Gao, X. Shen, V. Fiscus, W. X. Zong, L. Chen und Z. Q. Luo (2007). "**Legionella pneumophila inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12): 5121-5126.
- Bartfeld, S., C. Engels, B. Bauer, P. Aurass, A. Flieger, H. Brüggemann und T. F. Meyer (2009). "**Temporal resolution of two-tracked NF-kappaB activation by Legionella pneumophila.**" *Cell Microbiol* 11(11): 1638-1651.
- Bartram, J. (2007). "**Legionella and the prevention of legionellosis.**" Geneva, World Health Organization.
- Berends, E. T., A. Kuipers, M. M. Ravesloot, R. T. Urbanus und S. H. Rooijackers (2014). "**Bacteria under stress by complement and coagulation.**" *FEMS Microbiol Rev* 38(6): 1146-1171.

- Berger, K. H. und R. R. Isberg (1993). "**Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in Legionella pneumophila.**" Mol Microbiol 7(1): 7-19.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond und G. J. Hannon (2001). "**Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.**" Nature 409(6818): 363-366.
- Best, A. und Y. Abu Kwaik (2019). "**Nutrition and Bipartite Metabolism of Intracellular Pathogens.**" Trends Microbiol 27(6): 550-561.
- Bhaskaran, M. und M. Mohan (2014). "**MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease.**" Vet Pathol 51(4): 759-774.
- Blankenburg, S., C. Hentschker, A. Nagel, P. Hildebrandt, S. Michalik, D. Dittmar, K. Surmann und U. Völker (2019). "**Improving Proteome Coverage for Small Sample Amounts: An Advanced Method for Proteomics Approaches with Low Bacterial Cell Numbers.**" Proteomics 19(23): e1900192.
- Bodhun, B. und U. Buchholz (2020). "**Entwicklung der Fallzahlen von Legionärskrankheit vor dem Hintergrund der COVID-19-Pandemie.**" Epid Bull 2020; 44:3-9.
- Cannarile, M. A., M. Weisser, W. Jacob, A. M. Jegg, C. H. Ries und D. Rüttinger (2017). "**Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy.**" J Immunother Cancer 5(1): 53.
- Carpenter, S. L. und P. Mathew (2008). "**Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance.**" Haemophilia 14(6): 1250-1254.
- Caruso, R., N. Warner, N. Inohara und G. Núñez (2014). "**NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease.**" Immunity 41(6): 898-908.
- Casson, C. N., J. L. Doerner, A. M. Copenhaver, J. Ramirez, A. M. Holmgren, M. A. Boyer, I. J. Siddarthan, S. H. Rouhanifard, A. Raj und S. Shin (2017). "**Neutrophils and Ly6Chi monocytes collaborate in generating an optimal cytokine response that protects against pulmonary Legionella pneumophila infection.**" PLoS Pathog 13(4): e1006309.
- Chaplin, D. D. (2010). "**Overview of the immune response.**" J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S3-23.
- Charpentier, X., J. E. Gabay, M. Reyes, J. W. Zhu, A. Weiss und H. A. Shuman (2009). "**Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by Legionella pneumophila.**" PLoS Pathog 5(7): e1000501.
- Chen, M. B., L. Yang, P. H. Lu, X. L. Fu, Y. Zhang, Y. Q. Zhu und Y. Tian (2015). "**MicroRNA-101 down-regulates sphingosine kinase 1 in colorectal cancer cells.**" Biochem Biophys Res Commun 463(4): 954-960.



- Chiaraviglio, L., Y. S. Kang und J. E. Kirby (2016). "**High Throughput, Real-time, Dual-readout Testing of Intracellular Antimicrobial Activity and Eukaryotic Cell Cytotoxicity.**" *J Vis Exp*(117).
- Chiaraviglio, L. und J. E. Kirby (2015). "**High-Throughput Intracellular Antimicrobial Susceptibility Testing of Legionella pneumophila.**" *Antimicrob Agents Chemother* 59(12): 7517-7529.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). "**Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.**" *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- Cockburn, C. L., R. S. Green, S. R. Damle, R. K. Martin, N. N. Ghahrai, P. M. Colonne, M. S. Fullerton, D. H. Conrad, C. E. Chalfant, D. E. Voth, E. A. Rucks, S. D. Gilk und J. A. Carlyon (2019). "**Functional inhibition of acid sphingomyelinase disrupts infection by intracellular bacterial pathogens.**" *Life Sci Alliance* 2(2).
- Czyż, D. M., L. P. Potluri, N. Jain-Gupta, S. P. Riley, J. J. Martinez, T. L. Steck, S. Crosson, H. A. Shuman und J. E. Gabay (2014). "**Host-directed antimicrobial drugs with broad-spectrum efficacy against intracellular bacterial pathogens.**" *mBio* 5(4): e01534-01514.
- Deguine, J. und G. M. Barton (2014). "**MyD88: a central player in innate immune signaling.**" *F1000Prime Rep* 6: 97.
- Depicker, A. und M. V. Montagu (1997). "**Post-transcriptional gene silencing in plants.**" *Curr Opin Cell Biol* 9(3): 373-382.
- Derré, I. und R. R. Isberg (2004). "**Legionella pneumophila replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system.**" *Infect Immun* 72(5): 3048-3053.
- Ebert, M. S. und P. A. Sharp (2012). "**Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes.**" *Cell* 149(3): 515-524.
- ECDC (2020). "**Legionnaires' disease: Annual epidemiological report for 2018.**" E. C. f. D. P. a. Control. Stockholm: ECDC.
- Egawa, K., T. W. Klein, Y. Yamamoto, C. A. Newton und H. Friedman (1992). "**Cyclic AMP inhibition of lipopolysaccharide-induced restriction of Legionella pneumophila growth in macrophage cultures.**" *Infect Immun* 60(5): 1936-1940.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber und T. Tuschl (2001). "**Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.**" *Nature* 411(6836): 494-498.
- Ensminger, A. W. und R. R. Isberg (2010). "**E3 ubiquitin ligase activity and targeting of BAT3 by multiple Legionella pneumophila translocated substrates.**" *Infect Immun* 78(9): 3905-3919.

- Eto, Y., T. Tsuji, M. Takezawa, S. Takano, Y. Yokogawa und H. Shibai (1987). "**Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1.**" *Biochem Biophys Res Commun* 142(3): 1095-1103.
- Fields, B. S. (1996). "**The molecular ecology of legionellae.**" *Trends Microbiol* 4(7): 286-290.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). "**Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.**" *Nature* 391(6669): 806-811.
- Flajnik, M. F. und M. Kasahara (2010). "**Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures.**" *Nat Rev Genet* 11(1): 47-59.
- Fonseca, M. V. und M. S. Swanson (2014). "**Nutrient salvaging and metabolism by the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*.**" *Front Cell Infect Microbiol* 4: 12.
- Friedman, A. D. (2007). "**Transcriptional control of granulocyte and monocyte development.**" *Oncogene* 26(47): 6816-6828.
- García-Fulgueiras, A., C. Navarro, D. Fenoll, J. García, P. González-Diego, T. Jiménez-Buñuales, M. Rodríguez, R. Lopez, F. Pacheco, J. Ruiz, M. Segovia, B. Balandrón und C. Pelaz (2003). "**Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain.**" *Emerg Infect Dis* 9(8): 915-921.
- Ghafouri-Fard, S., A. Abak, F. Tondro Anamag, H. Shoorei, J. Majidpoor und M. Taheri (2021). "**The emerging role of non-coding RNAs in the regulation of PI3K/AKT pathway in the carcinogenesis process.**" *Biomed Pharmacother* 137: 111279.
- Ginhoux, F., M. Guillemins und S. H. Naik (2016). "**Editorial: Dendritic Cell and Macrophage Nomenclature and Classification.**" *Front Immunol* 7: 168.
- Girard, R., T. Pedron, S. Uematsu, V. Balloy, M. Chignard, S. Akira und R. Chaby (2003). "**Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2.**" *J Cell Sci* 116(Pt 2): 293-302.
- Glick, T. H., M. B. Gregg, B. Berman, G. Mallison, W. W. Rhodes und I. Kassinoff (1978). "**Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects.**" *Am J Epidemiol* 107(2): 149-160.
- Gomez-Valero, L., C. Rusniok, D. Carson, S. Mondino, A. E. Pérez-Cobas, M. Rolando, S. Pasricha, S. Reuter, J. Demirtas, J. Crumbach, S. Descorps-Declere, E. L. Hartland, S. Jarraud, G. Dougan, G. N. Schroeder, G. Frankel und C. Buchrieser (2019). "**More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(6): 2265-2273.

- Gomez-Valero, L., C. Rusniok, M. Rolando, M. Neou, D. Dervins-Ravault, J. Demirtas, Z. Rouy, R. J. Moore, H. Chen, N. K. Petty, S. Jarraud, J. Etienne, M. Steinert, K. Heuner, S. Gribaldo, C. Médigue, G. Glöckner, E. L. Hartland und C. Buchrieser (2014). "**Comparative analyses of Legionella species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease.**" Genome Biol 15(11): 505.
- Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand und S. Yona (2014). "**Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny.**" Nat Rev Immunol 14(8): 571-578.
- Hakuno, F. und S. I. Takahashi (2018). "**IGF1 receptor signaling pathways.**" J Mol Endocrinol 61(1): T69-T86.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach und G. J. Hannon (2000). "**An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.**" Nature 404(6775): 293-296.
- Hanna, N., S. Kicka, G. Chiriano, C. Harrison, H. O. Sakouhi, V. Trofimov, A. Kranjc, J. Nitschke, M. Pagni, P. Cosson, H. Hilbi, L. Scapozza und T. Soldati (2020). "**Identification of Anti - Mycobacterium and Anti- Legionella Compounds With Potential Distinctive Structural Scaffolds From an HD-PBL Using Phenotypic Screens in Amoebae Host Models.**" Front Microbiol 11: 266.
- Harrison, C. F., G. Chiriano, I. Finsel, C. Manske, C. Hoffmann, B. Steiner, A. Kranjc, O. Patthey-Vuadens, S. Kicka, V. Trofimov, H. Ouertatani-Sakouhi, T. Soldati, L. Scapozza und H. Hilbi (2015). "**Amoebae-Based Screening Reveals a Novel Family of Compounds Restricting Intracellular Legionella pneumophila.**" ACS Infect Dis 1(7): 327-338.
- Hartmann, G. (2017). "**Nucleic Acid Immunity.**" Adv Immunol 133: 121-169.
- Hattermann, K., S. Picard, M. Borgeat, P. Leclerc, M. Pouliot und P. Borgeat (2007). "**The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis.**" FASEB J 21(7): 1575-1585.
- Heng, B. H., K. T. Goh, D. L. Ng und A. E. Ling (1997). "**Surveillance of legionellosis and Legionella bacteria in the built environment in Singapore.**" Ann Acad Med Singap 26(5): 557-565.
- Herkt, C. E., B. E. Caffrey, K. Surmann, S. Blankenburg, M. Gesell Salazar, A. L. Jung, S. M. Herbel, K. Hoffmann, L. N. Schulte, W. Chen, A. Sittka-Stark, U. Völker, M. Vingron, A. Marsico, W. Bertrams und B. Schmeck (2020). "**A MicroRNA Network Controls Legionella pneumophila Replication in Human Macrophages via LGALS8 and MX1.**" mBio 11(2).
- Heyam, A., D. Lagos und M. Plevin (2015). "**Dissecting the roles of TRBP and PACT in double-stranded RNA recognition and processing of noncoding RNAs.**" Wiley Interdiscip Rev RNA 6(3): 271-289.

- Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzózka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres und G. Hartmann (2006). "**5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.**" *Science* 314(5801): 994-997.
- Horwitz, M. A. (1983). "**The Legionnaires' disease bacterium Legionella pneumophila inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes.**" *J Exp Med* 158(6): 2108-2126.
- Horwitz, M. A. und F. R. Maxfield (1984). "**Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes.**" *J Cell Biol* 99(6): 1936-1943.
- Hou, Y., L. Li, Y. Ju, Y. Lu, L. Chang und X. Xiang (2017). "**MiR-101-3p Regulates the Viability of Lung Squamous Carcinoma Cells via Targeting EZH2.**" *J Cell Biochem* 118(10): 3142-3149.
- Hoving, J. C., G. J. Wilson und G. D. Brown (2014). "**Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity.**" *Cell Microbiol* 16(2): 185-194.
- Isberg, R. R., T. J. O'Connor und M. Heidtman (2009). "**The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells.**" *Nat Rev Microbiol* 7(1): 13-24.
- Ivanov, S. S. (2017). "**The tug-of-war over MTOR in Legionella infections.**" *Microb Cell* 4(2): 67-68.
- Izant, J. G. und H. Weintraub (1984). "**Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis.**" *Cell* 36(4): 1007-1015.
- Jeng, E. E., V. Bhadkamkar, N. U. Ibe, H. Gause, L. Jiang, J. Chan, R. Jian, D. Jimenez-Morales, E. Stevenson, N. J. Krogan, D. L. Swaney, M. P. Snyder, S. Mukherjee und M. C. Bassik (2019). "**Systematic Identification of Host Cell Regulators of Legionella pneumophila Pathogenesis Using a Genome-wide CRISPR Screen.**" *Cell Host Microbe* 26(4): 551-563.e556.
- Jhanwar-Uniyal, M., J. V. Wainwright, A. L. Mohan, M. E. Tobias, R. Murali, C. D. Gandhi und M. H. Schmidt (2019). "**Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship.**" *Adv Biol Regul* 72: 51-62.
- Jung, A. L., C. Stoiber, C. E. Herkt, C. Schulz, W. Bertrams und B. Schmeck (2016). "**Legionella pneumophila-Derived Outer Membrane Vesicles Promote Bacterial Replication in Macrophages.**" *PLoS Pathog* 12(4): e1005592.
- Kagan, J. C. und C. R. Roy (2002). "**Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites.**" *Nat Cell Biol* 4(12): 945-954.
- Kagan, J. C., M. P. Stein, M. Pypaert und C. R. Roy (2004). "**Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle.**" *J Exp Med* 199(9): 1201-1211.
- Kaneko, T., P. J. Stogios, X. Ruan, C. Voss, E. Evdokimova, T. Skarina, A. Chung, X. Liu, L. Li, A. Savchenko, A. W. Ensminger und S. S. Li (2018). "**Identification and characterization of a large family of superbinding bacterial SH2 domains.**" *Nat Commun* 9(1): 4549.

- Kawai, T. und S. Akira (2009). "**The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.**" *Int Immunol* 21(4): 317-337.
- Korfhage, N., M. Mühlhling, S. Ringshandl, A. Becker, B. Schmeck und B. Freisleben (2020). "**Detection and segmentation of morphologically complex eukaryotic cells in fluorescence microscopy images via feature pyramid fusion.**" *PLoS Comput Biol* 16(9): e1008179.
- Kornhuber, J., M. Muehlbacher, S. Trapp, S. Pechmann, A. Friedl, M. Reichel, C. Mühle, L. Terfloth, T. W. Groemer, G. M. Spitzer, K. R. Liedl, E. Gulbins und P. Tripal (2011). "**Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase.**" *PLoS One* 6(8): e23852.
- Kornhuber, J., P. Tripal, M. Reichel, L. Terfloth, S. Bleich, J. Wiltfang und E. Gulbins (2008). "**Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model.**" *J Med Chem* 51(2): 219-237.
- Kowalczyk, B., E. Chmiel und M. Palusinska-Szys (2021). "**The Role of Lipids in Legionella-Host Interaction.**" *Int J Mol Sci* 22(3).
- Kozak, N. A., C. E. Lucas, J. M. Winchell und C. Buchrieser (2013). "**Legionella: Methods and Protocols.**" *Methods in Molecular Biology* 954, Humana Press.
- Kubori, T., A. Hyakutake und H. Nagai (2008). "**Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions.**" *Mol Microbiol* 67(6): 1307-1319.
- Kumagai, M. H., J. Donson, G. della-Cioppa, D. Harvey, K. Hanley und L. K. Grill (1995). "**Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1679-1683.
- Kumar, A., R. M. Russell, R. Pifer, Z. Menezes-Garcia, S. Cuesta, S. Narayanan, J. B. MacMillan und V. Sperandio (2020). "**The Serotonin Neurotransmitter Modulates Virulence of Enteric Pathogens.**" *Cell Host Microbe* 28(1): 41-53.e48.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel und T. Tuschl (2001). "**Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.**" *Science* 294(5543): 853-858.
- Laguna, R. K., E. A. Creasey, Z. Li, N. Valtz und R. R. Isberg (2006). "**A Legionella pneumophila-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49): 18745-18750.
- Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein und D. P. Bartel (2001). "**An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans.**" *Science* 294(5543): 858-862.
- Lee, P. C. und M. P. Machner (2018). "**The Legionella Effector Kinase LegK7 Hijacks the Host Hippo Pathway to Promote Infection.**" *Cell Host Microbe* 24(3): 429-438.e426.
- Lee, R. C. und V. Ambros (2001). "**An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans.**" *Science* 294(5543): 862-864.

- Lee, R. C., R. L. Feinbaum und V. Ambros (1993). "**The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.**" *Cell* 75(5): 843-854.
- Li, C., A. Wang, Y. Wu, E. Gulbins, H. Grassmé und Z. Zhao (2019). "**Acid Sphingomyelinase-Ceramide System in Bacterial Infections.**" *Cell Physiol Biochem* 52(2): 280-301.
- Li, X. Y., Q. F. Luo, C. K. Wei, D. F. Li, J. Li und L. Fang (2014). "**MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer.**" *Int J Clin Exp Med* 7(1): 32-40.
- Lin, Y. H., A. G. Doms, E. Cheng, B. Kim, T. R. Evans und M. P. Machner (2015). "**Host Cell-catalyzed S-Palmitoylation Mediates Golgi Targeting of the Legionella Ubiquitin Ligase GobX.**" *J Biol Chem* 290(42): 25766-25781.
- Lin, Y. H., M. Lucas, T. R. Evans, G. Abascal-Palacios, A. G. Doms, N. A. Beauchene, A. L. Rojas, A. Hierro und M. P. Machner (2018). "**RavN is a member of a previously unrecognized group of Legionella pneumophila E3 ubiquitin ligases.**" *PLoS Pathog* 14(2): e1006897.
- Ling, H., M. Fabbri und G. A. Calin (2013). "**MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development.**" *Nat Rev Drug Discov* 12(11): 847-865.
- Liu, M., F. Bi, X. Zhou und Y. Zheng (2012). "**Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications.**" *Trends Cell Biol* 22(7): 365-373.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). "**Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.**" *Methods* 25(4): 402-408.
- Luo, Z. Q. (2011). "**Striking a balance: modulation of host cell death pathways by legionella pneumophila.**" *Front Microbiol* 2: 36.
- Maida, Y. und K. Masutomi (2011). "**RNA-dependent RNA polymerases in RNA silencing.**" *Biol Chem* 392(4): 299-304.
- Marra, A., S. J. Blander, M. A. Horwitz und H. A. Shuman (1992). "**Identification of a Legionella pneumophila locus required for intracellular multiplication in human macrophages.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9607-9611.
- Mathieson, T., H. Franken, J. Kosinski, N. Kurzawa, N. Zinn, G. Sweetman, D. Poeckel, V. S. Ratnu, M. Schramm, I. Becher, M. Steidel, K. M. Noh, G. Bergamini, M. Beck, M. Bantscheff und M. M. Savitski (2018). "**Systematic analysis of protein turnover in primary cells.**" *Nat Commun* 9(1): 689.
- Medzhitov, R. (2007). "**Recognition of microorganisms and activation of the immune response.**" *Nature* 449(7164): 819-826.
- Mills, C. D. (2012). "**M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease.**" *Crit Rev Immunol* 32(6): 463-488.

- Miragliotta, G., N. Semeraro, L. Marcuccio und D. Fumarola (1982). "**Legionella pneumophila and related organisms induce the generation of procoagulant activity by peripheral mononuclear cells in vitro.**" *Infection* 10(4): 215-218.
- Mondino, S., S. Schmidt, M. Rolando, P. Escoll, L. Gomez-Valero und C. Buchrieser (2020). "**Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of Legionella.**" *Annu Rev Pathol* 15: 439-466.
- Morrison, S. J. und J. Kimble (2006). "**Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer.**" *Nature* 441(7097): 1068-1074.
- Mosmann, T. (1983). "**Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.**" *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Mourelatos, Z., J. Dostie, S. Paushkin, A. Sharma, B. Charroux, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann und G. Dreyfuss (2002). "**miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs.**" *Genes Dev* 16(6): 720-728.
- Mukherjee, T., E. S. Hovingh, E. G. Foerster, M. Abdel-Nour, D. J. Philpott und S. E. Girardin (2019). "**NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease.**" *Arch Biochem Biophys* 670: 69-81.
- Murray, P. J., J. E. Allen, S. K. Biswas, E. A. Fisher, D. W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J. A. Hamilton, L. B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F. O. Martinez, J. L. Mege, D. M. Mosser, G. Natoli, J. P. Saeij, J. L. Schultze, K. A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J. A. van Ginderachter, S. N. Vogel und T. A. Wynn (2014). "**Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines.**" *Immunity* 41(1): 14-20.
- Nagai, H., J. C. Kagan, X. Zhu, R. A. Kahn und C. R. Roy (2002). "**A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes.**" *Science* 295(5555): 679-682.
- Napoli, C., C. Lemieux und R. Jorgensen (1990). "**Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.**" *Plant Cell* 2(4): 279-289.
- Natås, O. B., A. L. Brekken, E. Bernhoff, M. A. K. Hetland, I. H. Löhr und P. C. Lindemann (2019). "**Susceptibility of Legionella pneumophila to antimicrobial agents and the presence of the efflux pump LpeAB.**" *J Antimicrob Chemother* 74(6): 1545-1550.
- Naujoks, J., J. Lippmann, N. Suttorp und B. Opitz (2018). "**Innate sensing and cell-autonomous resistance pathways in Legionella pneumophila infection.**" *Int J Med Microbiol* 308(1): 161-167.
- Nordahl, E. A., V. Rydengård, P. Nyberg, D. P. Nitsche, M. Mörgelin, M. Malmsten, L. Björck und A. Schmidtchen (2004). "**Activation of the complement system generates antibacterial peptides.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(48): 16879-16884.

- Pan, Y. J., Y. Zhuang, J. N. Zheng und D. S. Pei (2016). "**MiR-106a: Promising biomarker for cancer.**" *Bioorg Med Chem Lett* 26(22): 5373-5377.
- Pappa, O., D. Chochlakis, V. Sandalakis, C. Dioli, A. Psaroulaki und A. Mavridou (2020). "**Antibiotic Resistance of Legionella pneumophila in Clinical and Water Isolates—A Systematic Review.**" *Int J Environ Res Public Health* 17(16).
- Parte, A. C., J. Sardà Carbasse, J. P. Meier-Kolthoff, L. C. Reimer und M. Göker (2020). "**List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ.**" *Int J Syst Evol Microbiol* 70(11): 5607-5612.
- Petrosyan, A. (2019). "**Unlocking Golgi: Why Does Morphology Matter?**" *Biochemistry (Mosc)* 84(12): 1490-1501.
- Pullen, N. und G. Thomas (1997). "**The modular phosphorylation and activation of p70s6k.**" *FEBS Lett* 410(1): 78-82.
- Qian, L., W. Zhang, B. Lei, A. He, L. Ye, X. Li und X. Dong (2016). "**MicroRNA-101 regulates T-cell acute lymphoblastic leukemia progression and chemotherapeutic sensitivity by targeting Notch1.**" *Oncol Rep* 36(5): 2511-2516.
- Qin, T., H. Zhou, H. Ren und W. Liu (2017). "**Distribution of Secretion Systems in the Genus.**" *Front Microbiol* 8: 388.
- Rahimi, J. und A. Woehrer (2017). "**Overview of cerebrospinal fluid cytology.**" *Handb Clin Neurol* 145: 563-571.
- Raudvere, U., L. Kolberg, I. Kuzmin, T. Arak, P. Adler, H. Peterson und J. Vilo (2019). "**g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update).**" *Nucleic Acids Res* 47(W1): W191-W198.
- Ray, A., M. Cot, G. Puzo, M. Gilleron und J. Nigou (2013). "**Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system.**" *Biochimie* 95(1): 33-42.
- Richards, A. M., J. E. Von Dwingelo, C. T. Price und Y. Abu Kwaik (2013). "**Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction.**" *Virulence* 4(4): 307-314.
- RKI. (2019). "**Ratgeber Legionellose.**"
- Robinson, C. G. und C. R. Roy (2006). "**Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing Legionella pneumophila.**" *Cell Microbiol* 8(5): 793-805.
- Roche, P. A. und K. Furuta (2015). "**The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation.**" *Nat Rev Immunol* 15(4): 203-216.



- Rolando, M., P. Escoll, T. Nora, J. Botti, V. Boitez, C. Bedia, C. Daniels, G. Abraham, P. J. Stogios, T. Skarina, C. Christophe, D. Dervins-Ravault, C. Cazalet, H. Hilbi, T. W. Rupasinghe, D. Tull, M. J. McConville, S. Y. Ong, E. L. Hartland, P. Codogno, T. Levade, T. Naderer, A. Savchenko und C. Buchrieser (2016). "**Legionella pneumophila S1P-lyase targets host sphingolipid metabolism and restrains autophagy.**" Proc Natl Acad Sci U S A 113(7): 1901-1906.
- Roth, B., W. Kroeze, S. Patel und E. Lopez (2000). "**The Multiplicity of Serotonin Receptors: Uselessly diverse molecules or an embarrassment of riches?.**" The Neuroscientist. 6:252-262.
- Rottiers, V. und A. M. Näär (2012). "**MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders.**" Nat Rev Mol Cell Biol 13(4): 239-250.
- Rowbotham, T. J. (1980). "**Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae.**" J Clin Pathol 33(12): 1179-1183.
- Röszer, T. (2015). "**Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms.**" Mediators Inflamm 2015: 816460.
- Saxton, R. A. und D. M. Sabatini (2017). "**mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.**" Cell 168(6): 960-976.
- Scheller, N., S. Herold, R. Kellner, W. Bertrams, A. L. Jung, H. Janga, T. Greulich, L. N. Schulte, C. F. Vogelmeier, J. Lohmeyer und B. Schmeck (2019). "**Proviral MicroRNAs Detected in Extracellular Vesicles From Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients With Influenza Virus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome.**" J Infect Dis 219(4): 540-543.
- Selbach, M., B. Schwanhäusser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin und N. Rajewsky (2008). "**Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs.**" Nature 455(7209): 58-63.
- Shames, S. R., L. Liu, J. C. Havey, W. B. Schofield, A. L. Goodman und C. R. Roy (2017). "**Multiple Legionella pneumophila effector virulence phenotypes revealed through high-throughput analysis of targeted mutant libraries.**" Proc Natl Acad Sci U S A 114(48): E10446-E10454.
- Shim, H. K., J. Y. Kim, M. J. Kim, H. S. Sim, D. W. Park und J. W. Sohn (2009). "**Legionella lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages.**" Exp Mol Med 41(10): 687-694.
- Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. Plasterk und A. Fire (2001). "**On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing.**" Cell 107(4): 465-476.
- Simonis, A. und A. Schubert-Unkmeir (2018). "**The role of acid sphingomyelinase and modulation of sphingolipid metabolism in bacterial infection.**" Biol Chem 399(10): 1135-1146.

- Song, N., X. Ma, H. Li, Y. Zhang, X. Wang, P. Zhou und X. Zhang (2015). "**microRNA-107 functions as a candidate tumor suppressor gene in renal clear cell carcinoma involving multiple genes.**" *Urol Oncol* 33(5): 205.e201-211.
- Spiller, M. P., K. L. Boon, M. A. Reijns und J. D. Beggs (2007). "**The Lsm2-8 complex determines nuclear localization of the spliceosomal U6 snRNA.**" *Nucleic Acids Res* 35(3): 923-929.
- Steele, T. W., C. V. Moore und N. Sangster (1990). "**Distribution of Legionella longbeachae serogroup 1 and other legionellae in potting soils in Australia.**" *Appl Environ Microbiol* 56(10): 2984-2988.
- Stein, M., S. Keshav, N. Harris und S. Gordon (1992). "**Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.**" *J Exp Med* 176(1): 287-292.
- Sugimoto, M. A., A. L. C. Ribeiro, B. R. C. Costa, J. P. Vago, K. M. Lima, F. S. Carneiro, M. M. O. Ortiz, G. L. N. Lima, A. A. F. Carmo, R. M. Rocha, D. A. Perez, A. C. Reis, V. Pinho, L. A. Miles, C. C. Garcia, M. M. Teixeira und L. P. Sousa (2017). "**Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1.**" *Blood* 129(21): 2896-2907.
- Swanson, M. S. und R. R. Isberg (1995). "**Association of Legionella pneumophila with the macrophage endoplasmic reticulum.**" *Infect Immun* 63(9): 3609-3620.
- Swirski, F. K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder und M. J. Pittet (2009). "**Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites.**" *Science* 325(5940): 612-616.
- Szklarczyk, D., A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N. T. Doncheva, J. H. Morris, P. Bork, L. J. Jensen und C. V. Mering (2019). "**STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets.**" *Nucleic Acids Res* 47(D1): D607-D613.
- Takeuchi, O. und S. Akira (2010). "**Pattern recognition receptors and inflammation.**" *Cell* 140(6): 805-820.
- Tatsumi, M., K. Groshan, R. D. Blakely und E. Richelson (1997). "**Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters.**" *Eur J Pharmacol* 340(2-3): 249-258.
- Tilney, L. G., O. S. Harb, P. S. Connelly, C. G. Robinson und C. R. Roy (2001). "**How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane.**" *J Cell Sci* 114(Pt 24): 4637-4650.

- Tomaselli, S., B. Bonamassa, A. Alisi, V. Nobili, F. Locatelli und A. Gallo (2013). "**ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference.**" *Int J Mol Sci* 14(11): 22796-22816.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno und K. Tada (1980). "**Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).**" *Int J Cancer* 26(2): 171-176.
- Ullah, M. O., M. J. Sweet, A. Mansell, S. Kellie und B. Kobe (2016). "**TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target.**" *J Leukoc Biol* 100(1): 27-45.
- Ushach, I. und A. Zlotnik (2016). "**Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage.**" *J Leukoc Biol* 100(3): 481-489.
- von Baum, H., S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, C. Lück und C. N. f. C. A. P. S. Group (2008). "**Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia.**" *Clin Infect Dis* 46(9): 1356-1364.
- Wang, C. Z., F. Deng, H. Li, D. D. Wang, W. Zhang, L. Ding und J. H. Tang (2018). "**MiR-101: a potential therapeutic target of cancers.**" *Am J Transl Res* 10(11): 3310-3321.
- Wang, H., Y. Meng, Q. Cui, F. Qin, H. Yang, Y. Chen, Y. Cheng, J. Shi und Y. Guo (2016). "**MiR-101 Targets the EZH2/Wnt/ $\beta$ -Catenin the Pathway to Promote the Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.**" *Sci Rep* 6: 36988.
- Wang, L., J. Yao, H. Sun, K. He, D. Tong, T. Song und C. Huang (2017). "**MicroRNA-101 suppresses progression of lung cancer through the PTEN/AKT signaling pathway by targeting DNA methyltransferase 3A.**" *Oncol Lett* 13(1): 329-338.
- Wei, M., H. Jin, S. Yang, Z. Li, X. Wang, L. Li, Y. Jia und M. Cui (2021). "**MicroRNA-101 inhibits growth and metastasis of human ovarian cancer cells by targeting PI3K/AKT.**" *Arch Med Sci* 17(1): 127-134.
- Weng, Q. P., M. Kozlowski, C. Belham, A. Zhang, M. J. Comb und J. Avruch (1998). "**Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies.**" *J Biol Chem* 273(26): 16621-16629.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory und S. Diederichs (2009). "**Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.**" *Nat Cell Biol* 11(3): 228-234.
- Wojnilowicz, M., A. Glab, A. Bertucci, F. Caruso und F. Cavalieri (2019). "**Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA.**" *ACS Nano* 13(1): 187-202.

- Wong, L., K. Lee, I. Russell und C. Chen (2007). "**Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays.**" Applied Biosystems (127AP11-01).
- Young, M. M., M. Kester und H. G. Wang (2013). "**Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy.**" J Lipid Res 54(1): 5-19.
- Yu, V. L., J. F. Plouffe, M. C. Pastoris, J. E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C. M. Heath, D. L. Paterson und A. Cheresky (2002). "**Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey.**" J Infect Dis 186(1): 127-128.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp und D. P. Bartel (2000). "**RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.**" Cell 101(1): 25-33.
- Zani, I. A., S. L. Stephen, N. A. Mughal, D. Russell, S. Homer-Vanniasinkam, S. B. Wheatcroft und S. Ponnambalam (2015). "**Scavenger receptor structure and function in health and disease.**" Cells 4(2): 178-201.
- Zhu, W., L. A. Hammad, F. Hsu, Y. Mao und Z. Q. Luo (2013). "**Induction of caspase 3 activation by multiple Legionella pneumophila Dot/Icm substrates.**" Cell Microbiol 15(11): 1783-1795.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn und M. B. Lutz (2010). "**Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.**" Blood 116(16): e74-80.

## **Anhang**

### **Zugänglichmachung der Daten**

Die in dieser Arbeit verwendeten Rohdaten sowie deren Auswertungen wurden über das Marburger Forschungsdatenrepositorium verfügbar gemacht. Ein Abruf der Daten kann nach vorheriger Freischaltung unter <https://data.uni-marburg.de/handle/dataumr/170> erfolgen.

Der Name der Sammlung entspricht dabei dem dieser Arbeit: „miRNAs und bioreaktive Substanzen mit Einfluss auf Legionella pneumophila verursachte Infektionen“.

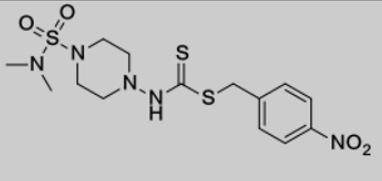
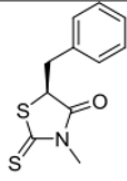
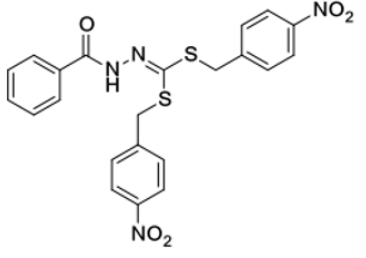
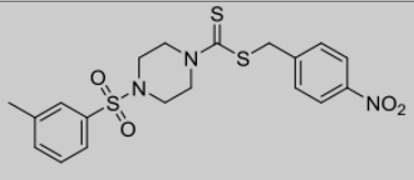
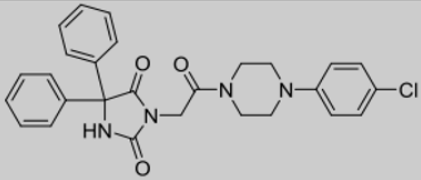
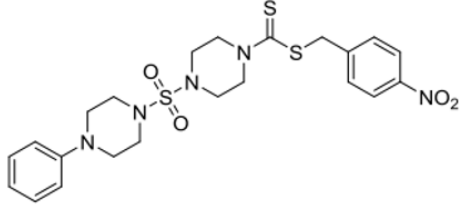
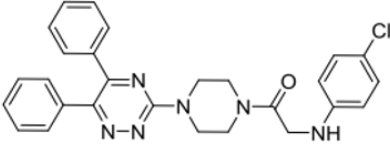
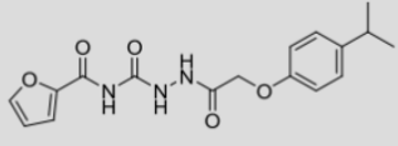
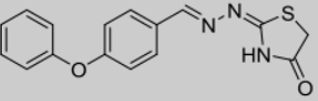
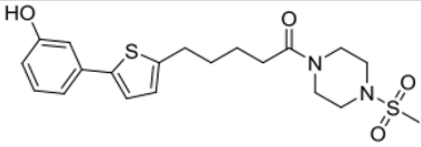
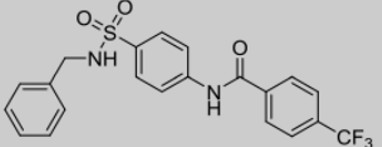
| #         | Struktur  | #         | Struktur  |
|-----------|---|-----------|---|
| Schl37015 |    | Schl38018 |  |
| Schl37020 |    | GR48      |   |
| EMS056    |    | GR438     |   |
| EMS022    |   | LOL037    |  |
| OM152     |  |           |   |
| Schl36050 |  |           |   |
| Schl38009 |  |           |   |

Abbildung 0.1: Durch Prof. Dr. M. Schlitzer ausgewählte Substanzen. Verwendung im Substanz-Screening.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

Der tabellarische Lebenslauf wurde in der elektronischen Veröffentlichung gemäß den Empfehlungen der Universität Marburg entfernt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „miRNAs und Chemikalien mit Einfluss auf durch Legionella pneumophila verursachte Infektionen“ selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

Ort, Datum

---

Stephan Ringshandl



### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. Anke Becker und Prof. Dr. Bernd Schmeck bedanken. Sie haben es mir durch die Vergabe eines interdisziplinären Forschungsthemas ermöglicht viele Eindrücke aus der Welt der Wissenschaft zu gewinnen und diese Arbeit anzufertigen. Ich danke für die vielen Ratschläge und manchmal doch nötig gewordene Flexibilität.

Mein Dank geht auch an die Kooperationspartner, die die Daten in dieser Arbeit möglich gemacht haben: Dr. Kristin Surmann und Prof. Dr. Uwe Völker für die Verarbeitung, Analyse und Auswertung der zugeschickten Massenspektrometrie-Daten, Prof. Dr. Martin Schlitzer für das Bereitstellen von elf der bioreaktiven Substanzen, Nikolaus Korfhage, Dr. Markus Mühling und Prof. Dr. Bernd Freisleben für die Programmierung der Auswertesoftware.

Dank gebührt auch den Kollegen der zwei Arbeitsgruppen, die mich stets in meinem Vorhaben unterstützt haben. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Anna Lena Jung und Dr. Wilhelm Bertrams für ihren fachlichen Beistand, bei Patrick Manz und Dr. Javier Serrania für die Mithilfe bei der Automatisierung, sowie bei Kerstin Hoffmann für die regelmäßige Unterstützung im Labor bedanken.

Ich danke allen Kollegen die meine Zeit im Labor und darüber hinaus mit guter Gesellschaft versehen haben. Insbesondere möchte ich dabei Marina Aznaourova, Harshavardhan Janga, Heiko Wendt, Neda Farmani, Katrin Bedenbender, Marcel Wagner, Christina Frania, Björn Klabunde und Christian Rauch für die gemeinsame Promotionszeit danken. Die gemeinsamen Tage und Nächte bleiben mir immer im Gedächtnis und haben die Jahre lebenswert gemacht.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Biohazard-Conquerors, die mich an vielen Abenden von sinnvolleren Tätigkeiten abgehalten, und doch diese Arbeit, oft mit einsilbigen Nachfragen, vorangetrieben haben. Für die Ablenkung durch die geistreichen Diskussionen, wenn auch manchmal etwas realitätsfern, bin ich sehr dankbar.

Schlussendlich möchte ich auch meiner Familie danken. Sie hat mich während meiner Promotionszeit stets unterstützt, mir in allen Lebenslagen zur Seite gestanden und so den nötigen Rückhalt gegeben.