

# **Immunologische Untersuchungen zur Bedeutung von bakteriellen Polyphosphaten bei Wirt-Pathogen-Interaktionen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Kevin Brück**

Geboren in Frankfurt am Main

Mainz, Oktober 2024

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:



UNIVERSITÄTS**medizin.**  
MAINZ



Die vorliegende Dissertation wurde in der Forschungsgruppe von [REDACTED]  
[REDACTED] am Centrum für Thrombose und Hämostase der Universitätsmedizin  
Mainz und am Pulmonary Center der Boston University durchgeführt.

# 1 Index

<b>1 Index</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Abkürzungen</b> .....	<b>5</b>
<b>3 Einleitung</b> .....	<b>11</b>
3.1 Bakterielle Lungenentzündung und Sepsis belasten die globale Gesundheit ....	11
3.2 Biologie und Pathogenese von Streptococcus pneumoniae .....	15
3.3 Immunantwort der Lunge auf eine Infektion .....	19
3.4 Anorganische Polyphosphate .....	23
3.5 Der protonenaktivierte Chloridionenkanal 1 (PACC1) .....	28
<b>4 Projekthintergrund</b> .....	<b>33</b>
<b>5 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>35</b>
<b>6 Materialien</b> .....	<b>39</b>
6.1 Reagenzien .....	39
6.2 Antikörper .....	40
6.3 Stimulantien .....	41
6.4 Kits.....	42
6.5 Puffer und Medien .....	42
6.6 Mausstämme .....	43
6.7 Bakterien .....	43
6.8 Zelllinien .....	43
6.9 Primer .....	44
6.10 Software .....	44
6.11 Instrumente.....	45
6.12 Laborutensilien .....	45
<b>7 Methoden</b> .....	<b>47</b>
7.1 Genotypisierung.....	47
7.2 Kultivierung von L929-Zellen und Herstellung von L929-konditioniertem Medium.....	48
7.3 Generierung von Makrophagen aus Knochenmarkszellen.....	49

---

7.4 Bestimmung der Zellkonzentration .....	49
7.5 Isolierung der Peritonealzellen.....	50
7.6 Isolierung der Splenozyten.....	50
7.7 Isolierung der Alveolarzellen.....	50
7.8 Durchflusszytometrie .....	51
7.9 Viabilität und Aktivierung von Makrophagen unter hypoxischen Bedingungen	52
7.10 Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen.....	52
7.11 Echtzeit-Untersuchungen des Metabolismus.....	53
7.12 Intrazelluläre Ansäuerung nach Phagozytose .....	54
7.13 Messung der Lungenschädigung.....	54
7.14 Quantifizierung von reaktiven Stickstoffmonoxiden .....	54
7.15 Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies .....	55
7.16 Zytokinanalyse.....	55
7.17 Kultivierung und Infektion von <i>S. pneumoniae</i> .....	55
7.18 Kultivierung und Infektion von <i>E. coli</i> .....	56
7.19 Bewertung der Belastung im Infektionsexperiment.....	57
7.20 Isolierung der RNA .....	58
7.21 cDNA Synthese und quantitative Echtzeit-PCR.....	58
7.22 Patch-Clamp .....	60
7.23 Monokolonisierung keimfreier Mäusen .....	60
7.24 Isolierung bakterieller DNA aus LB-Kulturen und Mauskot.....	60
7.25 Isolierung von Zellen aus der Lamina propria des Kolons .....	61
7.26 ATAC-Sequenzierung .....	62
7.27 Einzelkern-ATAC- und RNA-Sequenzierung .....	62
7.28 Statistik und grafische Darstellung .....	63
<b>8 Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
8.1 Validierung genetisch veränderter PACC1-/- Mäuse .....	64
8.2 Immunorgane und Immunzellen exprimieren Pacc1 .....	66
8.3 Mikrobielle Moleküle beeinflussen die Expression von Pacc1 in Makrophagen	68
8.4 PACC1 interagiert mit Proteinen und Signalwegen der Immunantwort.....	70
8.5 Die Phosphorylierung von STAT3Y705 ist unabhängig von PACC1 .....	77

8.6 PACC1-/- Makrophagen zeigen einen veränderten Metabolismus nach mikrobieller Aktivierung.....	78
8.7 PACC1-/- Immunzellen haben veränderte ROS-Konzentrationen unter unstimulierten Bedingungen und nach mikrobieller Aktivierung .....	81
8.8 PACC1 ist an der intrazellulären Ansäuerung während der Phagozytose von Mikroben beteiligt.....	83
8.9 PACC1-/- Mäuse zeigen eine erhöhte Entzündung und mikrobielle Belastung während einer E. coli Infektion .....	85
8.10 PACC1-/- Mäuse zeigen einen größeren Lungenschaden, eine erhöhte Entzündung und Mortalität während einer S. pneumoniae Infektion .....	87
8.11 PACC1-/- dendritische Zellen sind weniger effizient bei der Induktion früher T-Zell-Aktivierungsmarker .....	90
8.12 Keine protektive Rolle von PACC1 für das Überleben von Makrophagen unter Hypoxie und keine Veränderung der Expression von kostimulatorischen Aktivierungsmarkern.....	92
8.13 Polyphosphate haben keinen Einfluss auf die Aktivität von PACC1.....	94
8.14 Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Wirkung bakterieller Polyphosphate auf das intestinale Immunsystem.....	96
8.15 Bakterielle Polyphosphate verändern das Epigenom des intestinalen Immunsystems .....	98
8.16 Langkettige Polyphosphate interferieren mit dem IL-27 Signalweg in T-Zellen....	100
8.17 Langkettige Polyphosphate regulieren das Transkriptom und Epigenom von myeloiden und lymphoiden Zellen.....	101
8.18 Langkettige Polyphosphate verändern die Zahlen von Immunzellen des Peritoneums.....	103
<b>9 Diskussion .....</b>	<b>106</b>
9.1 Die intrazelluläre Ansäuerung während einer Phagozytose verläuft unter Beteiligung von PACC1 .....	106
9.2 PACC1 ist essentiell für die Immunantwort gegen bakterielle Infektionen in Mausmodellen für Pneumonie und Sepsis .....	117
9.3 Das Interaktionsnetzwerk und die Regulation von PACC1 bleiben unvollständig	

---

charakterisiert, deuten aber auf eine Beteiligung an diversen zellulären Prozessen hin .....	124
9.4 Potentielle Interaktionen von Polyphosphaten und PACC1 .....	129
9.5 Generierung zusätzlicher gentechnisch veränderter PACC1-Mausstämme zur weiteren Erforschung von PACC1 .....	132
9.6 PACC1 ist ein potenzielles Ziel für therapeutische Anwendungen .....	135
9.7 Das intestinale Immunsystem wird durch bakterielle Polyphosphate beeinflusst. 144	
9.8 Polyphosphate könnten ein neuer Ansatz zur Behandlung von Darmerkrankungen sein.....	148
<b>10 Zusammenfassung .....</b>	<b>152</b>
<b>11 Summary .....</b>	<b>154</b>
<b>12 Danksagung .....</b>	<b>156</b>
<b>13 Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>157</b>
<b>14 Referenzen .....</b>	<b>158</b>

## 2 Abkürzungen

### A

ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
ASOR	Säureempfindlicher nach außen gerichteter Anionenkanal
ATAC	Assay für Transposase-zugängliches Chromatin
ATP	Adenosintri-phosphat

### B

BCA	Bicinchoninsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
BiID	Näherungsabhängige Biotin-Identifizierung
BMDM	Knochenmarksabgeleiteten Makrophage
Br <sup>-</sup>	Bromid

### C

Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
CCL	Chemokin CC Motiv Ligand
cDC	klassische dendritische Zelle
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	Zystische-Fibrose-Transmembran-Regulator
CFU	Koloniebildende Einheit
cGAMP	Zyklisches GMP-AMP
cGAS	Zyklische-GMP-AMP-Synthase
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
ClC	Chloridionenkanal
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CRE	Zyklisierungsrekombinationsenzym
CRISPR	Gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen
CXCL	Chemokin CXC Motiv Ligand

**D**

2-DG	2-Desoxy-D-glucose
DAMP	Schädigungsassoziertes molekulares Muster
DCPIB	4-(2-Butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentyl-1-oxo-2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxy)butansäure
DDFSK	1,9-Dideoxyforskolin
DHR123	Dihydrorhodamin 123
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
DIOA	R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]essigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	Diphenylamin-2-carbonsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA

**E**

EEA1	Frühes Endosom-Antigen 1.
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
ECAR	Extrazelluläre Ansäuerungsrate
ECD	Extrazelluläre Domäne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzymgebundener Immunadsorptionstest

**F**

FVD	Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff
-----	----------------------------------

**G**

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GF	Keimfreie
GMP	Guanosinmonophosphat
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat

**H**

H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
HOCl	Hypochlorige Säure
HSP	Hitzeschockprotein

**I**

IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	Internationale Klassifikation der Krankheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-27R $\alpha$	IL-27 Rezeptor $\alpha$
ILC	Angeborene lymphoide Zelle
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
I <sup>-</sup>	Iodid

**J**

JMI	Juxtamembranschnittstelle
-----	---------------------------

**L**

LAMP1	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 1
LoxP	Locus von X über P1
LPM	Große peritoneale Makrophagen
L-polyP	Langkettige Polyphosphate
LPS	Lipopolysaccharide

**M**

MAIT	Mukosa-assoziierte invariante T-Zelle
M-CSF	Monozytenkolonie-stimulierender Faktor
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen

MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIF	Makrophagen-Inhibitionsfaktor
miRNA	MicroRNA
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleäres phagozytäres System
mRNA	Boten-RNA
mTOR	Ziel des Rapamycins in Säugetieren
mTORC	mTOR Komplex
<b>N</b>	
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	Neutrophilen extrazelluläre Fallen
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxide
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	Reaktive Stickstoffmonoxide
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure
<b>O</b>	
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Superoxid
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate
ODN	Oligonukleotide
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
<b>P</b>	
PACC1	Protonenaktivierter Chloridionenkanal 1
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogenassoziiertes molekulares Muster
PAORAC	Protonenaktivierter nach außen gerichteter Anionenkanal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV	Pneumokokken-Konjugatimpfstoff

PGN	Peptidoglycan
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
PPK	Polyphosphatkinase
PPR	Mustererkennungsrezeptoren
PPSV	Pneumokokken-Polysaccharid-Impfstoff
PPX	Polyphosphatphosphatase

**Q**

qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
------	---

**R**

RAB	Ras-assoziiertes Protein
RAGE	Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen I
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

**S**

SARS-CoV	Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus
SCN <sup>-</sup>	Thiocyanat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	Kleine interferierende RNA
SP	Surfactantprotein
SPF	spezifisch pathogenfreie
SPM	Kleine peritoneale Makrophagen
S-polyP	Kurzkettige Polyphosphate
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
STING	Stimulator von Interferongen
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

**T**

TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TMEM206	Transmembranprotein 206
TNF	Tumornekrosefaktor
TMD	Transmembrandomäne
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
T <sub>RM</sub>	Gewebe-residente T-Gedächtniszellen

**V**

VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
------	-------------------------------------

**W**

WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

### 3 Einleitung

#### 3.1 Bakterielle Lungenentzündung und Sepsis belasten die globale Gesundheit

Infektionskrankheiten stellen eine globale Herausforderung für die Gesundheit dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren Infektionen im Jahr 2018 für etwa ein Drittel der zehn häufigsten Todesursachen weltweit verantwortlich. In einkommensschwachen Ländern waren es sogar die Hälfte (WHO, 2018). Die häufigste erregerbedingte Todesursache waren Infektionen der unteren Atemwege: Kehlkopf, Luftröhre, Bronchien und Alveolen. In einkommensstarken Ländern sind Infektionen der unteren Atemwege tatsächlich die einzige erregerbedingte Todesursache unter den zehn häufigsten Todesursachen (Tabelle 1). Im Jahr 2019 ging die WHO noch einen Schritt weiter und stufte sechs der zehn globalen Gesundheitsbedrohungen als Infektionskrankheiten oder damit verbundene Phänomene ein, z. B. die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien (WHO, 2019b).

Tabelle 1 | Die zehn häufigsten Todesursachen weltweit

Platz	Weltweit	Einkommensschwache Länder	Einkommensstarke Länder
1	Herzkrankheit	<b>Untere Atemwegsinfektion</b>	Herzkrankheit
2	Schlaganfall	<b>Durchfallerkrankung</b>	Schlaganfall
3	COPD	Herzkrankheit	Alzheimer
4	<b>Untere Atemwegsinfektion</b>	<b>HIV / AIDS</b>	Lungenkrebs
5	Alzheimer	Schlaganfall	COPD
6	Lungenkrebs	<b>Malaria</b>	<b>Untere Atemwegsinfektion</b>
7	Diabetes	<b>Tuberkulose</b>	Darmkrebs
8	Straßenunfälle	Komplikationen bei Frühgeburten	Diabetes
9	<b>Durchfallerkrankung</b>	Geburtsasphyxie	Nierenkrankheit
10	<b>Tuberkulose</b>	Straßenunfälle	Brustkrebs

**AIDS:** Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom; **COPD:** Chronisch obstruktive Lungenerkrankung; **HIV:** Humanes Immundefizienz-Virus. Durch Infektionskrankheiten verursachte Todesfälle sind in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben. Erstellt nach Daten aus WHO, 2018.

Als Folge einer Infektion der unteren Atemwege kann sich eine Lungenentzündung (Pneumonie) entwickeln. Eine Pneumonie ist eine akute oder chronische Entzündung der Lunge, die meist durch Infektionen mit Bakterien, Viren oder Pilzen verursacht

wird. Ätiologisch kann eine Pneumonie auch durch abiotische Faktoren wie die Aspiration von reizenden Gasen oder Säuren verursacht werden. Die Diagnose erfolgt durch radiologische und sonographische bildgebende Verfahren sowie labordiagnostische und mikrobiologische Untersuchungen von Blut, Urin, Sputum und bronchoalveolärer Lavage. Es existieren keine spezifischen Bluttests zur Identifizierung einer Pneumonie, lediglich allgemeine Entzündungsmarker wie Leukozytose und erhöhtes C-reaktives Protein können nachgewiesen werden. Im Urin kann jedoch eine Legionelleninfektion spezifisch detektiert werden. Die Analyse der klinischen Parameter und die mikrobiologische Kultur dienen der Diagnose einer infektiösen Pneumonie. Bei Bestätigung einer erregerbedingten Pneumonie wird in der Regel eine Antibiotikatherapie eingeleitet, wobei es das Ziel ist, den zugrundeliegenden Erreger zu identifizieren, um eine Antibiotikatherapie nach mikrobiologischer Sensibilitätsprüfung durchzuführen. Bei fehlendem Erregernachweis wird in der Regel dennoch eine empirische Antibiotikatherapie eingeleitet. Auch bei Aspirationspneumonien wird eine Antibiotikatherapie durchgeführt, da mit dem Aspirat potentiell pathogene Mikroorganismen in die Lunge gelangen können. Statistisch gesehen sind Kinder unter 5 Jahren und ältere Menschen über 65 Jahren am häufigsten von schwer verlaufenden erregerbedingten Pneumonien betroffen (Torres et al., 2021). Bei Kindern unter 5 Jahren sind Pneumonien für 14% der Sterblichkeit verantwortlich. Laut WHO starben 2019 ca. 740.000 Kinder an den

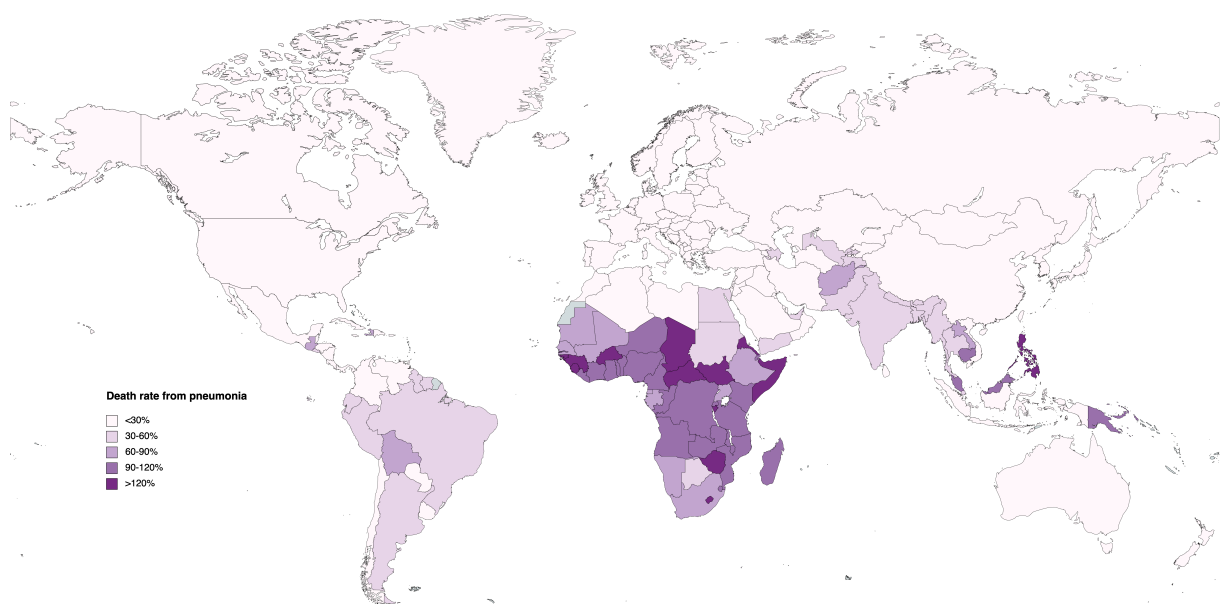


Abbildung 1 | **Sterblichkeit an Lungenentzündung weltweit**

Sterblichkeit durch Lungenentzündung weltweit pro 100.000 Personen, altersstandardisiert für beide Geschlechter. Die Karte wurde erstellt mit <https://www.mapchart.net> und basiert auf Daten von [Dadonaite & Roser, 2018](#).

Folgen einer Lungenentzündung (WHO, 2021). Vor allem in einkommensschwachen Ländern in Subsahara-Afrika, Südamerika und Südostasien ist die Sterblichkeit durch Lungenentzündungen hoch (Abbildung 1).

Bakterien waren für etwa ein Viertel aller ambulant erworbenen Pneumonien in Europa zwischen 2003 und 2014, also vor der pandemischen Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19), verantwortlich und der häufigste mikrobielle Erreger (Torres et al., 2021). Die hohe Prävalenz von Pneumonien ohne nachweisbaren Erreger ist wahrscheinlich auf eine unzureichende Probenentnahme zurückzuführen. Zum einen ist es schwierig, Proben aus den unteren Atemwegen zu gewinnen, zum anderen kann eine präventive Antibiotikatherapie vor der eindeutigen Identifizierung der Ursache zum Verlust der Probenkultur führen (Shoar & Musher, 2020). Innerhalb der bakteriellen Pneumonien ist die überwiegende Mehrzahl der Erkrankungen auf eine Infektion mit dem Erreger *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) zurückzuführen. In Europa werden mehr Pneumonien durch eine Infektion mit *S. pneumoniae* verursacht als durch alle anderen Bakterien zusammen und etwa siebenmal mehr als durch eine Infektion mit *Legionella pneumophila*, dem zweithäufigsten Erreger bakterieller Pneumonien (Torres et al., 2021) (Abbildung 2). Nach Angaben der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde sterben jährlich 300.000 Kinder unter 5 Jahren an einer Infektion mit *S. pneumoniae*, die meisten davon in Entwicklungsländern (CDC, 2022).

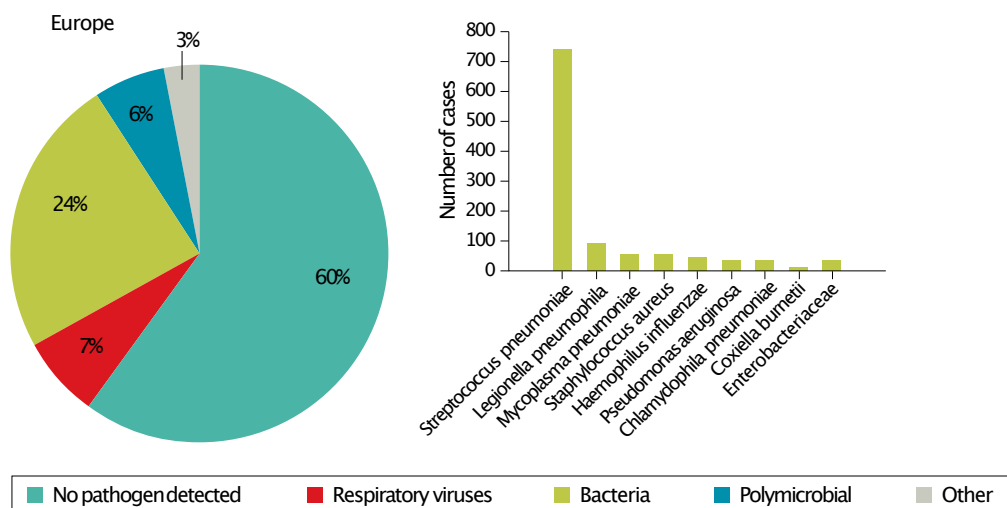
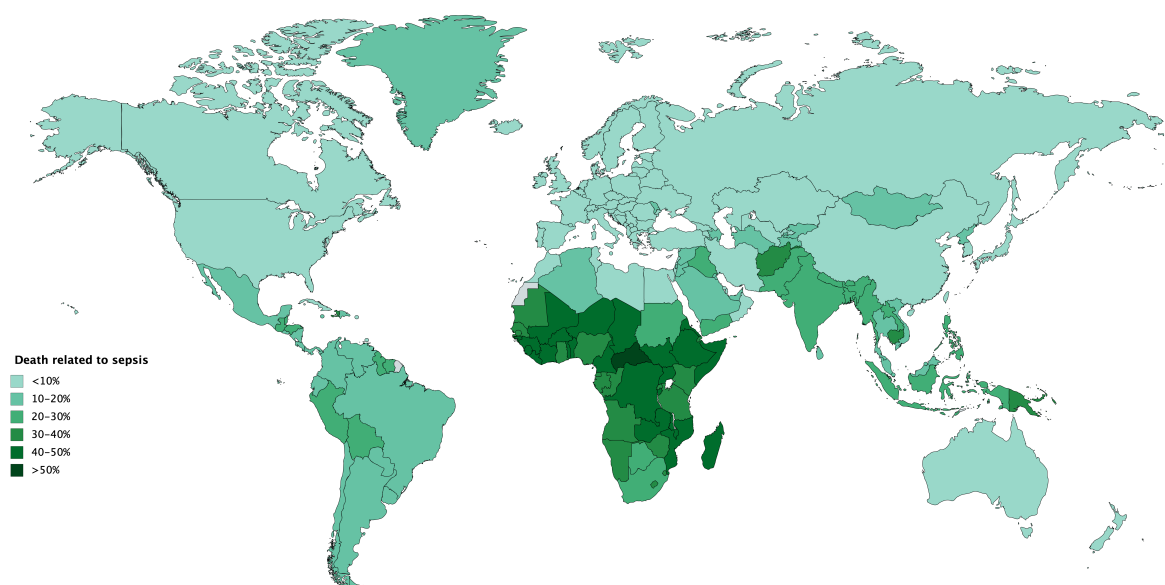


Abbildung 2 | **Prävalenz und Ätiologie von bakteriellen Pneumonien in Europa**  
 Prävalenz der ätiologischen Ursachen ambulant erworbener Pneumonien im Allgemeinen und mit Fokus auf bakterielle Pneumonien bei Erwachsenen in Europa von 2003 bis 2014. Modifiziert nach Torres et al., 2021.

Neben bakteriellen Lungenentzündungen stellen auch Sepsiserkrankungen eine Belastung für die globale Gesundheit dar. Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion als Folge einer fehlregulierten Reaktion des Wirts auf eine Infektion (Singer et al., 2016). Sepsis umfasst somit nicht explizit Bakterien als Ursache, sondern auch Infektionen mit anderen Erregern wie Viren, Pilzen und Parasiten sowie beispielsweise Lungenentzündungen, die zu einer Sepsis führen können. Im Jahr 2017 gab es weltweit schätzungsweise 48,9 Millionen Fälle von Sepsis, von denen etwa 11 Millionen tödlich verliefen, was etwa 20% aller Todesfälle weltweit entspricht (Rudd et al., 2020). Sepsis ist ein globales Problem, aber wie viele Infektionskrankheiten betrifft sie besonders den globalen Süden, vor allem Afrika südlich der Sahara und Südostasien (**Abbildung 3**). Trotz der hohen prognostizierten Sepsissterblichkeit sind die zugrunde liegenden epidemiologischen Daten insbesondere in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen gering und müssen extrapoliert werden, was zu Ungenauigkeiten führt (Hotchkiss et al., 2016). Darüber hinaus ordnet die internationale Klassifikation der Krankheiten (ICD) Todesursachen der zugrunde liegenden Erkrankung zu. Da die Sepsis durch eine Infektion oder durch andere Erkrankungen, die eine Infektion begünstigen, wie z. B. Diabetes mellitus, begünstigt wird, wird die Sepsis häufig nicht als Todesursache, sondern als Begleiterkrankung klassifiziert, was die Datenerhebung erschwert (Rudd et al., 2020).



**Abbildung 3 | Sepsisbedingte Sterblichkeit weltweit**  
Prävalenz aller sepsisbedingten Todesfälle weltweit im Jahr 2017 unter Berücksichtigung der Altersstandardisierung für beide Geschlechter. Die Karte wurde mit <https://www.mapchart.net> erstellt und basiert auf Daten aus [Rudd et al., 2020](#).

### 3.2 Biologie und Pathogenese von *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* ist ein grampositives, extrazelluläres Bakterium. Aufgrund ihrer gepaarten Anordnung gehören sie zu den Diplokokken und werden, da eine Infektion häufig mit einer Lungeninfektion einhergeht, auch als Pneumokokken bezeichnet. Sie besiedeln die Schleimhäute der oberen Atemwege: Nasenhöhle, Nasennebenhöhlen, Mundhöhle, Rachen. 27-60% der Kinder unter 10 Jahren und bis zu 10% der Erwachsenen sind Träger. *S. pneumoniae* ist sowohl ein kommensales Bakterium als auch ein opportunistischer Erreger (Weiser et al., 2018). Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt durch engen Kontakt und ist saisonal mit einer Häufung in den trockenen und kalten Monaten (Musher, 2003, Numminen et al., 2015). Eine invasive Infektion, d. h. eine Besiedlung entfernter Organe, durch *S. pneumoniae* kann durch Verbreitung der eigenen Kultur, Aspiration oder Bakteriämie erfolgen. (Bogaert et al., 2004). Je nach Lokalisation führt die Infektion zu Otitis media, Meningitis, Sepsis oder Pneumonie. Die Entzündung kann lokal begrenzt sein, aber auch systemisch werden. Die Pathogenität von *S. pneumoniae* hängt stark vom Vorhandensein einer Kapsel ab. Nicht bekapselte Bakterien können die oberen Atemwege kolonisieren, verursachen aber selten invasive Infektionen (Weiser et al., 2018). Die Kapsel ist der wichtigste Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*, da sie die Opsonisierung und Phagozytose durch Antikörper und das Komplementsystem hemmt und den Einschluss im Nasenschleim verringert. Dies erleichtert den Zugang zur Epitheloberfläche, der natürlichen Nische von *S. pneumoniae* (Kadioglu et al., 2008, Andre et al., 2017). *S. pneumoniae* weist eine große Variabilität in der Kapselzusammensetzung auf. Die Serotypen werden anhand der biochemischen Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide klassifiziert. Bisher wurden 97 verschiedene Serotypen identifiziert (Geno et al., 2015). Mit dem Serotyp sind auch wichtige epidemiologische Eigenschaften verbunden. Je nach Geographie und Alter des Wirtes treten bestimmte Serotypen häufiger auf. Auch die Krankheitssymptome und die Hospitalisierungsrate sind mit den vorherrschenden Serotypen assoziiert (Hausdorff et al., 2005). Im Jahr 2017 wurde *S. pneumoniae* von der WHO als eines der zwölf Bakterien eingestuft, die eine Bedrohung für die globale Gesundheit darstellen und für die dringend neue Antibiotikatherapien entwickelt werden müssen (WHO, 2017).

Es gibt zwei Arten von Impfstoffen gegen *S. pneumoniae*. Beide basieren auf der

Induktion einer Immunität gegen die Kapselpolysaccharide, da diese den wichtigsten Virulenzfaktor und die immundominante Struktur auf der Bakterienoberfläche darstellen. Der Pneumokokken-Polysaccharid-Impfstoff (PPSV) basiert auf der Impfung mit Kapselpolysacchariden, die eine T-Zell-unabhängige B-Zell-Immunantwort induzieren. Die Bindung und Vernetzung mehrerer B-Zell-Rezeptoren (BCR) durch die Kapselpolysaccharide führt zur Aktivierung der B-Zellen. In der Folge kommt es zur Entwicklung von Plasmazellen und zur Produktion neutralisierender Antikörper, hauptsächlich die Immunglobuline (Ig) IgM und IgG2. Die Impfung mit PPSV führt jedoch nicht zur Bildung von B-Gedächtniszellen, die für die Ausbildung einer lang anhaltenden Immunität wichtig sind. Der Impfschutz durch PPSV ist daher auf einen relativ kurzen Zeitraum begrenzt. Bei Kindern beträgt er weniger als zwei Jahre. Außerdem kommt es nicht zur Ausbildung von Keimzentren in Lymphfollikeln oder Milz und damit nicht zur Affinitätsreifung der Antikörper. Dabei durchlaufen aktivierte B-Zellen einen Reifungsprozess aus somatischer Hypermutation der hypervariablen komplementaritätsbestimmenden Regionen der Antikörpergene und anschließender Selektion durch folliculäre T-Helferzellen.

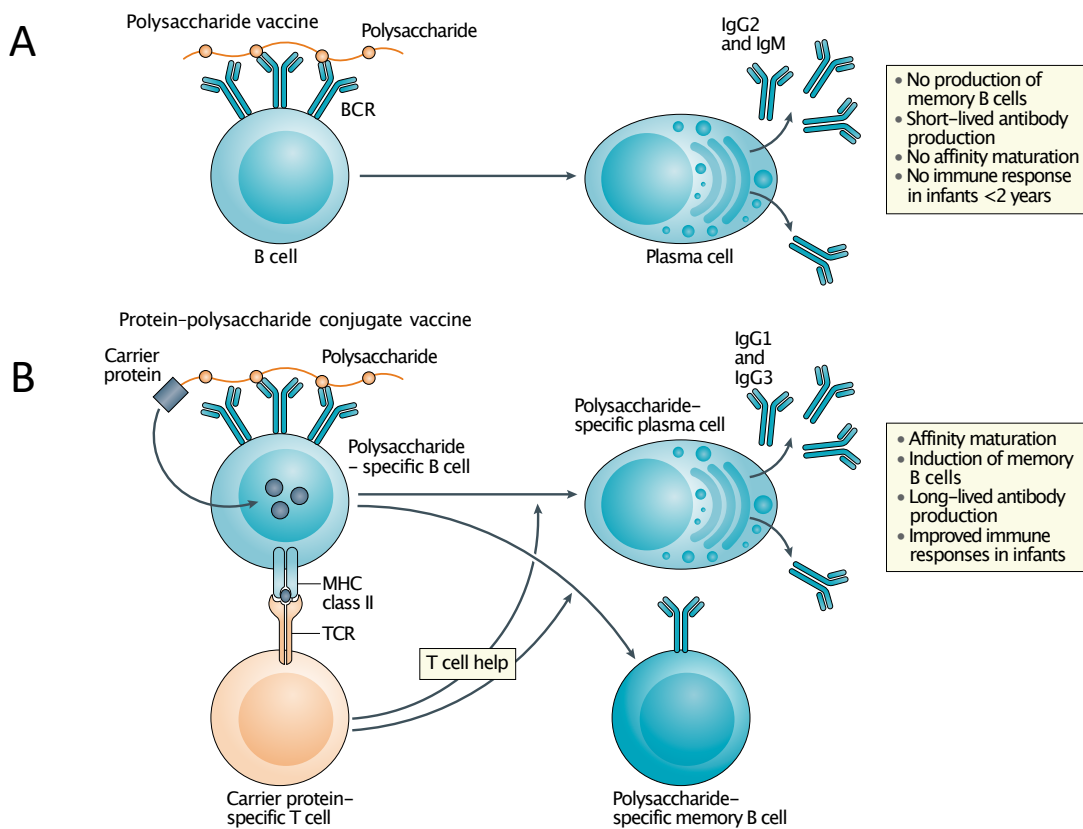


Abbildung 4 | **Mechanismen der Pneumokokken-Impfstoffe PPSV und PCV**  
**A** Einfache Kapselpolysaccharide des PPSV binden und vernetzen BCRs, was zur Aktivierung der B-Zelle führt. Dies führt zu einer T-Zell-unabhängigen Produktion von kurzlebigen Antikörpern. **B** Das Konjugat aus Trägerprotein und Kapselpolysacchariden führt zu einer T-Zell-abhängigen Induktion der Produktion langlebiger und hochspezifischer Antikörper. Modifiziert nach Pollard & Bijker, 2021.

Dadurch erhöht sich die Bindungsaffinität der Antikörper zum Antigen ([Pollard & Bijker, 2021](#)) (**Abbildung 4A**).

Beim Pneumokokken-Konjugatimpfstoff (PCV) sind im Gegensatz zum PPSV die Kapselpolysaccharide mit einem Trägerprotein konjugiert. Dies führt zu einer T-Zell-abhängigen Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort. Mechanistisch werden die Kapselpolysaccharide weiterhin durch BCRs gebunden, das Trägerprotein wird jedoch zusätzlich durch B-Zellen phagozytiert. In speziellen Zellkompartimenten, den Phagolysosomen, wird das Trägerprotein enzymatisch gespalten und das Peptid auf einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II geladen. Anschließend präsentiert die B-Zelle den beladenen MHC-II-Peptid-Komplex einer T-Zelle, deren T-Zell-Rezeptor (TCR) spezifisch für das Antigen ist. Dadurch kommt es zusätzlich zur Bildung von B-Gedächtniszellen und damit zu einer lang anhaltenden Antikörperproduktion sowie zur Generierung hochspezifischer IgG1- und IgG3-Antikörper durch Affinitätsreifung (**Abbildung 4B**) ([Pollard & Bijker, 2021](#)).

Wie bei anderen mikrobiellen Pneumonien ist das Risiko, an einer invasiven Infektion mit *S. pneumoniae* zu sterben, in der Bevölkerung ungleich verteilt. Kinder unter 5 Jahren und ältere Menschen über 65 Jahren haben die höchste Inzidenz und das höchste Risiko für einen letalen Krankheitsverlauf. Als mögliche Ursachen für die biphasische Risikoverteilung werden der Aufbau einer natürlichen Immunität in der späten Kindheit und die beginnende Immunoseneszenz im Alter angenommen ([Wilson et al., 2017](#), [Krone et al., 2014](#)). Für Kinder unter 5 Jahren empfiehlt die WHO die Impfung mit PCV als Teil der Standardimpfungen. Für ältere Personen weist die WHO auf eine unzureichende Evidenzbasis hin, insbesondere in Ländern mit niedrigem Einkommen und unter Berücksichtigung der geografischen Verteilung der Serotypen ([WHO, 2019a](#)).

Durch die flächendeckende Einführung der PCV-Impfung konnte die Inzidenz invasiver Pneumokokkenerkrankungen bei Kindern reduziert werden. Gleichzeitig hat die verminderte Ausbreitung die Ausbildung einer Herdenimmunität begünstigt, die auch Personen schützt, die sich nicht impfen lassen können oder wollen ([Whitney et al., 2003](#), [O'Brien et al., 2007](#)). Dennoch stellt *S. pneumoniae* nach Einschätzung der WHO weiterhin eine Bedrohung für die globale Gesundheit dar ([WHO, 2017](#)). Zum einen besitzt *S. pneumoniae* eine hohe natürliche Kompetenz, DNA von anderen Pneumokokken, aber auch von oralen Streptokokken aufzunehmen und in das

eigene Genom zu integrieren. Dieser Prozess führt zu einer fortschreitenden Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in *S. pneumoniae* und damit zu eingeschränkten Therapiemöglichkeiten. Zum anderen hat der breite Einsatz des Impfstoffs zu einer erhöhten Prävalenz von Serotypen geführt, die nicht in der Impfstoffformulierung enthalten sind, als Folge eines immuninduzierten Selektionsdrucks (Varon & Cohen, 2019). Eine Immunisierung mit PCV umfasst in der Regel nur 10, 13 oder 23 der ca. 97 Serotypen. Da jedoch nicht jeder Serotyp mit einer invasiven Infektion und Erkrankung assoziiert ist, sind die derzeitigen Impfstoffe unvollständig und konzentrieren sich nur auf die prominentesten Vertreter (Weiser et al., 2018). Darüber hinaus nimmt der Anteil der vulnerablen älteren Bevölkerung zu, was die durch Impfung reduzierte Inzidenz wieder erhöhen könnte. Für die biomedizinische Forschung bedeutet dies die Notwendigkeit, bestehende PCV-Formulierungen zu verbessern und neue therapeutische Strategien zu entwickeln (Pichichero, 2017).

### 3.3 Immunantwort der Lunge auf eine Infektion

Infektionen der unteren Atemwege können durch Viren oder Bakterien verursacht werden und zu einer Lungenentzündung führen. Die Erreger gelangen durch Aspiration oder Translokation aus den oberen Atemwegen in die Bronchien und Alveolen. Entgegen der lange vorherrschenden Meinung sind auch die unteren Atemwege nicht völlig steril. Wie andere der Außenwelt zugängliche Oberflächen, einschließlich des Darms und der oberen Atemwege, haben auch die unteren Atemwege ihr eigenes Mikrobiom. Eine Infektion mit einem Krankheitserreger oder einem opportunistischen Erreger wie *S. pneumoniae* kann jedoch zu einer Störung des Mikrobioms führen. Der Übergang von Homöostase zu Dysbiose ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der mikrobiellen Diversität bei gleichzeitig hoher mikrobieller Belastung und einer Immunantwort auf diese Veränderung (Huffnagle et al., 2017, Dickson et al., 2014).

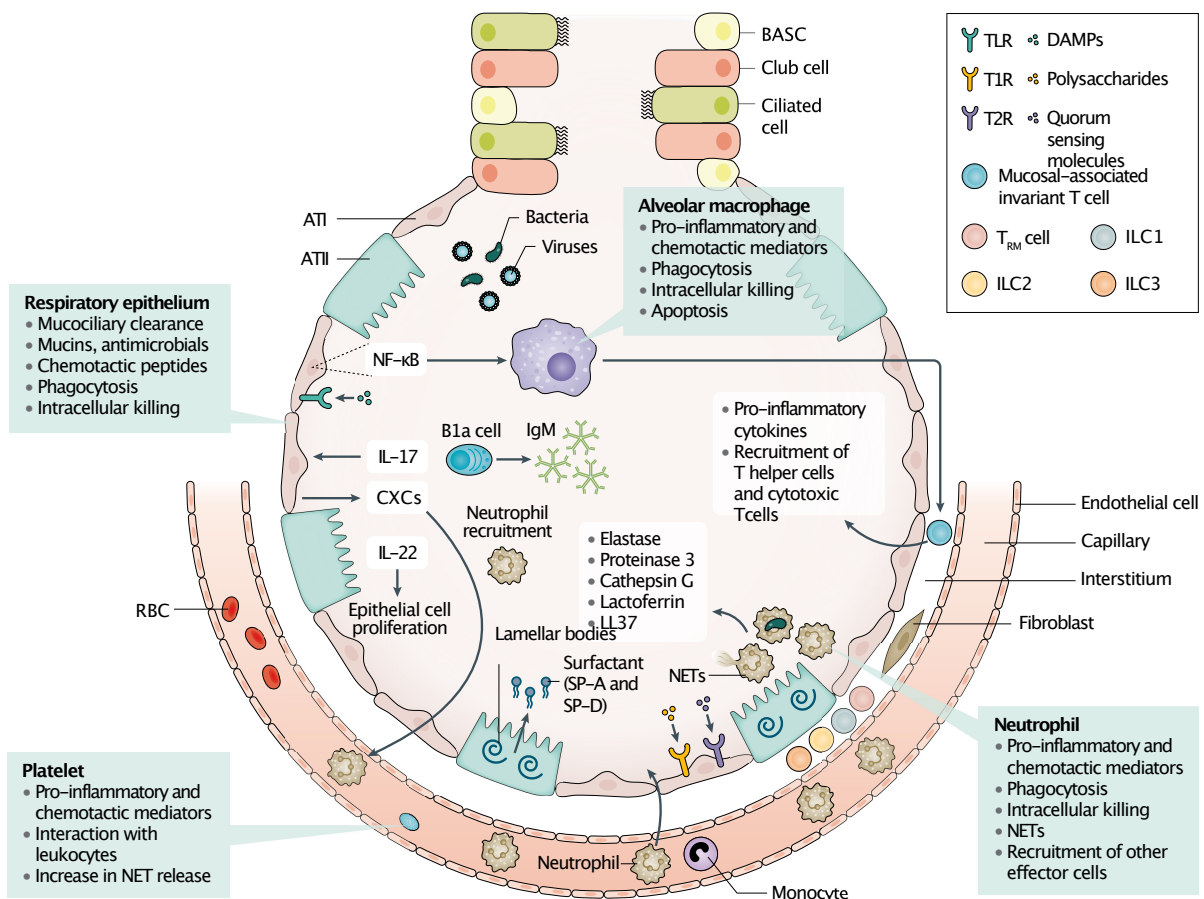
Das Immunsystem der Lunge besteht aus mehreren Abwehrschichten gegen Krankheitserreger. Die erste Verteidigungslinie besteht aus einer anatomischen Barriere aus Epithelzellen, die die Außenwelt vom Körperinneren trennt und das Eindringen von Partikeln, die größer als 3 µm sind, in die unteren Atemwege verhindert. Darüber hinaus produzieren die Epithelzellen Mukus, eine Schleimschicht aus Glykoproteinen und sekretorischen Molekülen, die Krankheitserreger einfängt. Antimikrobielle Peptide im Mukus zerstören Bakterien, und Zellen mit Flimmerhärchen befördern den Mukus durch rhythmische Bewegungen aus der Lunge (Whitsett & Alenghat, 2015, Roy et al., 2014).

Die zweite Verteidigungslinie besteht aus Zellen des angeborenen Immunsystems. Mit Hilfe von in der Keimbahn kodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRR) erkennen die Zellen pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP) und schädigungsassoziierte molekulare Muster (DAMP). Die Aktivierung der PRR durch mikrobielle oder wirtseigene Moleküle führt zur Aktivierung des nukleären Faktor κB (NFκB) Signalwegs, einem wichtigen Transkriptionsfaktor für die Aktivierung der pulmonalen Immunität (Cheng et al., 2007). In den Alveolen produzieren Typ II-Epithelzellen die Surfactantproteine (SP)-A und -D mit antimikrobiellen Eigenschaften (Han & Mallampalli, 2015). Darüber hinaus produzieren aktivierte Epithelzellen Chemokine, um weitere Immunzellen wie Neutrophile aus dem Blut zu rekrutieren (Vanderbilt et al., 2003). Gewebsresidente Makrophagen in den Alveolen

orchestrieren die initiale Immunantwort, indem sie proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  und Interleukine (IL)-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  freisetzen und Pathogene phagozytieren (Quinton & Mizgerd, 2015). Angeborene lymphoide Zellen (ILC) im Interstitium regulieren die Immunantwort anderer angeborener und adaptiver Immunzellen. ILC1, ILC2 und ILC3 fungieren als angeborene Gegenspieler der T-Helferzellen ( $T_H$ ) der Subtypen  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  und  $T_{H17}$ , da sie ähnliche Effektoreigenschaften besitzen (Panda & Colonna, 2019). Mukosaassoziierte invariante T-Zellen (MAIT) können TCR-unabhängig durch Zytokine der alveolären Makrophagen aktiviert werden. Sie unterstützen die Immunantwort durch die Aktivierung von Makrophagen, die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten (Toubal et al., 2019). Aktivierte alveoläre Makrophagen und Epithelzellen produzieren Chemokine, die Neutrophile aus dem Blut in das entzündete Gewebe locken. Neutrophile phagozytieren Bakterien und produzieren in einem oxidativen Burst reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Durch die Freisetzung von neutrophilen extrazellulären Fallen (NET), die aus kondensiertem Chromatin, Histonen, Proteasen und antimikrobiellen Peptiden bestehen, werden Bakterien gefangen und zerstört (Effah et al., 2021). Neben Neutrophilen wandern Monozyten in das entzündete Gewebe ein, differenzieren zu Makrophagen und unterstützen die gewebeständigen alveolären Makrophagen bei der Immunabwehr durch Freisetzung von TNF $\alpha$ . Dies stimuliert die Produktion von IL-17A in ILC3 (Xiong et al., 2016). B1 B-Zellen wandern aus der Pleurahöhle in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten und Milz und produzieren dort neutralisierende IgM-Antikörper (Waffarn et al., 2015). Thrombozyten sind an der Hämostase beteiligt und verstärken die Entzündung in der Lunge, indem sie die Bildung von NET fördern und die Freisetzung antimikrobieller Moleküle stimulieren (Middleton et al., 2016).

Die dritte Verteidigungslinie der Immunabwehr ist das adaptive Immunsystem. Dendritische Zellen und alveoläre Makrophagen wandern in regionale Lymphknoten, wo sie Antigene über MHC-Moleküle naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren (Curtis, 2005, Kirby et al., 2009). Aktivierte T-Zellen migrieren wiederum in das entzündete Gewebe und unterstützen die angeborene Immunantwort. CD4<sup>+</sup> T-Zellen koordinieren die Immunantwort durch die Freisetzung von Zytokinen.  $T_{H1}$ -Zellen produzieren TNF $\alpha$  und Interferon (IFN) $\gamma$ , das die Verdauung intrazellulärer Pathogene in Makrophagen stimuliert (Dalton et al., 1993). Darüber hinaus

stimulieren  $T_H1$ -Zellen die Produktion von ROS und Stickstoffmonoxid in Makrophagen.  $T_H1$ -Zellen sind wichtig für die Immunabwehr gegen intrazelluläre Bakterien und Viren.  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und sind an der Regulation der Immunabwehr gegen Parasiten beteiligt.  $T_H17$ -Zellen setzen IL-17 und IL-22 frei und unterstützen die Immunabwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (Chen & Kolls, 2013).  $CD8^+$  T-Zellen lysieren Zellen, deren MHC-I-Antigenkomplex an ihren TCR bindet. Insbesondere bei Virusinfektionen spielt die Eliminierung infizierter Zellen eine zentrale Rolle (Braciale et al., 2012). Nach der Infektion verbleiben geweberesidente  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Gedächtniszellen ( $T_{RM}$ ) B-Gedächtniszellen regional begrenzt am Ort der Entzündung (Barker et al., 2021, Torres et al., 2021).  $T_{RM}$ -Zellen können TCR-unabhängig aktiviert werden und somit



**Abbildung 5 | Immunantwort der Lunge auf Infektionen**  
 Die Immunabwehr der Lunge umfasst mehrere Verteidigungslinien. Die Anatomie der Lunge verhindert das Eindringen größerer Partikel in die Alveolen, die den Gasaustausch ermöglichen. Respiratorische Epithelzellen produzieren Mukus, der Krankheitserreger einfängt. Epithelzellen mit Flimmerhärchen transportieren den Mukus in die oberen Atemwege. Zusammen mit den im Alveolargewebe ansässigen Makrophagen initiieren die Epithelzellen die erste Immunantwort auf eindringende Krankheitserreger wie Pilze, Viren und Bakterien. Typ-II-Epithelzellen sezernieren antimikrobielle Surfactantproteine. Alveoläre Makrophagen phagozytieren Erreger und produzieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Monozyten und Neutrophile werden in das entzündete Gewebe rekrutiert. Neutrophile phagozytieren Pathogene, sezernieren antimikrobielle Moleküle und produzieren NETs. B-Lymphozyten produzieren neutralisierende IgM-Antikörper. ILCs und  $T_{RM}$ -Zellen regulieren die Immunantwort durch Freisetzung von Zytokinen. Modifiziert nach Torres et al., 2021.

die Immunabwehr bei zukünftigen Infektionen direkter unterstützen (Smith et al., 2018) (**Abbildung 5**).

Die Immunabwehr ist von entscheidender Bedeutung, um die Anzahl mikrobieller Krankheitserreger zu reduzieren. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der Gene kontrolliert, die für die antimikrobielle Immunabwehr wichtig sind, ist NF $\kappa$ B. Diese Aktivierung bewirkt ein proinflammatorisches Milieu, rekrutiert weitere Immunzellen und löst Effektormechanismen zur Zerstörung von Pathogenen aus. Ein weiteres Konzept ist die Geweberesilienz. Darunter versteht man die Fähigkeit des Wirtes, die pathophysiologischen Folgen einer Infektion zu reduzieren, ohne die mikrobielle Belastung zu verringern. Gewebeschäden entstehen entweder direkt durch den Erreger oder indirekt durch die Immunabwehr. In beiden Fällen ist es wichtig, die entstandenen Schäden zu reparieren, da die Lunge eine essentielle physiologische Bedeutung für die Einatmung von Sauerstoff und Abatmung von Kohlenstoffdioxid und damit für das Überleben des Organismus hat. Diese beiden Prozesse: Immunabwehr und Geweberesilienz, müssen im Gleichgewicht sein. Für die Geweberesilienz ist unter anderem der Signaltransduktor und Aktivator der Transkription (STAT) 3 wichtig. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Genprogramme steuert, die für die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität verantwortlich sind und eine übermäßige Entzündung verhindern (Quinton & Mizgerd, 2015).

### 3.4 Anorganische Polyphosphate

Polyphosphate sind anorganische, anionische, unverzweigte Polymere aus Phosphatmonomeren, die über energiereiche Phosphoanhydridbindungen in Kettenform miteinander verknüpft sind. Polyphosphate kommen in allen Domänen des Lebens von Archaeen über Bakterien bis hin zu Eukaryoten vor (Kornberg et al., 1999, Brown & Kornberg, 2004). Zu den physikochemischen Eigenschaften von Polyphosphaten gehört, dass sie thermostabil und redox-inert sind, d. h. dass sie ohne Enzyme, die die Aktivierungsenergie reduzieren, stabil bleiben (Xie & Jakob, 2019) (**Abbildung 6A**).

Polyphosphate vermitteln in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge zahlreiche biologische Funktionen (Smith et al., 2010). Kurzkettige Polyphosphate mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 60 bis 75 Monophosphaten werden in eukaryotischen Mastzellen und in den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten gespeichert (Ruiz et al., 2004, Moreno-Sanchez et al., 2012). Aktivierte Thrombozyten setzen Polyphosphate frei, die über den Faktor XII an der Blutgerinnung beteiligt sind und die Fibrinolyse modulieren. Darüber hinaus erhöhen kurzkettige Polyphosphate die Extravasation, so dass mehr Leukozyten zu Beginn der Wundheilung aus dem Blut in das Gewebe eindringen können (Smith et al., 2006, Smith & Morrissey, 2008, Müller et al., 2009, Mutch et al., 2010). Zudem wirken kurzkettige Polyphosphate chemotaktisch auf Neutrophile und modulieren die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Suess et al., 2019).

Langkettige Polyphosphate mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 300 bis 1.000 Monomeren kommen in Bakterien (Docampo et al., 2005) und im Säugetiergehirn (Kumble & Kornberg, 1995) vor. In Bakterien werden Polyphosphate in speziellen Organellen, den Acidocalcisomen, gespeichert, die eine hohe Calcium- und Phosphatdichte und einen sauren pH-Wert aufweisen (Seufferheld et al., 2003). Darüber hinaus sind Polyphosphate ein Bestandteil der Kapsel von *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitis* (Noegel & Gotschlich, 1983, Tinsley et al., 1993). Für Bakterien sind Polyphosphate wichtige Überlebens- und teilweise Virulenzfaktoren (Kulaev & Kulakovskaya, 2000, Wang et al., 2018). Aufgrund der langen Polymerketten der Monophosphate dienen Polyphosphate sowohl als Energie- und als auch als Phosphatspeicher. Die starke negative Ladung ermöglicht die Bildung von Chelatkomplexen mit positiv geladenen Metallkationen, so dass

Polyphosphate unter anderem an der Kalziumhämostasie und der Resistenz gegenüber Schwermetallen beteiligt sind. Darüber hinaus sind bakterielle Polyphosphate an der Genexpression (Transkription und Translation), Biofilmbildung, Kolonisierung, Motilität, Quorum Sensing und Persistenz beteiligt. Aufgrund ihrer sterischen Komplexität besitzen Polyphosphate auch Eigenschaften als Chaperone und verhindern so die Proteinaggregation unter Bedingungen wie Hitze und oxidativem Stress. Bakterien schützen sich auch vor osmotischem Schock und saurem pH, indem sie hohe Mengen an Polyphosphaten akkumulieren (Xie & Jakob, 2019). In Bakterien werden Polyphosphate durch das Enzym Polyphosphatkinase (PPK) synthetisiert. PPK1 katalysiert die reversible Übertragung der terminalen  $\gamma$ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) (Ahn & Kornberg, 1990) (**Abbildung 6B**). Darüber hinaus besitzen einige Bakterien das Enzym PPK2, das strukturell nicht mit PPK1 verwandt ist und die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe der Polyphosphatkette von Guanosindiphosphat (GDP) auf Guanosintriphosphat (GTP) sowie von Adenosinmonophosphat (AMP) auf Adenosindiphosphat (ADP) und ATP vermittelt (Nocek et al., 2008, Ishige et al., 2002, Zhang et al., 2002). Viele klinisch relevante Bakterienarten wie *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Vibrio cholerae* zeigen eine verminderte Virulenz, wenn Polyphosphatproduktion beeinträchtigt ist (Ogawa et al., 2000, Rashid & Kornberg, 2000, Rashid et al., 2000, Moreno & Docampo, 2013, Rijal et al., 2020, Roberge et al., 2021). Polyphosphate sind auch ein Virulenzfaktor bei Parasiten wie

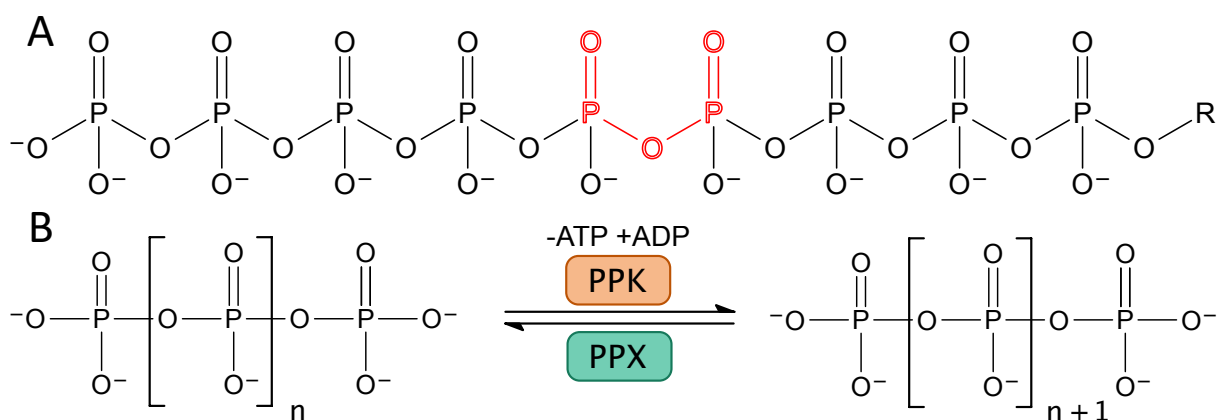


Abbildung 6 | **Struktur und Synthese bakterieller Polyphosphate**

**A** Struktur einer Polyphosphatkette und mit rot hervorgehobener Phosphoanhydridbindung. **B** Das bakterielle Enzym Polyphosphatkinase (PPK) katalysiert die Synthese von Polyphosphaten. Die terminale  $\gamma$ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) dient als Substrat für die Endkettenphosphorylierung der Polyphosphatkette zu Adenosindiphosphat (ADP). Der enzymatische Abbau wird in Bakterien durch das Protein Polyphosphatphosphatase (PPX) vermittelt.

*Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii* und Leishmania, und eine Verringerung der intrazellulären Polyphosphatkonzentration führt zu einer verminderten Pathogenität (Docampo & Moreno, 2011, Moreno & Docampo, 2013).

Bakterielle Polyphosphate interferieren auf verschiedene Weise mit der angeborenen Immunantwort des Wirts auf eine bakterielle Infektion. Langkettige Polyphosphate hemmen die Phagozytose in peritonealen Makrophagen, Neutrophilen und Monozyten (Roewe et al., 2020). Außerdem reduzieren langkettige Polyphosphate die Sekretion der Chemokine CC Motif Ligand (CCL)2 und CXC Motif Ligand (CXCL)10 sowie IFN $\beta$  in murinen Makrophagen (Roewe et al., 2020) und die LPS-induzierte Freisetzung von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, und IFN $\gamma$  in humanen Leukozyten (Pirttiniemi et al., 2023). Im Gegensatz dazu induzieren langkettige, aber nicht kurzkettige Polyphosphate die Freisetzung von CXCL4 in murinen Makrophagen (Roewe et al., 2022). In aus dem Knochenmark differenzierten Makrophagen können Polyphosphate nachteilig mit der durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) induzierten Transkriptomveränderung zum proinflammatorischen M1-Phänotyp interferieren. In Gegenwart von langkettigen Polyphosphaten wird ein eher entzündungshemmender M2-ähnlicher Phänotyp gefördert indem Hunderte von Typ-I-Interferon-induzierten Genen gehemmt werden (Roewe et al., 2020). Auch in humanen peripheren mononukleären Blutzellen werden Typ-I-Interferon induzierte Gene durch langkettige Polyphosphate reduziert (Pirttiniemi et al., 2023). Zudem wird auch die Phosphorylierung des an der Typ-I-Interferon-Signalkaskade beteiligte Protein STAT1 durch langkettige Polyphosphate gehemmt (Roewe et al., 2020, Pirttiniemi et al., 2023). Darüber hinaus reduzieren langkettige Polyphosphate die Expression von MHC-II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die für eine effektive Antigenpräsentation wichtig sind (Roewe et al., 2020). Ebenso hemmen langkettige Polyphosphate die Expression und Funktion der antimikrobiellen induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) (Harada et al., 2013, Roewe et al., 2020). Die Rezeptoren auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen, die bakterielle Polyphosphate binden und deren pleiotrope Effekte vermitteln, sind noch unbekannt. Für kurzkettige Polyphosphate wurde gezeigt, dass sie die biologische Funktion von Endothelzellen und Astrozyten im Säugetiergehirn über den purinergen Rezeptor P2Y1 und den Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) vermitteln (Holmström et al., 2013, Dinarvand et al., 2014). In P2Y1<sup>-/-</sup> und RAGE<sup>-/-</sup> murinen Makrophagen war die

Suppression der LPS-induzierten iNOS Expression durch langkettige Polyphosphate jedoch unabhängig von der Anwesenheit dieser Rezeptoren (Roewe et al., 2020). Auch die durch langkettige Polyphosphate induzierte Freisetzung von CXCL4 war in P2Y1<sup>-/-</sup> murinen Makrophagen unverändert (Roewe et al., 2022). Neben STAT1 beeinflussen Polyphosphate die intrazelluläre Signaltransduktion weiterer Signalwege, darunter die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase (PK) B in murinen Makrophagen (Roewe et al., 2022), das Hitzeschockprotein (HSP) 27 und p38 MAPK in der humanen Darmkrebszelllinie Caco2/BBE (Segawa et al., 2011), das Ziel des Rapamycins in Säugetieren (mTOR) und Glykogensynthase-Kinase (GSK)-3/Wnt/β-Catenin in Endothelzellen (Hassanian et al., 2016), Ras und PKB in *Dictyostelium discoideum* (Suess et al., 2017) und mTOR in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 (Wang et al., 2003).

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Polyphosphaten für die Resistenz und Virulenz von Bakterien sind Polyphosphate von therapeutischem Interesse. Dies betrifft einerseits die Inaktivierung bzw. den Abbau vorhandener Polyphosphate und andererseits die bakterielle Synthese mittels PPK. Eine Substanz, welche die Aktivität der PPK hemmt, ist der zugelassene Arzneistoff Mesalamin, der zur Behandlung der entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa eingesetzt wird. Mesalamin reduziert die Menge an Polyphosphaten im Stuhl der Patienten und verringert die Fähigkeit der Bakterien, Biofilme zu bilden und zu persistieren. Es wird vermutet, dass Mesalamin über diesen Mechanismus die bakterielle Besiedlung entzündeter Darmregionen reduziert und so zur Heilung von Schleimhautläsionen beiträgt (Dahl et al., 2017). Weitere PPK1-Inhibitoren wurden gegen uropathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) (Peng et al., 2020) und *Acinetobacter baumannii* (Gautam et al., 2021) getestet. Ein Inhibitor mit dual-spezifischen Eigenschaften gegen PPK1 und PPK2 wurde identifiziert und erfolgreich an *Klebsiella pneumoniae* und *Acinetobacter baumannii* getestet (Neville et al., 2021, Roberge et al., 2021). Auch die Reduktion der extrazellulären Polyphosphatkonzentration hat ein therapeutisches Potenzial. In einem Mausmodell der Sepsis wurden Mäusen intraperitoneal lebende *E. coli* Bakterien in Kombination mit der Polyphosphatphosphatase (PPX) verabreicht, die Polyphosphate enzymatisch abbaut. Bereits eine Einzeldosis PPX führt zu einer signifikant höheren Überlebenschance. Während die Kontrollgruppe eine Überlebenschance von 64% aufwies, starb keine der mit PPX behandelten Mäuse (Roewe et al., 2020). Die molekularen

Interaktionspartner, an die langkettige Polyphosphate binden, und die Mechanismen der Immunmodulation sind noch wenig erforscht.

### 3.5 Der protonenaktivierte Chloridionenkanal 1 (PACC1)

Chloridionen (Cl<sup>-</sup>) sind einfach negativ geladene Ionen und die häufigsten Anionen im tierischen Organismus. Sie sind an zahlreichen physiologischen und zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem an der Regulation des Blutdrucks, der elektrischen Erregbarkeit von Neuronen und Muskelzellen sowie der Regulation des pH-Wertes und des Zellvolumens. Im extrazellulären Raum, im Zytosol und in intrazellulären Organellen liegen unterschiedliche Chloridionenkonzentrationen vor. Chloridionen sind undurchlässig für biologische Membranen, was zu einem elektrochemischen Gradienten führt. Dieser setzt sich aus einem chemischen Konzentrationsgefälle auf beiden Seiten der Membran und einem elektrischen Gradienten aufgrund der negativen Ladung zusammen. Kanäle ermöglichen die passive Diffusion von Chloridionen entlang des elektrochemischen Potentials, während Antiporter die Bewegung von Chloridionen mit dem Transport anderer Ionen koppeln, um im Gegenzug einen neuen Gradienten aufzubauen (Jentsch et al., 2002, Duran et al., 2010). Aufgrund ihrer weitreichenden biologischen Bedeutung führen Defekte in Chloridionentransportern und -kanälen zu verschiedenen Erkrankungen. Diese Chloridionenkanalopathien umfassen unter anderem Myotonie, Hyperekplexie, Epilepsie, Osteoporose, lysosomale Speicherkrankheiten, Mukoviszidose, Taubheit und Nierenerkrankungen (Planells-Cases & Jentsch, 2009).

Chloridionenkanäle (ClC) sind keine funktionell und strukturell homogene Gruppe und es wird angenommen, dass noch nicht alle Chloridionenkanäle identifiziert wurden. Die Aktivierungsmöglichkeiten umfassen unter anderem spannungsabhängige Kanäle (Jentsch & Pusch, 2018), kalziumaktivierte Kanäle (Yang et al., 2008, Caputo et al., 2008), volumenregulierte Kanäle (Qiu et al., 2014, Voss et al., 2014) und säuresensitive Kanäle (Lambert & Oberwinkler, 2005). Letztere werden in fast allen Säugerzellen in der Plasmamembran oder im endosomalen System exprimiert (Lambert & Oberwinkler, 2005). Ein erst kürzlich identifizierter Chloridionenkanal ist der protonenaktivierte Chloridionenkanal 1 (PACC1). Zuvor war der nach Ansäuerung induzierte und nach außen gerichtete Chloridionenstrom in einer Vielzahl von Zellen beschrieben worden, aber die molekulare Ursache, die diesen Effekt vermittelt, war unbekannt. In zwei unabhängigen Studien konnte PACC1 in einem genomweiten kleinen interferierenden RNA (siRNA) Screening als molekulare Ursache für den

Chloridionenstrom nach extrazellulärer Ansäuerung identifiziert werden (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019). Dabei zeigt PACC1 eine Permeabilitätspräferenz von Thiocyanat (SCN<sup>-</sup>) > Iodid (I<sup>-</sup>) > Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) > Bromid (Br<sup>-</sup>) > Cl<sup>-</sup> (Ullrich et al., 2019).

Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen von PACC1 des Menschen und des Kugelfisches zeigen, dass es sich um ein trimeres Transmembranprotein handelt (Ruan et al., 2020, Deng et al., 2021, Wang et al., 2022a). PACC1 besitzt zwei Transmembrandomänen (TMD) pro Monomer, eine extrazelluläre Domäne (ECD) und eine Juxtamembranschnittstelle (JMI) zwischen diesen beiden Domänen. Die extrazelluläre Domäne ähnelt der Form einer Hand, bestehend aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die eine Handfläche, einen Finger und eine  $\beta$ -Ball-Domäne bilden, sowie einem Daumen aus  $\alpha$ -Helices (Osei-Owusu et al., 2022). Jedes Monomer besteht aus 350 Aminosäuren und hat eine Größe von 40 kDa. Sowohl der C- als auch der N-Terminus sind im Zytosol lokalisiert. PACC1 weist keine Sequenzhomologie zu anderen Membranproteinen auf und unterscheidet sich auch strukturell von allen anderen Chloridionenkanälen. PACC1 repräsentiert eine neue Familie von Chloridionenkanälen und ist das einzige Mitglied dieser Familie (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019). PACC1 ist in Vertebraten evolutionär stark konserviert. Insbesondere zwischen dem murinen und dem humanen Protein besteht eine hohe Sequenzhomologie von 90,6%. Konservierte Stellen für posttranslationale Modifikationen befinden sich am N-Terminus zur Phosphorylierung (Serin<sup>9,14,24</sup>, Tyrosin<sup>10</sup>) und zur Glykosylierung (Asparagin<sup>155,162</sup>) in der extrazellulären Domäne (<https://www.uniprot.org/>, Consortium, 2020) (**Abbildung 7**). Darüber hinaus ist für das humane PACC1 eine weitere Phosphorylierungsstelle (Serin<sup>7</sup>) beschrieben, die auch in anderen Vertebraten konserviert ist (Ordureau et al., 2020). Ebenso wurde eine Ubiquitinierungsstelle (Lysin<sup>227</sup>) für das humane Protein identifiziert (Emanuele et al., 2011, Beltrao et al., 2012, Akimov et al., 2018).

Je nach pH-Wert liegt PACC1 in drei verschiedenen Konformationen vor: Inaktiv, aktiv und desensibilisiert. Bei neutralem pH-Wert ist PACC1 inaktiv. Ab einem leicht sauren pH-Wert von ~6,0 beginnt sich das Protein zu öffnen mit einer maximalen Aktivierung bei ~4,5 (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019, Lambert & Oberwinkler, 2005, Capurro et al., 2015). Ein stark saurer pH-Wert von ~4,0 scheint zu einer Desensibilisierung und Inaktivierung der Ionendurchlässigkeit zu führen (Wang et al., 2022a). Der extrazelluläre pH-Wert für die halbmaximale Aktivierung hängt vom Zelltyp ab und steigt mit der Temperatur (Okada et al., 2021). Die ECD fungiert als

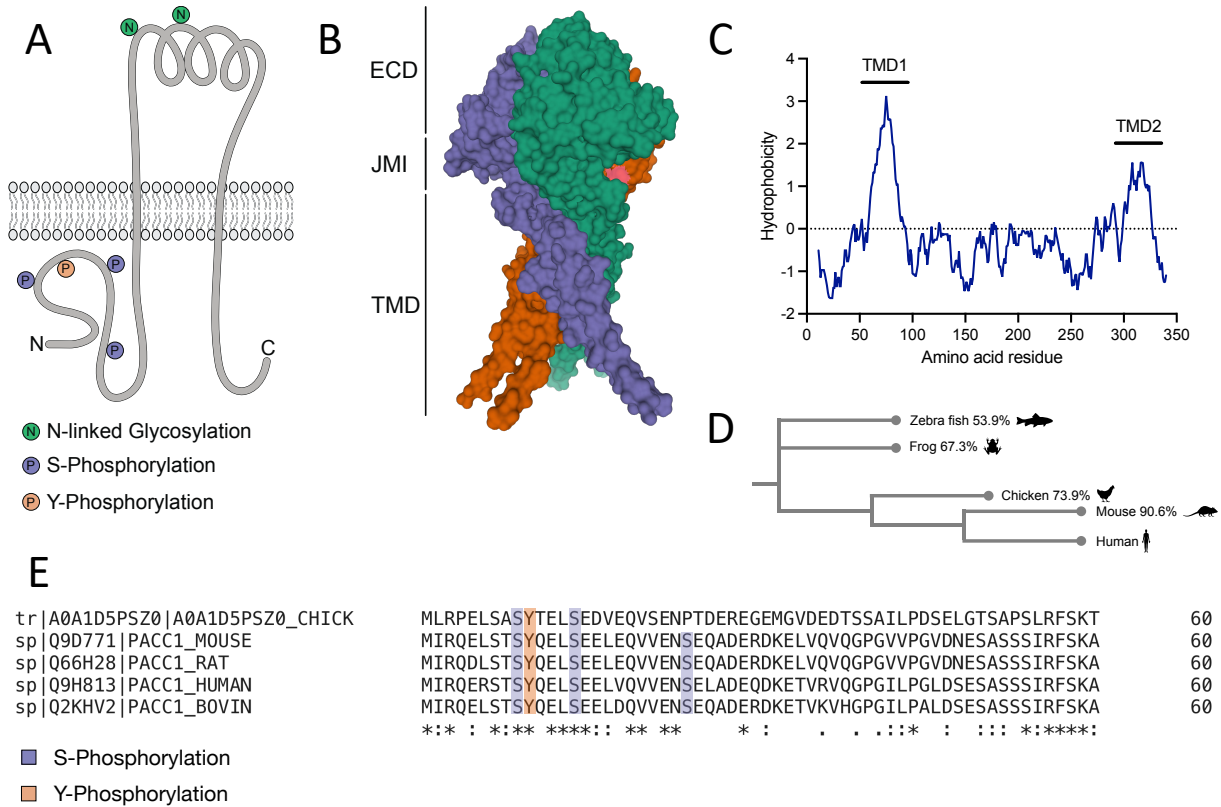


Abbildung 7 | **Struktur und Phylogenie von PACC1**

**A** Schematische Struktur des Maus PACC1 Proteins mit konservierten Aminosäuren für Phosphorylierung (Ser<sup>9,14,24</sup>, Tyrosin<sup>10</sup>) und Glykosylierung (Asparagin<sup>155,162</sup>) (Q9D771, <https://www.uniprot.org/>, Consortium, 2020). **B** Kristallstruktur von PACC1 entnommen aus der Protein Data Base (7JNA, [https://www.rcsb.org](https://www.rcsb.org/), Berman et al., 2000). PACC1 ist ein Trimer, bei dem jedes Monomer aus zwei Transmembrandomänen (TMD) und einer extrazellulären Domäne (ECD) besteht, die durch eine Juxtamembranschnittstelle (JMI) getrennt sind. **C** Die Analyse der Hydrophobizität von murinem PACC1 suggeriert zwei Transmembrandomänen. Berechnet mit ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>, Gasteiger et al., 2003) unter Verwendung der Hydrophobizitätsskala von Kyte & Doolittle. **D** Phylogenetischer Baum von PACC1 aus verschiedenen Wirbeltieren (Ähnlichkeit des Proteinsequenz-Alignments mit dem Menschen), erstellt mit dem ClustalW-Programm (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, Kanz et al., 2005). Mensch (*Homo sapiens*; NP\_060722.2), Maus (*Mus musculus*; NP\_080140.1; 90.6%), Huhn (*Gallus gallus*; XP\_419431.3; 73.9%), Zebrafisch (*Danio rerio*; NP\_001278691.1; 53.9%), Westlicher Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*; NP\_001072297.1; 67.3%). **E** Mehrfache Sequenzausrichtung von Proteinsequenzen, die mit dem ClustalW-Programm (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, Kanz et al., 2005) erstellt wurden, identifiziert konservierte Phosphorylierungsstellen. Mensch (*Homo sapiens*; Q9H813), Maus (*Mus musculus*; Q9D771), Ratte (*Rattus norvegicus*; Q66H28), Huhn (*Gallus gallus*; E1C5B3) und Bovin (*Bos taurus*; Q2KHV2).

Sensor für die pH-abhängige Aktivierung des Proteins, wobei der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Als möglicher zentraler Sensor wurde Histidin<sup>98</sup> vorgeschlagen, das bei niedrigem pH-Wert protoniert wird und dadurch intermolekulare Wechselwirkungen eingeht. Histidin bietet sich als pH-Sensor an, da der pKa-Wert des Imidazolrestes der Seitenkette nahe der Aktivierungsschwelle von PACC1 liegt (~6,0).

Die Protonierung von Histidin<sup>98</sup> führt zu einer Bewegung und schließlich zur Öffnung des Ionenkanals (Ruan et al., 2020). Ein anderer Vorschlag beschreibt ein Cluster von negativ geladenen Aminosäuren (Glutaminsäure<sup>107,249,250,257</sup>,

Asparaginsäure<sup>289,297</sup>), die bei niedrigem pH teilweise protoniert werden und intermolekulare Wechselwirkungen miteinander eingehen, die dann zu einer Konformationsänderung und Öffnung des Kanals führen (Wang et al., 2022a). Die molekulare Umlagerung der sechs TMD führt zur Öffnung von drei seitlichen Eingängen in die JMI entlang der zentralen Symmetrieachse. Im inaktiven Zustand sind die seitlichen Öffnungen zu eng, um hydrierte Chloridionen zu kanalisieren. Hydrophile und positiv geladene Aminosäuren flankieren die seitlichen Eintrittspforten und fördern den Durchfluss negativ geladener Chloridionen entlang eines Gradienten (Wang et al., 2022a). Nach der hydrophoben Pforte bilden hydrophobe Aminosäuren innerhalb des Kanals eine energetische Barriere für hydrierte Ionen und ermöglichen so eine effektive Kontrolle der Ionenselektivität (Aryal et al., 2015). Tryptophan<sup>304</sup> wurde als essentieller Bestandteil dieser hydrophoben Pforte an den drei seitlichen Eingängen des PACC1 Trimers identifiziert. Diese Aminosäure sorgt dafür, dass PACC1 bei neutralem pH geschlossen bleibt. Im Gegensatz dazu kontrolliert die hydrophobe Aminosäure Isoleucin<sup>307</sup> die Aktivität von PACC1 unter sauren Bedingungen (Cai et al., 2021). In einer neueren Studie wurden durch Mutagenese und anschließende funktionelle Untersuchungen neben Histidin<sup>98</sup> auch die Aminosäuren Histidin<sup>130,131</sup> und Asparaginsäure<sup>269</sup> als pH-Sensoren in der ECD identifiziert. Die Protonierung dieser Aminosäuren bei niedrigem extrazellulärem oder luminalem pH führt zur Ausbildung intermolekularer Kräfte, die zu strukturellen Veränderungen im Protein und schließlich allosterisch zur Öffnung des Ionenkanals führen (Osei-Owusu et al., 2022).

Der PACC1 vermittelte Einstrom von Chloridionen unter sauren Bedingungen führt zu osmotischer Zellschwellung und anschließendem Zelltod (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019). Säureinduzierter Zelltod wird als einer der zugrundeliegenden Mechanismen für den neuronalen Zelltod und damit für die Hirnschädigung während eines ischämischen Schlaganfalls angenommen (Rungta et al., 2015; Wemmie et al., 2013). Ein genetischer Defekt von PACC1 (PACC1<sup>-/-</sup>) in Mäusen und eine transiente Reduktion der *Pacc1* mRNA durch RNA-Interferenz in primären kortikalen Neuronen der Ratte verhindern den Chloridioneneinstrom nach extrazellulärer Ansäuerung und reduzieren das Ausmaß der Hirnschädigung bei ischämischem Schlaganfall (Yang et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2020). Transfektion und anschließende Überexpression in den Zelllinien HEK293 und HeLa zeigen eine Lokalisation von PACC1 in der

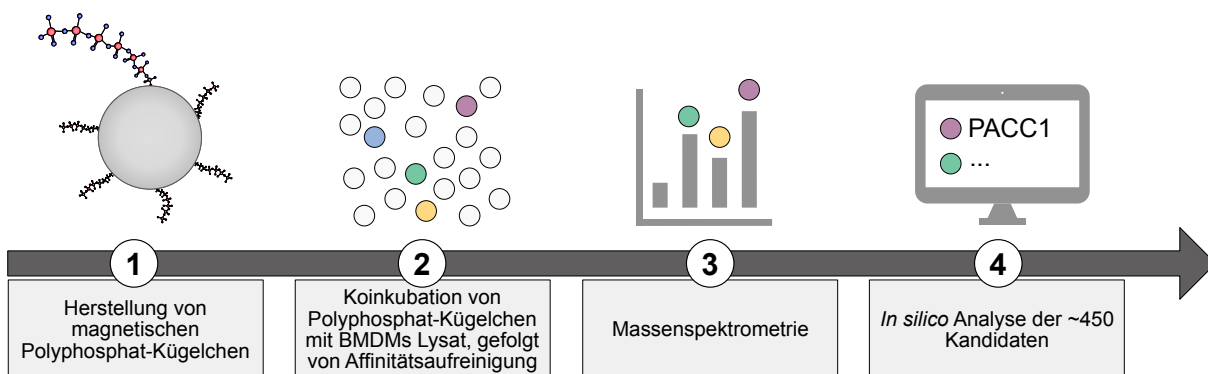
Plasmamembran und im endosomalen System (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2021). In murinen, aus dem Knochenmark differenzierten Makrophagen (BMDM) zeigt sich eine hohe Expression von PACC1 in der Plasmamembran, dem frühen Endosom und Phagosom, aber auch eine geringe Menge im späten Endosom und Lysosom (Zeziulia et al., 2022). PACC1 kann sich mit Hilfe des YxxL-Motivs zwischen der Plasmamembran, dem frühen Endosom und dem Recycling-Endosom bewegen. In den Endosomen reguliert PACC1 den luminalen pH-Wert und die Chloridionenkonzentration und damit die rezeptorvermittelte Transferrin-Endozytose (Osei-Owusu et al., 2021). In Makropinosomen ist PACC1 an der vesikulären Volumenreduktion beteiligt, indem es Chloridionen aus dem Lumen kanalisiert (Zeziulia et al., 2022). Eine mögliche Rolle spielt PACC1 auch als potentieller Biomarker in der Tumorbiologie. Verschiedene Studien zeigen eine erhöhte Expression von *Pacc1* in Darm-, Brust- und Leberkrebszellen (Kim et al., 2022, Chen et al., 2022, Wang et al., 2022b). Eine erhöhte Expression von *Pacc1* ist mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit Leberkrebs assoziiert (Zhang et al., 2020a). PACC1 könnte auch an der evolutionären Anpassung an Hypoxie beteiligt sein. In einer Exomsequenzierung tibetischer Hochlandbewohner wurde *Pacc1* als eines der Gene identifiziert, das die meisten Veränderungen im Vergleich zu Han-Chinesen aufweist, die traditionell eher auf Meereshöhe leben (Yi et al., 2010). Darüber hinaus unterliegt der *Pacc1* Locus auch einer stärkeren natürlichen Selektion bei tibetischen Schweinen im Hochland im Vergleich zu Dahe-Schweinen (Dong et al., 2014). Bei einer akuten Hepatitis C Infektion wurde *Pacc1* als eines der am stärksten hochregulierten Gene identifiziert (Papic et al., 2012). Die funktionelle Rolle von PACC1 im Immunsystem, insbesondere während einer Infektion, ist allerdings noch unbekannt.

PACC1 wird auch als Transmembranprotein 206 (TMEM206), säureempfindlicher nach außen gerichteter Anionenkanal (ASOR) oder protonenaktivierter nach außen gerichteter Anionenkanal (PAORAC) bezeichnet. In der Vergangenheit wurde das Gen nach seiner vorhergesagten Struktur benannt. Die neueste Gennomenklatur empfiehlt jedoch eine Benennung nach der Funktion des Proteins (Bruford et al., 2020), weshalb im Folgenden nur noch PACC1 verwendet wird.

## 4 Projekthintergrund

### PACC1 als ein potentieller Bindungspartner für langkettige Polyphosphate und Zielstruktur für Polyphosphat-vermittelte Effekte

PACC1 wurde in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] als Bindungspartner für langkettige Polyphosphate, wie sie auch in Bakterien vorkommen, identifiziert. Aus der Literatur und vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass langkettige Polyphosphate die angeborene Immunantwort von Makrophagen stören (Roewe et al., 2020). Das Ziel war es, die molekularen Bindungspartner von langkettigen Polyphosphaten zu identifizieren, die für die immunmodulatorischen Effekte in Makrophagen verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde eine Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Magnetische Kügelchen mit Streptavidin auf der Oberfläche wurden zusammen mit biotinyliertem Polyphosphat inkubiert, was zu einer Bindung zwischen Biotin und Streptavidin führte. Anschließend wurden diese Polyphosphat-Kügelchen zusammen mit lysierten BMDM inkubiert. Die Proben wurden mehrmals gewaschen und die Kügelchen magnetisch vom Überstand getrennt, der nicht an die Polyphosphate gebunden hatte. Eine massenspektrometrische Analyse der an die Polyphosphat-Kügelchen gebundenen Proteine ergab ca. 450 Treffer. Aus diesem Kandidatenpool wurde schließlich PACC1 ausgewählt, da für dieses Protein bisher keine immunologische Funktion beschrieben wurde und Daten aus bioinformatischen Datenbanken PACC1 als potentielle immunologische Funktion vorhersagten (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8 | Identifizierung polyphosphat-bindender Proteine**

Zur Herstellung Polyphosphat-Kügelchen wurden biotinylierte langkettige Polyphosphate mit Streptavidin-markierten magnetischen Kügelchen inkubiert, so dass eine Bindung zwischen Biotin und Streptavidin stattfand (1). Anschließend wurden die BMDM lysiert und zusammen mit den Polyphosphat-Kügelchen inkubiert. Proteine, die an langkettige Polyphosphate binden, wurden magnetisch und durch mehrfaches Waschen von den übrigen Zellbestandteilen getrennt (2). Die Proben wurden massenspektrometrisch untersucht (3) und die identifizierten Proteine bioinformatisch analysiert (4).

## **Bakterielle Polyphosphate haben eine immunmodulatorische Wirkung**

Bakterielle Polyphosphate sind Teil des bakteriellen Stoffwechsels und wurden in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] als immunmodulatorische Substanzen identifiziert. Beispielsweise ist die Phagozytose von Bakterien und die Produktion von iNOS in Makrophagen im Beisein von langkettigen Polyphosphaten (wie sie auch in Bakterien vorkommen) reduziert. Zudem modulieren Polyphosphate auch das Transkriptom von Makrophagen, indem sie mit der LPS-induzierten Polarisierung zu einem proinflammatorischen, antibakteriellen Phänotyp interferieren, indem sie die Expression von hunderten Typ-I-Interferon assoziierten Genen reduzieren. In einem murinen Sepsismodell war zudem die Überlebenswahrscheinlichkeit größer, wenn rekombinate PPX injiziert wurde, die Polyphosphate enzymatisch abbauen kann (Roewe et al., 2020). Es ist bisher wenig erforscht, ob bakterielle Polyphosphate auch eine Rolle in anderen immunologischen Kontexten als der bakteriellen Sepsis spielen könnten. Es ist auch nicht bekannt, welche Auswirkungen sie auf andere Zelltypen als Makrophagen haben könnten.

## 5 Ziel der Arbeit

### Immunphänotypisierung von PACC1 während einer bakteriellen Infektion

Langkettige Polyphosphate sind bakterielle Stoffwechselprodukte, die in die angeborene Immunantwort des Wirtes eingreifen (Roewe et al., 2020). Der Chloridionenkanal PACC1 wurde von der Arbeitsgruppe von [REDACTED] als Bindungspartner dieser langkettigen Polyphosphate entdeckt. PACC1 wird bei einem sauren pH-Wert von 5,5 aktiviert (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019), wie er beispielsweise im Phagolysosom von Phagozyten vorliegt. Durch die Bindung von bakteriellen Polyphosphaten an PACC1 könnte die Immunantwort des Wirtes zum Vorteil der Pathogene moduliert werden. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Effekte bakterielle Polyphosphate durch die Bindung an PACC1 vermitteln und welche Rolle PACC1 im größeren Bild der Wirt-Pathogen-Interaktion spielt.

Unter physiologischen Bedingungen ist der extrazelluläre pH-Wert theoretisch nur in bestimmten Organen wie dem Magen, der Haut und der Vagina sauer genug, um PACC1 zu aktivieren (Okada et al., 2021). Eine Reihe pathologischer Zustände ist ebenfalls durch einen sauren pH-Wert gekennzeichnet, der PACC1 aktivieren könnte, z. B. das Mikromilieu eines soliden Tumors (Boedtkjer & Pedersen, 2020), eine Infektion (Lardner, 2001) oder ein ischämischer Schlaganfall (Xiong et al., 2004). Die Aktivierung von PACC1 wurde bisher nur während eines ischämischen Schlaganfalls beschrieben, wo PACC1 den säureinduzierten Zelltod von Neuronen durch Chloridioneneinstrom und osmotisches Anschwellen fördert (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019). Diese Beobachtung erscheint als Erklärung für die physiologische Rolle von PACC1 allerdings kontraintuitiv (Yang et al., 2019). PACC1 ist stark konserviert, würde aber das Überleben kritischer Zellen wie Neuronen negativ beeinflussen und damit die Fitness des Organismus reduzieren. Zwar sinkt die Aktivierungsschwelle mit steigender Temperatur von ca. pH 5,5 bei Raumtemperatur auf ca. pH 6,0 bei 37 °C (Sato-Numata et al., 2013, Sato-Numata et al., 2014), diese Eigenschaft erklärt jedoch nicht die Orthologe von PACC1 in ektothermen Organismen wie Reptilien, Amphibien und Fischen. Die evolutionär konservierte physiologische Rolle von PACC1 unterscheidet sich daher wahrscheinlich von der beschriebenen Beteiligung am säureinduzierten Zelltod während eines Schlaganfalls. Unter nicht-pathologischen Bedingungen ist nur der pH-Wert in intrazellulären Vesikeln des

endosomalen Systems sauer genug (Mindell, 2012, Stauber & Jentsch, 2013), um PACC1 zu aktivieren, wo PACC1 an der Regulation des endosomalen pH beteiligt ist (Osei-Owusu et al., 2021).

Die Kontrolle des vesikulären luminalen pH spielt eine wichtige Rolle bei einer Reihe von zellulären Prozessen, einschließlich der Immunantwort. Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen phagozytieren extrazelluläre Pathogene wie Bakterien und Pilze und schließen sie in Phagosomen ein. Das Phagosom wird schrittweise angesäuert und fusioniert schließlich mit dem Lysosom zum Phagolysosom. In diesem Kompartiment wird der phagozytierte Erreger chemisch und enzymatisch zerstört und eine Immunantwort eingeleitet. Die phagolysosomale Ansäuerung ist wichtig für den Abbau phagozytierter Pathogene und eine effektive Antigenpräsentation (**Abbildung 9A**) (Neeffes et al., 2011). Als Teil der antimikrobiellen Immunantwort produzieren Phagozyten wie Neutrophile und Makrophagen große Mengen an ROS, um phagozytierte Mikroben im Phagolysosom zu zerstören. Die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidase katalysiert die Reaktion von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) zum Sauerstoffradikal Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), das wiederum spontan zu

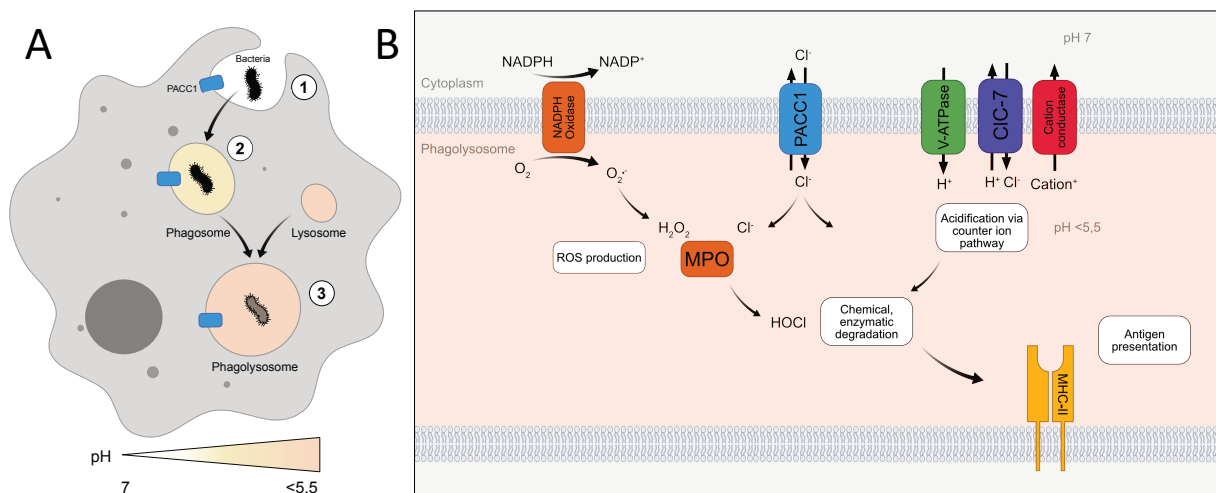


Abbildung 9 | **Hypothese zur Rolle von PACC1 in der frühen Immunantwort des Wirts auf eine Infektion**

**A** Phagozyten erkennen Krankheitserreger, welche anschließend internalisiert werden. Durch Einstülpung der Plasmamembran entsteht ein Phagosom (1). Das Phagosom reift durch schrittweise Ansäuerung und Fusion mit anderen endosomalen Vesikeln (2). Durch die Fusion mit dem Lysosom entsteht das Phagolysosom, in dem der Erreger eliminiert und eine Immunantwort ausgelöst wird (3). **B** Die luminalen Ansäuerung könnte unter Beteiligung des pH-aktivierten Chloridkanals PACC1 als Teil des Gegenionenstroms ablaufen. Dieser wird durch den Protoneneinstrom über die V-ATPase unterstützt, die Protonen aus dem Zytosol gegen einen elektrochemischen Gradienten in das Lysosom pumpt. Um eine ausreichende lysosomale Ansäuerung zu erreichen, ist die Aufrechterhaltung der Elektroneutralität in diesem Kompartiment notwendig, so dass der parallele Ausstrom von Kationen über Konduktasen und der Einstrom von Chloriden über z. B. CIC-7 und PACC1 diesen Gegenionenstrom bedingen. Die Kontrolle des phagolysosomalen pH ist wichtig für die Elimination phagozytierter Pathogene und für die Antigenpräsentation. Darüber hinaus könnte PACC1 an der Produktion von ROS durch die MPO beteiligt sein, die Chlorid als Substrat für die Produktion von antimikrobiellem HOCl benötigt. Modifiziert nach Lambeth, 2004.

Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reagieren kann. Die luminale Myeloperoxidase (MPO) bildet aus Chloridionen und Wasserstoffperoxid Hypochlorige Säure (HOCl) (Lambeth, 2004) (**Abbildung 9B**).

Die lysosomale Ansäuerung wird durch die V-ATPase vermittelt, die durch Hydrolyse von ATP Protonen ( $\text{H}^+$ ) aus dem Zytosol in das Lumen des Lysosoms importiert. Durch die Akkumulation positiv geladener Protonen entsteht ein elektrochemischer Gradient, der den weiteren Protonenimport und damit die weitere Ansäuerung des Lumens reduziert. Im Konzept des Gegenionenstroms ermöglicht der parallele Abfluss positiv geladener Kationen und der Import negativ geladener Anionen die volle Entfaltung der lysosomalen Ansäuerung durch Kompensation des elektrochemischen Potentials (DiCiccio & Steinberg, 2011). Aufgrund seiner Aktivierungsschwelle bei niedrigem pH-Wert und seiner Funktion als Chloridionenkanal könnte PACCC1 an der Ansäuerung des Phagolysosoms als Teil des Gegenionenstroms (**Abbildung 9B**) und damit an der Initiierung der Immunantwort beteiligt sein. Diese umfasst den Abbau phagozytierter Erreger, die Antigenpräsentation und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Ziel dieser Arbeit ist die Phänotypisierung von PACCC1 in der frühen Immunantwort des Wirtes auf eine Infektion und welche immunmodulierenden Effekte durch die Bindung bakterieller Polyphosphate vermittelt werden.

## Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung bakterieller Polyphosphate auf die Darmimmunität

Der Darm beherbergt in seinem Lumen in unmittelbarer Nähe zu den Immunzellen der Darmschleimhaut ein vielfältiges Repertoire an Bakterien. Das Mikrobiom spielt eine grundlegende Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase, und ein Ungleichgewicht zwischen dem Mikrobiom und der intestinalen Immunantwort wird mit der Pathogenese verschiedener Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht (Abraham & Cho, 2009). Die Zusammensetzung des Mikrobioms wird durch die intestinale Immunantwort und die Ernährung bestimmt und umgekehrt beeinflusst das Mikrobiom und seine Stoffwechselprodukte die Entwicklung und Funktion der Darmimmunität (Honda & Littman, 2016). Beispielsweise fördert das bakterielle Stoffwechselprodukt Butyrat, eine kurzkettige Fettsäure, die Bildung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) im Darm (Arpaia et al., 2013, Furusawa et al., 2013). Langkettige Polyphosphate sind ebenfalls ein wichtiges Stoffwechselprodukt von Bakterien, aber ihr Einfluss auf die Darmimmunität des Wirtes ist noch nicht ausreichend erforscht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die immunmodulatorischen Effekte von bakteriellen Polyphosphaten auf die Darmimmunität im Rahmen der Wirt-Pathogen-Interaktion zu untersuchen (Abbildung 10).

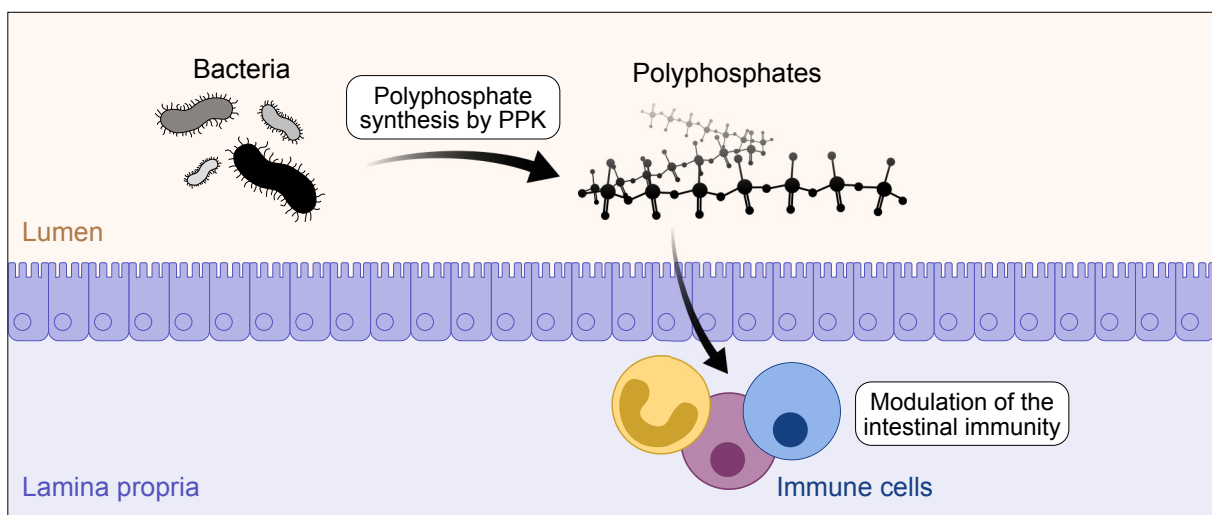


Abbildung 10 | Hypothese zur immunmodulatorischen Wirkung bakterieller Polyphosphate auf die intestinale Immunantwort

Das intestinale Mikrobiom und die intestinale Immunantwort beeinflussen sich gegenseitig. Bakterien besiedeln das Darmlumen und verstoffwechseln die aufgenommene Nahrung. Immunzellen in der Lamina propria befinden sich in enger räumlicher Nähe zu den Darmbakterien und ihren Stoffwechselprodukten. Der bakterielle Metabolit Polyphosphat könnte immunmodulatorische Eigenschaften auf die intestinalen Immunzellen besitzen.

## 6 Materialien

### 6.1 Reagenzien

Name	Anbieter	Katalognummer
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs	N3232S
2-Deoxy-D-glucose	Sigma-Aldrich	D6134
7-AAD	BioLegend	420403
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs	N3231L
Agarose	Biozym	840004
AMPure XP Kügelchen	Beckman Coulter	A63881
Antimycin A, <i>Streptomyces sp.</i>	Sigma-Aldrich	A8674
BSA	Sigma-Aldrich	A7409
Chloroform	AppliChem	A3633
Collagenase D	Roche Diagnostics	11088882001
cOmplete EDTA-freies Proteaseinhibitorcocktail	Roche	4693132001
CountBright Absolute Zählkügelchen	Invitrogen	C36950
D-(+)-glucose	Sigma-Aldrich	G8769
Digitonin	ThermoFisher	BN2006
Dispase II	Gibco	17105041
DMSO	Sigma-Aldrich	D8418
DNase I	AppliChem	A3778
DreamTaq grün PCR Mastermix	Thermo Scientific	K1082
DTT	Sigma-Aldrich	646563
eBioscience Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff (FVD) eFluor 780	Invitrogen	65-0865-14
EDTA	AppliChem	A3145
Ethanol	Honeywell	RD32205
FBS	Sigma-Aldrich	F0926
FCCP	Sigma-Aldrich	C2920
Hefeextrakt, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich	70161
Hydrochloridlösung, pH 7,4	Sigma-Aldrich	T2194
L-Glutamin	Gibco	25030024
Luria Bouillon nach Miller	Carl Roth	X968.2
Ketamin	Hameln Pharma	32265.00.00
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich	M1028
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	59222C
Natriumcitrat	Carl Roth	4088,3
Natriumhydroxid	Merck Millipore	1091361000
Nonidet P40 Ersatz	Sigma-Aldrich	74385

Name	Anbieter	Katalognummer
Oligofectamin Transfektionsreagenz	Invitrogen	12252-011
Oligomycin, <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Sigma-Aldrich	O4876
OptiPrep Dichtegradientmedium	Sigma-Aldrich	D1556
Ovalbumin, <i>Gallus gallus</i>	Sigma-Aldrich	A7641
Ovalbumin <sub>323-339</sub> Peptid, <i>Coturnix japonica</i>	Sigma-Aldrich	O1641
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
pHrodo grün <i>E. coli</i> BioParticles Konjugat	Invitrogen	P35366
Powerup SYBR grün Mastermix	Applied Biosystems	A25741
Pyruvat	Sigma-Aldrich	107360
RNase inhibitor	Sigma-Aldrich	3335399001
Rotenone	Sigma-Aldrich	R8875
ROTI GelStain	Carl Roth	3865.1
Todd Hewitt Bouillon	Sigma-Aldrich	T1438
TRIzol LS	Invitrogen	10296010
Trypsin-EDTA	Gibco	25200-072
Trypanblau	Corning	25-900-CI
UltraComp eBeads Kompensationskügelchen	Invitrogen	01-2222-42
Xylazin	Bayer	6293841.00.00

## 6.2 Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Spezies	Isotyp	Klon	Anbieter	Katalognummer
CD3	APC	Ratte	IgG2b, κ	17A2	BioLegend	100236
CD3	AF488	Ratte	IgG2b, κ	17A3	BioLegend	100212
CD4	PE	Ratte	IgG2a, κ	RM4-5	BioLegend	100511
CD4	BV711	Ratte	IgG2a, κ	RM4-5	BioLegend	100557
CD4	PerCP	Ratte	IgG2a, κ	RM4-5	BioLegend	100537
CD8α	APC	Ratte	IgG2a, κ	53-6.7	BioLegend	100711
CD8α	APC/Fire 750	Ratte	IgG2a, κ	53-6.7	BioLegend	100765
CD11b	Pacific Blue	Ratte	IgG2b, κ	M1/70	BioLegend	101223
CD11b	PE-Cy7	Ratte	IgG2b, κ	M1/70	BioLegend	101215
CD11c	AF488	Armenischer Hamster	IgG	N418	BioLegend	117313
CD11c	PE-Cy7	Armenischer Hamster	IgG	N418	BioLegend	117318
CD16/32	-	Ratte	IgG2a, λ	93	BioLegend	101320
CD19	PerCP/Cy5.5	Ratte	IgG2a, κ	6D5	BioLegend	115533
CD19	Pacific Blue	Ratte	IgG2a, κ	6D5	BioLegend	115526

Antigen	Fluorochrom	Spezies	Isotyp	Klon	Anbieter	Katalognummer
CD25	FITC	Ratte	IgG1, λ	PC61	BioLegend	102005
CD25	PE-Cy7	Ratte	IgG1, λ	PC61	BioLegend	102015
CD45	AF488	Ratte	IgG2b, κ	30-F11	BioLegend	103121
CD69	BV510	Armenischer Hamster	IgG	H1.2F3	BioLegend	104531
CD80	PE	Armenischer Hamster	IgG	16-10A1	BioLegend	104707
CD86	FITC	Ratte	IgG2a, κ	GL-1	BioLegend	105005
F4/80	APC	Ratte	IgG2a, κ	BM8	BioLegend	123115
Ly6C	APC	Ratte	IgG2a, κ	1A8	BioLegend	127613
Ly6C	BV421	Ratte	IgG2c, κ	HK1.4	BioLegend	128031
Ly6G	PE	Ratte	IgG2a, κ	1A8	BioLegend	127607
Ly6G	PE-Cy7	Ratte	IgG2c, κ	HK1.4	BioLegend	128007
MHC-II (I-A/I-E)	PerCP	Ratte	IgG2b, κ	M5/114.15.2	BioLegend	107623
NK1.1	APC	Maus	IgG2a, κ	PK136	BioLegend	108709
SiglecF	BV421	Ratte	IgG2a, κ	E50-2440	BD Biosciences	562681
STAT1 pY705	PE	Maus	IgG2a, κ	4a	BD Biosciences	612564
TCRβ	BV510	Armenischer Hamster	IgG	H57-597	BioLegend	109233

### 6.3 Stimulantien

Agonist	Anbieter	Katalognummer
Zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (cGAMP)	InvivoGen	tIrl-nacga
CpG Oligonukleotide (ODN)	InvivoGen	tIrl-2395
Doppelstrang-DNA (dsDNA), <i>Escherichia coli</i> K12	InvivoGen	tIrl-ecdna
Rekombinantes IL-27, <i>Homo sapiens</i>	PeproTech	200-38
Kurzkettige Polyphosphate (S-polyP) mit einer Modallänge von 75 (45 bis 160 Phosphate)	Kerafast	EUI005
Langkettige Polyphosphate (L-polyP) mit einer Modallänge von 700 (~200 bis 1.300 Phosphatemonomere)	Kerafast	EUI004
Lipopolysaccharide (LPS), <i>Escherichia coli</i> O111:B4	Sigma-Aldrich	L26300
Peptidoglycan (PGN), <i>Escherichia coli</i> O111:B4	InvivoGen	tIrl-pgneb
Poly(I:C)	InvivoGen	tIrl-pic
Rekombinantes Interferon (IFN)β, <i>Mus musculus</i>	Pbl Assay Science	12405-1
Rekombinantes Interferon (IFN)γ, <i>Mus musculus</i>	PeproTech	315-05
Zymosan, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	InvivoGen	tIrl-zyn

## 6.4 Kits

Name	Anbieter	Katalognummer
Agilent Seahorse XFe96 Extracellular Flux Assay Kit	Agilent Technologies	102601-100
ATAC-Sequenzierungskit	Diagenode	C01080002
Chromium Next GEM Chip J Single Cell Kit	10xGenomics	1000230
Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Reagent Bundle	10xGenomics	1000285
Zytokine & Chemokine 26-Plex Maus ProcartaPlex Panel 1	Invitrogen	EPX260-26088-901
ELISA MAX Standard Set Mouse IFN- $\gamma$	BioLegend	430801
Griess Reagenz Kit	Invitrogen	G7921
LIVE/DEAD BacLight Bakterien Viabilitäts- und Zählerkit	Invitrogen	L34856
Makrophagen Isolationskit (Peritoneum) Maus	Miltenyi Biotec	130-110-434
Maxima H Minus cDNA Synthese Mastermix	Thermo Scientific	M1662
NucleoSpin Soil, Mini kit for DNA from soil	Macherey-Nagel	740780,50
Pan T-Zellen Isolationkit II Maus	Miltenyi Biotec	130-095-130
Phagoburst	BD	341058
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23227
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74136
Single Index Kit N Set A	10xGenomics	1000212
UDI for tagmented libraries	Diagenode	C01011034

## 6.5 Puffer und Medien

Name	Anbieter	Katalognummer
ACK Lysepuffer	Gibco	A10492-01
DMEM	Sigma-Aldrich	D5030
Fixierungspuffer	BD Biosciences	554655
HEPES	Gibco	15630080
HBSS	Gibco	14175095
IMDM	Gibco	12440053
PBS	Gibco	10010023
Permeabilisierungs-/Waschpuffer	BD Biosciences	554723
Permeabilisierungspuffer III	BD Biosciences	558050
RPMI 1640	Gibco	12633012
TAE-Puffer	AppliChem	A1691

## 6.6 Mäusstämme

Stamm	Offizieller Name	Beschreibung	Anbieter	Katalognummer
Nur77 <sup>GFP</sup>	C57BL/6-Tg(Nr4a1-EGFP/cre)820Khog/J	Die Expression des grün fluoreszierendes Proteins (GFP) steht unter der Kontrolle des Nur77 Promoters	Jackson Laboratory	016617
OT-II	B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J	Die $\alpha$ und $\beta$ -Kette des T-Zellen-Rezeptors ist spezifisch für das Hühner Ovalbumin <sub>323-339</sub> Peptid	Jackson Laboratory, [Redacted] (Universitätsmedizin Mainz)	004194
OT-II x Nur77 <sup>GFP</sup>		Die Nur77 <sup>GFP</sup> Fluoreszenz korreliert positiv mit der Induktionsstärke des T-Zellen-Rezeptors	Interne Zucht	-
PACC1 <sup>-/-</sup>	C57BL/6J-Tmem206 <sup>em1Bosm</sup>	Homozygote Defizienz des <i>Pacc1</i> Gens	Interne Zucht	-
WT	C57BL/6JRj C57BL/6J C57BL/6N	Wildtyp, spezifisch pathogenfrei Wildtyp, spezifisch pathogenfrei Wildtyp, keimfrei	Janvier, Jackson Laboratory, [Redacted] (Universitätsmedizin Mainz)	000664

## 6.7 Bakterien

Name	Stamm	Beschreibung	Anbieter
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	BAA-334	Kapsel Serotyp 4	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	MG1655	Wildtyp	[Redacted] (University of Michigan)
$\Delta$ <i>ppK Escherichia coli</i>	MJG224	<i>Escherichia coli</i> mit einem Defekt im <i>Ppk1</i> Gen, das für die Produktion bakterieller Polyphosphate essentiell ist. Ein <i>Ppk2</i> Gen ist nicht vorhanden.	[Redacted] (University of Michigan)

## 6.8 Zelllinien

Zelle	Anbieter	Katalognummer
L-929 Fibroblast, <i>Mus musculus</i>	ATCC	CCL-1

## 6.9 Primer

Gen	Orientierung	Sequenz 5' → 3'	Anbieter
qPCR			
<i>Gapdh</i>	Vorwärts	TACCCCAATGTGTCCGTCGTG	IDT
	Rückwärts	CCTTCAGTG GGCCCTCAGATGC	IDT
<i>Pacc1</i> Exons 2/3	Vorwärts	CGAGGAGTTGGAGCAGGTGGTTG	IDT
	Rückwärts	TGTAAGACACGGACATGACAGGGTG	IDT
<i>Pacc1</i> Exons 3/4	Vorwärts	AGTCCGCCTCCAGCAGCATC	IDT
	Rückwärts	TGCAGTTCCTGTCTCCCGGCTG	IDT
<i>Pacc1</i> Exons 5/6	Vorwärts	TGTCCAGGGGCCCCAGGAAG	IDT
	Rückwärts	ACAGCTTCTCGCCCGTCCTC	IDT
<i>Pacc1</i> Exons 7/8	Vorwärts	AGCCGAGAGGAGTGCTCAGTTG	IDT
	Rückwärts	TGTCGCCTGGCCTCTCCG	IDT
Genotypisierung			
<i>Pacc1</i> Exons 7/8	Vorwärts (Intron 1)	TCTCCCTCACTGCTCATCGA	IDT
	Rückwärts (Exon 2)	TCCGAGTTCTCAACCACCTGC	IDT
	Rückwärts (Intron 2)	AGCTTTAGAACCGGGCAGAC	IDT
<i>Ppk1</i>	Vorwärts	TACGCTGCCGACGAGTAA	IDT
	Rückwärts	CGCGTCATTGCCTCTTCA	IDT

## 6.10 Software

Name	Beschreibung	Anbieter
Affinity Designer	Abbildungen	Serif
FlowJo	Analyse der Durchflusszytometrie	BD Biosciences
Image Lab	PCR Analyse	Bio-Rad
Magellan	Plattenlesegerät Analyse	Tecan
NanoDrop 2000/2000c	Spektrophometer Analyse	Thermo Scientific
Prism	Statistik und Graphen	Graphpad
QuantStudio	qPCR Analyse	Applied Biosystems
Seahorse Wave	Metabolismus Analyse	Agilent Technologies

## 6.11 Instrumente

Name	Beschreibung	Anbieter
Attune NxT	Durchflusszytometer	Invitrogen
FACSAria II	Durchflusszytometer	BD Biosciences
FACSCanto II	Durchflusszytometer	BD Biosciences
Gel Doc EZ	Bildgebungssystem, PCR	Bio-Rad
Infinite M Nano	Plattenlesegerät, Spektrum	Tecan
LSR II	Durchflusszytometer	BD Biosciences
Mastercycler Nexus	Thermozykler, PCR	Eppendorf
MoFlo Astrios	Durchflusszytometer	Beckman Coulter
NanoDrop 2000/2000c	Spektrophotometer, RNA	Thermo Scientific
QuantStudio 3	Thermozykler, qPCR	Applied Biosystems
Seahorse XFe96	Plattenlesegerät, Metabolismus	Agilent Technologies
Spectramax i3	Plattenlesegerät, Spektrum	Molecular Devices

## 6.12 Laborutensilien

Name	Anbieter	Katalognummer
0,1 µm Filter	Corning	431475
0,22 µm Filter	Merck	SLGVV255F
5 mL Röhrchen, runder Boden	Falcon	352052
18G x 31,75 mm Nadel mit Katheter	Exel International	26735
20G x 40 mm Nadel	BD Biosciences	305176
23G x 40 mm Nadel	BD Biosciences	305194
26G x 10 mm Nadel	BD Biosciences	305110
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	Fisher	FB012937
182 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	Fisher	FB012940
∅10 cm Zellkulturschale	Thermo Scientific	150318
Intubationsständer	Bioseb	RIS-100
LS Säule	Miltenyi Biotec	130-042-401
MS Säule	Miltenyi Biotec	130-042-201
qPCR-Platte, 96-Well	Applied Biosystems	4483352
Seahorse XF Kalibrierungslösung	Agilent Technologies	100840-000

---

Name	Anbieter	Katalognummer
Seahorse XFe96 Zellkulturplatte	Agilent Technologies	101085-004
Zellabweisende Platte, 6 Well, flacher Boden	Greiner Bio-One	657970
Zellabweisende Platte, 24 Well, flacher Boden	Greiner Bio-One	662970
Zellabweisende Platte, 96 Well, flacher Boden	Greiner Bio-One	655970
Zellschaber	Fisher	08-100-240

## 7 Methoden

Alle genehmigungspflichtigen Tierversuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz und das Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) der Boston University genehmigt. Nicht genehmigungspflichtige Versuche zur Organentnahme wurden den Behörden angezeigt. Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen mit einer Luftfeuchtigkeit von 45-60%, einer Umgebungstemperatur von  $22 \pm 2$  °C, einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Keimfreie und monokolonisierte Mäuse wurden in sterilen Isolatoren der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten.

### 7.1 Genotypisierung

Der Genotyp der genetisch veränderten Mäuse wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Dabei handelt es sich um eine molekularbiologische Amplifikation des veränderten Bereichs der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die Ohrbiopsien der Mäuse wurden von den Tierpflegern entnommen. Zur Extraktion der DNA aus dem Gewebe wurden die Ohrbiopsien mit 40 µL Lysepuffer (vollentsalztes Wasser + 25 mM NaOH + 0,2 mM EDTA, pH 12, autoklaviert) behandelt und für 20 Minuten bei 95 °C und 300 rpm inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 40 µL Neutralisationspuffer (vollentsalztes Wasser + 40 mM Tris-HCL, pH 5, autoklaviert) gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Für jeden PCR-Lauf wurde ein Reaktionsansatz hergestellt. Dieser setzte sich pro Reaktion wie folgt zusammen:

Komponenten	Volumen [µL]	Final
DreamTaq grün PCR Mastermix	12,5	1X
Vorwärtsprimer	0,1	0,2 µM
Rückwärtsprimer	0,1	0,2 µM
DMSO	0,25	1% (v/v)
DNA	2	
Nukleasefreies Wasser	10	
<b>Total</b>	<b>25</b>	

Die PCR wurde in einem Thermozykler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]
I	1	94	04:00
		94	00:30
II	40	58,8	00:30
		72	01:00
III	1	72	05:00
IV	1	8	∞

Die Auswertung der Genotypisierungen erfolgte mittels qualitativer Agarosegelelektrophorese. Dazu wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel (TAE-Puffer + 2% (w/v) Agarose + 5% (v/v) ROTI GelStain) aufgetragen und elektrophoretisch nach Größe und Ladung aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend unter UV-Licht visualisiert und mit der Software Image Lab (Bio-Rad) analysiert.

## 7.2 Kultivierung von L929-Zellen und Herstellung von L929-konditioniertem Medium

Für die Differenzierung von Makrophagen aus Knochenmarkszellen wird der Monozytenkolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) benötigt, der unter anderem von der murinen Fibroblastenzelllinie L929 produziert wird. Im Überstand von L929-Zellen finden sich neben M-CSF über 2.000 weitere Proteine, welche die Differenzierung beeinflussen können, darunter Osteopontin, der Makrophagen-Inhibitionsfaktor (MIF) sowie CCL2 und CCL7 (Heap et al., 2021). Dazu wurden kryokonservierte L929-Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes RPMI 1640 Medium überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (500 rcf, 5 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtem RPMI 1640 Medium (+ 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, steril filtriert) resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 85-95% inkubiert (37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit). Eine Woche nach dem Auftauen wurde die Produktion von L929-konditioniertem Medium hochskaliert. Die adhärennten Fibroblasten wurden durch enzymatischen

Trypsinverdau der Adhäsionsproteine entfernt, indem der Überstand abgenommen, die Zellen einmal mit vorgewärmter PBS gewaschen und mit einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung behandelt wurden. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von vorgewärmtem Medium mit Serumanteil (enthält  $\alpha$ 1-Antitrypsin) gestoppt und eine Einzelzellsuspension durch Pipettieren hergestellt. Die Zellsuspension wurde dann in 182 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt und für eine Woche inkubiert, bis eine Konfluenz von 85-95% erreicht war. Der Überstand wurde steril filtriert und bei -80 °C gelagert.

### **7.3 Generierung von Makrophagen aus Knochenmarkszellen**

Für die Generierung von Makrophagen aus Knochenmarkszellen wurden die Mäuse schmerzfrei euthanasiert und Tibia und Femur präpariert. Die Knochen wurden für 30 Sekunden in 70% Ethanol desinfiziert und anschließend in kaltem PBS gewaschen. Tibia und Femur wurden an beiden Enden mit einer Knochenschere geöffnet und das Knochenmark mit einer 24G Nadel und kaltem PBS ausgewaschen. Das Knochenmark wurde durch ein angefeuchtetes 100  $\mu$ m Filter filtriert und die Suspension zentrifugiert (500 rcf, 5 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in vorgewärmtem RPMI 1640 Medium (+ 30% (v/v) L929-konditioniertes Medium + 20% (v/v) FBS + 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, steril filtriert) resuspendiert und in eine Ø10 cm Zellkulturplatte überführt. Die Zellen wurden eine Woche lang inkubiert (37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 95% relative Luftfeuchtigkeit), bis die Knochenmarkszellen vollständig zu Makrophagen differenziert waren. Die Morphologie der Zellen wurde lichtmikroskopisch untersucht. Zur Ablösung der adhären Zellen wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und für 5 Minuten in kaltem PBS mit 0,5 mM EDTA inkubiert. Um die Integrität der Oberflächenproteine nicht durch einen enzymatischen Verdau zu beeinträchtigen, wurden die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst.

### **7.4 Bestimmung der Zellkonzentration**

Die Quantifizierung lebender Zellen erfolgte durch Trypanblaufärbung in einem Neubauer-Hämozytometer. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während perforierte Zellen blau gefärbt werden und dadurch lichtmikroskopisch von lebenden

Zellen unterschieden werden können. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte nach folgender Formel unter Verwendung eines Kammerfaktors von 10.000:

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Zellen}}{\text{Quadrate}} \cdot \text{Kammerfaktor} \cdot \text{Verduennung}$$

## 7.5 Isolierung der Peritonealzellen

Zur Isolierung der Zellen aus dem Peritoneum wurden die Mäuse zunächst mit einer Überdosis Kohlenstoffdioxid schmerzfrei euthanasiert und anschließend regional mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die abdominale Haut wurde vorsichtig frei präpariert und kaltes PBS (+ 2% (v/v) FBS + 0,5 mM EDTA, steril gefiltert) mit einer 26G Nadel intraperitoneal injiziert. Das Abdomen wurde 1 Minute lang massiert, bevor die Peritoneallavage mit einer 23G Nadel entnommen wurde.

## 7.6 Isolierung der Splenozyten

Zur Isolierung der Splenozyten wurden die Mäuse mit einer Überdosis Kohlendioxid schmerzfrei euthanasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Milz wurde präpariert, das Organ mechanisch zerkleinert und durch einen angefeuchteten 100 µm Filter gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (500 rcf, 8 Minuten, 4 °C) und die Erythrozyten durch Zugabe von ACK Lysepuffer für 3 Minuten auf Eis entfernt. Die Lyse wurde durch Zugabe von RPMI 1640 Medium gestoppt.

## 7.7 Isolierung der Alveolarzellen

Zur Isolierung der Zellen aus der Lunge wurden die Mäuse mit einer Überdosis Kohlendioxid schmerzfrei euthanasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Der Thorax wurde entlang des Brustbeins geöffnet und eine 18G Nadel mit Katheter in die Luftröhre eingeführt. Anschließend wurde die Lunge mit kaltem PBS (+ 2 mM EDTA + 1X cOmplete EDTA-freier Proteaseinhibitor-Cocktail) gewaschen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (650 rcf, 10 Minuten, 4 °C) sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dieser wurde im Falle eines Infektionsexperiments erneut zentrifugiert (3.600 rcf, 10 Minuten, 4 °C), um auch die

Bakterien zu sedimentieren. Der zellfreie Überstand wurde zur Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration oder bestimmter Zytokine bei -80 °C gelagert. Die Zellfraktionen wurden vereinigt und in ACK Lysepuffer resuspendiert, um die Erythrozyten zu entfernen. Nach einer Inkubation von 3 Minuten auf Eis wurde die Lyse durch Zugabe von RPMI 1640 Medium gestoppt.

## **7.8 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren im Hochdurchsatz, das die Untersuchung von einzelnen Zellen durch Fluoreszenzfärbung ausgewählter Antigene ermöglicht. Dazu wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS (+ 1% (v/v) BSA + 2 mM EDTA) gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Fluorophor-markierten Antikörper zu verhindern, wurden die Fc-Rezeptoren blockiert. Dazu wurden die Zellen in einer 1:50 Verdünnung von Anti-CD16/CD32 Antikörpern resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für die Fluoreszenzfärbung der Oberflächenantigene wurden die Zellen zentrifugiert (500 rcf, 5 Minuten, 4 °C) und in einer Lösung aus PBS (+ 1% (v/v) BSA + 2 mM EDTA mit den entsprechenden Antikörpern und einem fixierbaren Farbstoff zur Unterscheidung toter Zellen in einer Verdünnung von 1:2.000 (eBioscience FVD eFluor 780, Invitrogen) resuspendiert. Die Färbung erfolgte für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln, da die Fluorophore lichtsensitiv sind. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und im Durchflusszytometer auf Größe, Granularität und Fluoreszenz untersucht. Die Zellzahl wurde durch Zugabe von Zählkügelchen nach Herstellerangaben (CountBright Absolute, Invitrogen) oder direkt im Durchflusszytometer (Attune NxT, Invitrogen) quantifiziert. Insofern die durchflusszytometrische Analyse nicht sofort erfolgte, wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert (BD Biosciences). Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnung sind in der jeweiligen Bildunterschrift angegeben. Für die Färbung gegen intrazelluläre Antigene wurden die Zellen zuvor fixiert und permeabilisiert. Die fixierten Zellen wurden gewaschen und durch Zugabe von vorgekühltem Permeabilisierungspuffer III (BD Biosciences) fixiert und permeabilisiert. Die Platte wurde mit Klebeband verschlossen und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperfärbung wie oben beschrieben fortgesetzt. Die Kompensation der Messsignale erfolgte durch Messung der ungefärbten Zellen und einer Einzelfärbung für jedes verwendete Fluorophor oder

durch Kompensationskugeln nach Herstellerangaben (UltraComp eBeads, Invitrogen). Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der Software Flowjo (BD Biosciences).

## **7.9 Viabilität und Aktivierung von Makrophagen unter hypoxischen Bedingungen**

Um den Einfluss von hypoxischen (1% (v/v) O<sub>2</sub>) im Vergleich zu normoxischen Bedingungen (20% (v/v) O<sub>2</sub>) zu untersuchen, wurden diese Experimente in einer Hypoxiekammer durchgeführt. Der Sauerstoff wurde zuvor durch Stickstoff ersetzt. Alle Medien wurden zuvor über Nacht den hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, um den Sauerstoff aus den Lösungen zu entfernen. Für die Messung der Zellviabilität wurden 2x10<sup>6</sup> BMDM in 5 mL RPMI 1640 Medium (+ 1% (v/v) BSA + 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, steril filtriert) in zellabweisende 6-Well Platten ausgesät und für 48 Stunden inkubiert (37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>). Zur Untersuchung der Expression kostimulatorischer Marker wurden 0,5x10<sup>6</sup> BMDM in 2 mL des gleichen Mediums in zellabweisende 24-Well Platten ausgesät, mit LPS (100 ng/mL) aktiviert und für 24 Stunden inkubiert. Die Untersuchung der Zellviabilität und der Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

## **7.10 Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen**

Dendritische Zellen aus der Milz wurden durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Dazu wurde die Milz steril entnommen und in 2 mL RPMI 1640 Medium (+ 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin + Collagenase D (2,5 mg/mL) + DNase I [100 µg/mL], steril filtriert) 45 Minuten bei 37 °C enzymatisch verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von 80 µL 0,5 M EDTA gestoppt und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden in 2 mL raumtemperiertes HBSS (+ 15% (v/v) OptiPrep) aufgenommen und mit 3 mL vollentsalztem Wasser (+ 0,88% (w/v) NaCl, 1 mM EDTA + 0,5% (w/v) + 10 mM HEPES, 12% (v/v) OptiPrep, pH 7,4) unterschichtet. Die obere Schicht bestand aus 2 mL HBSS. Durch Zentrifugation (600 rcf, 15 Minuten, Raumtemperatur, ohne Bremse) wurden die verschiedenen Zellpopulationen der Milz nach ihrer Zelldichte aufgetrennt. Die dendritischen Zellen reichert sich in der obersten Schicht an. Die extrahierten Zellen wurden einmal mit

vorgewärmtem RPMI 1640 Medium gewaschen und die Reinheit der angereicherten dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in IMDM (+ 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin) resuspendiert, mit 100 ng/mL LPS aktiviert und mit Ovalbuminprotein oder Ovalbuminpeptid<sub>323-339</sub> stimuliert. Die Isolierung der T-Zellen aus der Milz erfolgte mittels magnetischer negativer Selektion (Pan T Cell Isolation Kit II Maus, Miltenyi Biotec). Die dendritischen Zellen wurden vor der Inkubation mit den isolierten T-Zellen dreimal mit vorgewärmter HBSS gewaschen. Die Untersuchung der Antigenpräsentation und der T-Zellaktivierung erfolgte im Durchflusszytometer. Die Konzentrationen der jeweiligen Stimuli, die verwendeten Zellzahlen und die Inkubationszeiten sind in der Bildunterschrift angegeben.

### **7.11 Echtzeit-Untersuchungen des Metabolismus**

Zur Untersuchung des Immunstoffwechsels wurden Peritonealzellen isoliert und die Makrophagen durch magnetische Negativselektion aufgereinigt (Makrophagen Isolationskit [Peritoneum] Maus, Miltenyi Biotec). In einer Seahorse XFe96 Zellkulturplatte (Agilent Technologies) wurden  $1,4 \times 10^5$  Zellen pro Well in 90  $\mu$ L RPMI 1640 Medium (+ 2% (v/v) FBS, steril filtriert) ausgesät und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37 °C ohne Kohlenstoffdioxid inkubiert. Jeweils 10  $\mu$ L 100 ng/mL LPS, 75  $\mu$ M langkettige Polyphosphate oder eine Kombination beider Stimuli wurden zugegeben und die Zellen für 18 Stunden bei 37 °C ohne Kohlenstoffdioxid inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit DMEM Medium (+ 1 mM Pyruvat + 2 mM L-Glutamin, pH 7,38, steril filtriert) gewaschen und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Echtzeit-Messungen des Stoffwechsels wurden mit einem Seahorse XFe96 (Agilent Technologies) durchgeführt. Die Glykolyseaktivität wurde durch Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) nach sequentieller Zugabe von 10 mM Glucose, 1,5  $\mu$ M Oligomycin und 50 mM 2-Desoxy-D-glucose bestimmt. Nach der Messung wurde die Zellzahl pro Well lichtmikroskopisch quantifiziert und die metabolische Messung auf die Zellzahl normiert. Zur Bestimmung der oxidativen Phosphorylierung wurde DMEM Medium (+ 25 mM Glucose + 1 mM Pyruvat + 2 mM L-Glutamin, pH 7,38, steril filtriert) verwendet. Die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) wurde durch sequentielle Zugabe von 1,5  $\mu$ M Oligomycin, 5  $\mu$ M FCCP, 1  $\mu$ M

Rotenon und Antimycin A untersucht. Die Datenanalyse wurde mit der Seahorse Wave Software (Agilent Technologies) durchgeführt.

### **7.12 Intrazelluläre Ansäuerung nach Phagozytose**

Die endosomale Ansäuerung nach Phagozytose wurde mit einem Konjugat aus fixierten *E. coli* Bakterien und dem pH-sensitiven Fluorophor pHrodo grün bestimmt. Dazu wurde das lyophilisierte Konjugat in HBSS in einer Konzentration von 1 mg/mL resuspendiert und anschließend gründlich gevortext. Mit einer 30G Nadel wurden 100 µg des Konjugats intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse anästhesiert und die Peritoneallavage entnommen. Die Analyse der intrazellulären Ansäuerung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messung der Fluoreszenzintensität des Fluorophors pHrodo grün.

### **7.13 Messung der Lungenschädigung**

Der Schweregrad der Lungenschädigung während einer bakteriellen Infektion wurde durch die Messung der Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage bestimmt. Während einer Lungenentzündung kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und der Epithelbarriere und damit zu einem Einstrom von Proteinen aus dem Blut ([Aman et al., 2011](#)). Die Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage wurde mit dem Pierce Bicinchoninsäure (BCA) Protein Test (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Absorption wurde bei 540 nm mit einem Plattenleser gemessen.

### **7.14 Quantifizierung von reaktiven Stickstoffmonoxiden**

Aktivierte Phagozyten setzen als Teil der antimikrobiellen Immunantwort reaktive Stickstoffmonoxide (NO) in ihre Umgebung frei. Die Nitritkonzentration (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) in der Peritoneal- oder Lungenlavage wurde mittels Griess-Test nach Herstellerprotokoll (Invitrogen) bei einer Absorption von 548 nm mit einem Plattenleser bestimmt.

### **7.15 Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies**

Während einer Infektion produzieren Zellen des angeborenen Immunsystems reaktive Sauerstoffspezies mit antimikrobiellen Eigenschaften.  $1 \times 10^6$  Peritonealzellen oder BMDM wurden in 100  $\mu\text{L}$  1640 RPMI (+ 0,1% (v/v) BSA + 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin) in zellabweisende 96-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit 20  $\mu\text{L}$  von  $1-2 \times 10^9$  opsonierten *E. coli* stimuliert und für 10 Minuten inkubiert (37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 95% relative Luftfeuchtigkeit). Anschließend wurden 20  $\mu\text{L}$  des Substrats Dihydrorhodamin (DHR123) zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert (Phagoburst, BD Biosciences). Die Quantifizierung der relativen Menge reaktive Sauerstoffspezies erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

### **7.16 Zytokinanalyse**

Die bronchoalveoläre Lavage wurde zur Detektion von bis zu 26 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen pro Probe mittels eines Multiplexverfahrens eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Zytokine & Chemokine 26-Plex Maus ProcartaPlex Panel 1, Invitrogen). Die Messung wurde im Analytical Instrumentation Core der Boston University durchgeführt.

### **7.17 Kultivierung und Infektion von *S. pneumoniae***

Kryokonservierte *S. pneumoniae* Bakterien wurden aufgetaut, auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit Hilfe einer Impföse in ein vorgewärmtes Nährmedium (vollentsalztes Wasser + 3% (w/v) Todd Hewitt Bouillon + 0,5% (w/v) Hefeextrakt, autoklaviert) überführt, bis eine Absorption von 0,05-0,07 bei 600 nm erreicht war. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 37 °C inkubiert, bis eine Extinktion von 0,25-0,28 erreicht wurde, was der logarithmischen Wachstumsphase entspricht. 1 mL der Bakteriensuspension wurde entnommen, zentrifugiert (3.184 rcf, 10 Minuten, 4 °C) und in kaltem PBS resuspendiert. Um das weitere Wachstum zu verlangsamen, wurden die Bakterien bis zur Infektion auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Infektionsdosis wurde die Bakteriensuspension auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag

wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) bestimmt. Für Überlebensexperimente wurde eine Infektionsdosis von  $1 \times 10^6$  CFU/Maus und für 18-stündige Infektionsexperimente  $2 \times 10^6$  CFU/Maus angestrebt. Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion einer sterilen PBS-Lösung, die Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) enthielt, betäubt. Die Anästhesie reduziert den Stress der Mäuse während der Inokulation und unterdrückt den Niesreflex, um eine effektive Applikation zu gewährleisten. Das Einsetzen der Anästhesie wurde durch Stimulation des Zwischenzehenreflexes überprüft. Anschließend wurden die Mäuse an einem Intubationsständer intranasal mit 20  $\mu$ L der Bakteriensuspension inokuliert, da dies dem natürlichen Infektionsweg entspricht. Die Mäuse wurden für 1 Minute in vertikaler Position gehalten, um eine vollständige Aspiration des Inokulums zu gewährleisten. Anschließend wurden die Mäuse mit einer Augensalbe behandelt, um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu verhindern. Am Ende der Experimente wurde die Bakterienbelastung bestimmt, indem die bronchoalveoläre Lavage auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurde die Anzahl der CFU nach Ablesen der Platten ausgerechnet.

### **7.18 Kultivierung und Infektion von *E. coli***

Kyrokonservierte *E. coli* Bakterien wurden auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde mit einer Impföse abgenommen, in ein vorgewärmtes Nährmedium (Luria Bouillon, autoklaviert) beimpft und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der Absorption bei 600 nm überwacht. Eine Absorption von 0,5-0,7 entsprach der logarithmischen Wachstumsphase. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (3.184 rcf, 10 Minuten, 4 °C) und die Bakterien in kaltem PBS resuspendiert. Die genaue Bestimmung der Infektionsdosis erfolgte nachträglich durch Ausplattieren einer seriellen Verdünnung der Bakteriensuspension auf Blutagarplatten. Diese wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert und am nächsten Tag wurden die CFU bestimmt. Für die Experimente wurde eine Infektionsdosis von  $1 \times 10^9$  CFU/Maus angestrebt.

Die Infektion der Mäuse mit lebenden *E. coli* Bakterien erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 100  $\mu$ L der Bakteriensuspension. Zur Quantifizierung

der Bakterienlast wurde retroorbitales Blut entnommen und die Bakterienkonzentration durch Fluoreszenzfärbung (LIVE/DEAD BacLight Bakterien Viabilitäts- und Zählerkit, Invitrogen) im Durchflusszytometer bestimmt. Der Fluoreszenzfarbstoff Syto-9 ist membranpermeabel, bindet an die DNA und färbt sowohl lebende als auch tote Zellen. Propidiumiodid bindet ebenfalls an die DNA, kann aber aufgrund der fehlenden Membranpermeabilität nur in Zellen mit beschädigter Membran eindringen. Propidiumiodid färbt daher nur tote Zellen, da deren Membran nicht mehr intakt ist.

### 7.19 Bewertung der Belastung im Infektionsexperiment

Nach der Infektion mit *E. coli* oder *S. pneumoniae* wurde der Gesundheitszustand der Mäuse zweimal täglich überwacht und der Grad der Belastung bewertet. Die Bestimmung des Schweregrades der Infektion erfolgte anhand publizierter Kriterien für ein Sepsismodell (Shrum et al., 2014). Ein kumulativer Wert von  $\geq 12$  oder ein Einzelwert von 3 führte zum Versuchsabbruch und zur schmerzlosen Euthanasie der betroffenen Mäuse durch eine Überdosis Kohlendioxid. In einer Überlebensstudie wurde dieses Ereignis als Tod zum nächsten Beobachtungszeitpunkt gewertet.

Parameter	Wert	Beschreibung
Allgemeinzustand	0	Fell glatt, glänzend und anliegend, Körperöffnungen sauber
	1	Fell matt
	2	Fell stumpf, verklebte oder feuchte Körperöffnungen
	3	Fell gestäubt, Tier fühlt sich kalt an, Krämpfe, Lähmungen, Atemgeräusche, bläuliche Schleimhäute
Augen	0	Augen glänzend
	1	Augen trüb, leichte Exsudate
	2	Augen eingesunken trüb, mäßige Exsudate
	3	Augen geschlossen, starke Exsudate
Spontanverhalten	0	Aufmerksam, neugierig, Aufrichten, flinke Bewegungen
	1	Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte oder reduzierte Bewegung oder Überaktivität, reduziertes Explorationsverhalten
	2	Isolation, Apathie, Koordinationsstörungen, ausgeprägte Stereotypien oder Hyperkinetik
	3	Automutilation, Nekrosen, Rektumvorfall
Atmung	0	Normal
	1	Atemfrequenz ggf. erhöht, Leichte Dyspnoe
	2	Atemfrequenz erhöht, ggf. Verstärkte abdominale Atmung, Mäßige Dyspnoe

Parameter	Wert	Beschreibung
Haltung	3	Atemfrequenz erhöht, ausgeprägte abdominale Atmung, Dyspnoe, Schnappatmung
	0	Normal
	1	Leichte Krümmung
	2	Mäßige Krümmung
	3	Starke Krümmung, beeinträchtigte Bewegung
Reaktionsverhalten auf Stimulus	0	Direkte Reaktion auf akustische Stimulation und Berührung
	1	Langsame/ keine Reaktion auf akustische Stimulation und normale Reaktion auf Berührung
	2	Keine Reaktion auf akustische Stimulation und langsame Reaktion auf Berührung
	3	Keine Reaktion auf akustische Stimulation und keine Reaktion auf Berührung (kann sich nicht mehr allein aufrichten)

## 7.20 Isolierung der RNA

Die Ribonukleinsäure (RNA) wurde mittels RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) isoliert und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

## 7.21 cDNA Synthese und quantitative Echtzeit-PCR

Die relative Menge an RNA wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) bestimmt. Dazu wurde die isolierte RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Die RNA wurde auf 100 ng normiert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Final
RNA	X	100 ng
Nukleasefreies Wasser	16-X	
Maxima H Minus cDNA Synthese Mastermix	4	1X
<b>Total</b>	<b>20</b>	

Anschließend wurde die cDNA im Thermozykler synthetisiert:

## METHODEN

Schritt	Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]
I	1	25	10:00
II	1	50	15:00
III	1	85	05:00
IV	1	4	∞

Die cDNA wurde durch Zugabe von 80 µL nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 1 ng/µL verdünnt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

Komponenten	Volumen [µL]	Final
Powerup SYBR grün Mastermix	10	1X
Vorwärtsprimer	1	0,5 µM
Rückwärtsprimer	1	0,5 µM
Nukleasefreies Wasser	6	
<b>Total</b>	<b>18</b>	

In eine qPCR-Platte wurden 18 µL des Reaktionsansatzes gegeben und dann 2 µL der cDNA hinzugefügt. Die Platte wurde versiegelt, gevortext und zentrifugiert, um Tröpfchen und Luftblasen zu entfernen. Die qPCR wurde auf einem Thermo-zykler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Zyklus ( $\Delta 1,6$ °C/Sekunde)	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]
I	1	50	02:00
		95	10:00
II	1	95	00:15
		60	01:00
III	1	95	00:15
		60	01:00
		95	∞

Wenn die Amplifikation nach 40 Zyklen den Schwellenwert noch nicht erreicht hatte, wurde für die graphische Auswertung der Daten die maximale Anzahl von 40 Zyklen angenommen. Die Ergebnisse wurden mit dem Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-

phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und die relativen Expressionslevel mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode berechnet (Livak & Schmittgen, 2001).

## 7.22 Patch-Clamp

Die Messungen der PACC1 Aktivität wurden von [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin nach der publizierten Methodik (Wang et al., 2022a) durchgeführt. Dazu wurden HEK293 Zellen verwendet und die PACC1 Aktivität durch Anlegen von Spannungsrampen von -80 bis +80 mV alle 4 Sekunden bei einem extrazellulären neutralen pH-Wert von 7,4 und einem sauren pH-Wert von 5,5 gemessen. Um den Einfluss von kurz- und langkettigen Polyphosphaten auf die PACC1 Aktivität zu untersuchen, wurden diese Substanzen in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  für 40 Sekunden zugegeben. Anschließend wurde die Kammer gewaschen und die Stromstärke gemessen.

## 7.23 Monokolonisierung keimfreier Mäusen

Keimfreie Mäuse wurden mit zwei Stämmen von *E. coli* monokolonisiert. Entweder mit einem Wildtypstamm (WT/MG1655), der Polyphosphate produzieren kann, oder mit einem gentechnisch veränderten Stamm mit defizienter Polyphosphatkinase 1 ( $\Delta ppk$ /MJG224). *E. coli* besitzen kein *Ppk2* Gen (Neville et al., 2022). Die Mäuse erhielten eine einmalige orale Dosis von 200  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^9$  CFU/mL) LB-Kultur. Nach drei Wochen wurden die Mäuse aus den sterilen Isolatoren entnommen. Die Monokolonisation wurde kontrolliert, indem steril gesammelter Kot auf Blutagarplatten ausgestrichen und die Homogenität der über Nacht gewachsenen Kolonien beobachtet wurde. Zusätzlich wurde eine PCR-Amplifikation des *Ppk1* Gens durchgeführt.

## 7.24 Isolierung bakterieller DNA aus LB-Kulturen und Mauskot

Zur Extraktion bakterieller DNA aus LB-Kulturen wurde 1 mL des Mediums zentrifugiert (3.000 rcf, 5 Minuten, Raumtemperatur), der Überstand verworfen und 500  $\mu\text{L}$  TRIzol zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden

200 µL Chloroform zugegeben, invertiert und weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (12.000 rcf, 15 Minuten, 4 °C) und die DNA-haltige Interphase isoliert. Anschließend wurden 200 µL 100% Ethanol zugegeben, invertiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (2.000 rcf, 5 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte DNA mit 1 mL 10%igem Ethanol (+ 0,1 M Natriumcitrat, pH 8,5) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2.000 rcf, 5 Minuten, 4 °C) wurden die Proben zweimal mit 1,5 mL 75%igem Ethanol gewaschen und jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 8 mM Natriumhydroxid resuspendiert. Bakterielle DNA aus Mäusekot wurde mit dem NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Anschließend wurde das *Ppk1* Gen mittels PCR und dem GoTaq Hot Start Green PCR Kit (Promega) amplifiziert:

Komponenten	Volumen [µL]	Final
Hot Start grün PCR Mastermix	12,5	1X
Vorwärtsprimer	0,6	1 µM
Rückwärtsprimer	0,6	1 µM
DNA	2,5	
Nukleasefreies Wasser	13,8	
<b>Total</b>	<b>30</b>	

Die PCR wurde in einem Thermozykler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]
I	1	94	02:30
II	32	94	00:30
		57,5	00:30
		72	04:30
III	1	72	06:00
IV	1	8	∞

## 7.25 Isolierung von Zellen aus der Lamina propria des Kolons

Der Kolon wurde präpariert, längs eröffnet und der Stuhlinhalt mit kaltem PBS (+ 3% (v/v) FBS) entfernt. Der Darm wurde drei weitere Male mit vorgewärmtem HBSS

(+ 4% (v/v) FBS, + 2 mM EDTA) für 15 Minuten bei 250 rpm und 37 °C gewaschen. Anschließend wurde der Darm mit einer Schere zerkleinert und 35 Minuten bei 250 rpm und 37 °C enzymatisch verdaut. Die Verdauungslösung bestand aus vorgewärmtem RPMI 1640 (+ 4% (v/v) FBS, + 100 µg/mL DNase I, + 2,5 mg/mL Collagenase D, + 0,5 mg/mL Dispase II). Die Suspension wurde zunächst durch ein 70 µm-Filter und anschließend durch ein 40 µm-Filter filtriert.

## 7.26 ATAC-Sequenzierung

Die ATAC-Sequenzierung (Assay für Transposase-zugängliches Chromatin) ist eine Methode zur Untersuchung des Epigenoms einer Zelle. Mit Hilfe des Enzyms Transposase wird das Chromatin in allen für das Enzym zugänglichen Bereichen geschnitten. Zugängliche Bereiche sind in der Regel Regionen, in denen die DNA nicht um die Nukleosomen herumgebunden ist und somit Platz für Transkriptionsfaktoren schafft. Aus den zugänglichen Bereichen kann daher abgeleitet werden, ob in dieser Region eine aktive Genexpression stattfindet (Grandi et al., 2022).

Die Lamina propria des Kolons von mit WT und  $\Delta ppK$  *E. coli* monokolonisierten Mäusen wurde isoliert und anschließend die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (7-AAD-CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) mittels Durchflusszytometrie positiv sortiert. Die Zellen wurden mit dem ATAC-Sequenzierungskit (Diagenode) prozessiert und die DNA-Bibliotheken extern bei Novogene in Sacramento sequenziert. Die bioinformatische Analyse wurde von [REDACTED] [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] der Boston University durchgeführt.

## 7.27 Einzelkern-ATAC- und RNA-Sequenzierung

Die Einzelkern-ATAC- und RNA-Sequenzierung ist ein Verfahren, das die gleichzeitige Analyse der Chromatinzugänglichkeit auf epigenetischer Ebene und die Analyse des nukleären Transkriptoms ermöglicht (Kashima et al., 2020).

Peritonealzellen wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie positiv sortiert (7-AAD-CD45<sup>+</sup>). Die Einzelkernsuspension wurde mit dem Chromium Single Cell Multiome ATAC and Gene Expression Kit (10xGenomics) hergestellt und im Single Cell Sequencing Core der Universität Boston prozessiert und sequenziert. Die bioinformatische Analyse wurde von [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe

von [REDACTED] der Boston University durchgeführt.

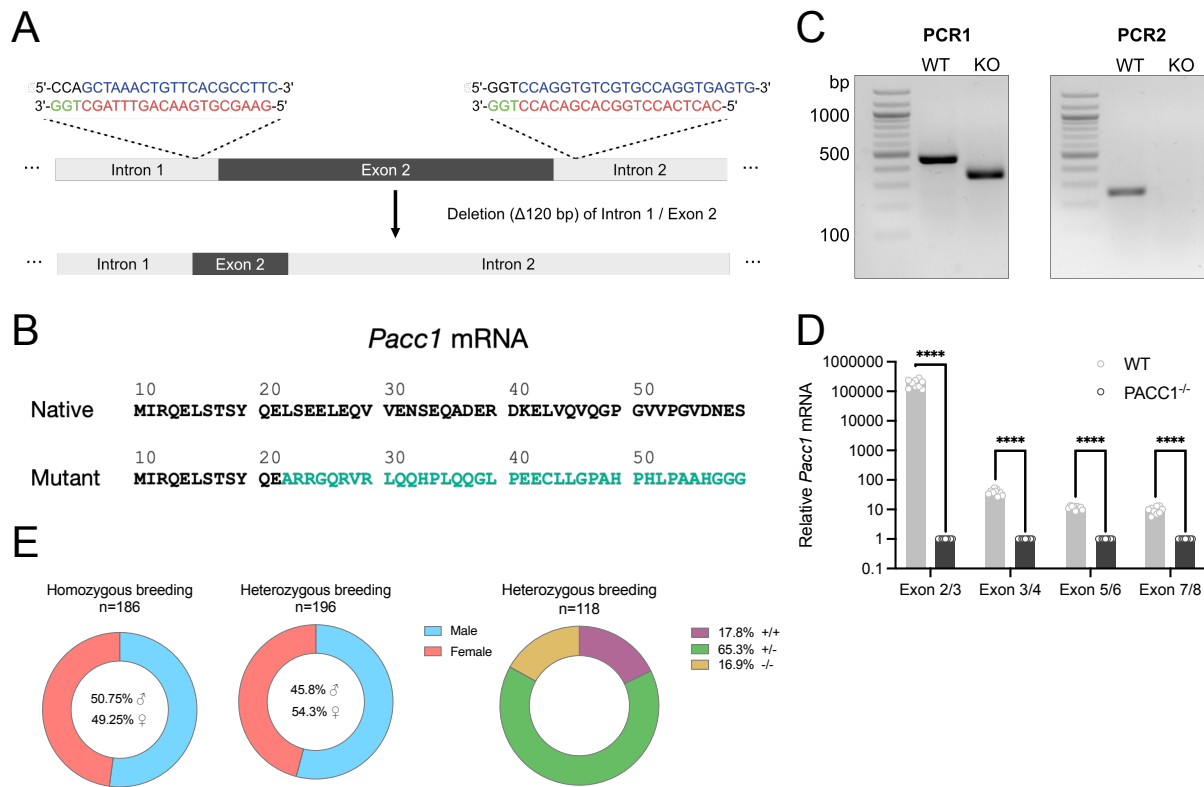
## **7.28 Statistik und grafische Darstellung**

Statistische Analysen wurden mit GraphPad 9 (Prism) durchgeführt und die Ergebnisse grafisch dargestellt. Der Stichprobenumfang aller Experimente ist in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem t-Test oder ein- oder zweifaktorieller Varianzanalyse geprüft, wie in den Legenden der Abbildungen angegeben. Überlebenszeitstudien wurden mit dem Log-Rang-Mantel-Cox-Test ausgewertet. Signifikanz wurde bei einem Wert von  $p \leq 0,05$  mit \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  angenommen. Keine Signifikanz bei einem Wert von  $p > 0,05$ . Die Bilder wurden mit der Software Affinity Designer erstellt.

## 8 Ergebnisse

### 8.1 Validierung genetisch veränderter *PACC1*<sup>-/-</sup> Mäuse

Der globale Defekt des *Pacc1* Gens wurde durch molekularbiologisches Editieren von Mauszygoten mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode (gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen/CRISPR-assoziiertes Protein 9) durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] in Zusammenarbeit mit Dr. Eshkind von der Transgenic Facility der Johannes Gutenberg Universität Mainz erzeugt. Leit-RNAs wurden komplementär zu den Introns 1 und 2 des murinen *Pacc1* Gens und flankiert von zwei guanosinreichen Protospacer-Nachbarmotiven (PAM) konstruiert. Dies führte zu einer heterozygoten Deletion von 120 Basenpaaren in Intron 1 und Exon 2 (**Abbildung 11A**). Die Deletion des *Pacc1* Gens wurde auf DNA-Ebene mittels Sanger-Sequenzierung und Genotypisierungs-PCR durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] bestätigt (Strüve, 2019). Der dadurch veränderte Tripletcode führte zu einer Leserasterverschiebung und mündet in ein vorzeitiges Stoppcodon in Exon 4 (**Abbildung 11B**). In der Agarosegelelektrophorese wandert das PCR-Produkt des deletierten *Pacc1* Gens aufgrund seiner geringeren Molekülgröße schneller als das WT Produkt und zeigt keine Amplifikation mit Primern, die an die deletierte Sequenz binden (**Abbildung 11C**). Auf RNA-Ebene wurde der Defekt des *Pacc1* Gens mittels RT-qPCR nachgewiesen. Primerpaare, die im Bereich des deletierten Exons 2 binden, zeigten keine Amplifikation. Andere Exons der *Pacc1* Boten-RNA (mRNA) zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion des Transkripts in der Zelle, was auf einen Nonsense-vermittelter mRNA Zerfall hinweist (**Abbildung 11D**). Heterozygote Mäuse wurden für fünf Generationen mit WT Mäusen rückgekreuzt, um mögliche unbeabsichtigte CRISPR/Cas9-induzierte Mutationen abseits der Zielsequenz herauszukreuzen. Anschließend wurde heterozygote Tiere miteinander verpaart, um eine homozygote Zucht zu etablieren. Von diesen Nachkommen waren ca. 17% homozygot für den Defekt im *Pacc1* Gen, was mäßig von den statistisch erwarteten 25% abweicht. Etwa 18% der Nachkommen waren heterozygot und ca. 65% homozygot für das WT Allel. Die Mäuse waren fruchtbar und zeigten keinen veränderten Phänotyp unter nativen Bedingungen (**Abbildung 11E**).



**Abbildung 11 | CRISPR/Cas9-Strategie für das murine *Pacc1* Gen und Verifizierung der Deletion**

**A** Leit-RNAs (blau) binden an die komplementäre DNA-Sequenz von *Pacc1* Intron 1 und 2 (rot), flankiert von PAM-Sequenzen (grün). Die Editierung führt zu einer Deletion von 120 Basenpaaren in Intron 1 und Exon 2. **B** Die Deletion verursacht eine Leserasterverschiebung und führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon in Exon 4 (WT 1053 bp, 350 aa; KO 294 bp, 97 aa). **C** Die Genotypisierungs-PCR besteht aus zwei Schritten: In PCR1 binden die Primer an Intron 1 und 2 und erzeugen bei PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen ein PCR-Produkt mit geringerer Molekülmasse (339 bp) im Vergleich zu WT Mäusen (459 bp). In PCR2 binden die Primer an die deletierte Region von Exon 2. Bei PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen von Exon 2 wird in PCR2 keine Amplifikation detektiert, jedoch bei WT Mäusen (256 bp). **D** 0,5x10<sup>6</sup> BMDM wurden lysiert und eine qPCR-Messung der *Pacc1* mRNA von n=3 Mäusen/Gruppe durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die Daten wurden mit einem multiplen ungepaarten t-Test analysiert, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. **E** Zuchtstatistik der Geschlechtsverteilung und des Genotyps bei homozygoten und heterozygoten Verpaarungen.

## 8.2 Immunorgane und Immunzellen exprimieren *Pacc1*

Um Rückschlüsse auf die Beteiligung von *PACC1* im Immunsystem zu erhalten, wurde die Datenbank des Human Protein Atlas nach Expressionsleveln von humanem *Pacc1* in Organen und Zelltypen durchsucht (<https://www.proteinatlas.org/>, Uhlén et al., 2015). Der Datensatz zur RNA-Expression in Organen besteht aus Konsensusdaten von RNA-Sequenzierungen des Human Protein Atlas (n=44) und des Genotype Tissue Expression Project (n=36). Der Datensatz für die Zelltypen besteht aus einer Metaanalyse veröffentlichter Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (n=31) gesunder menschlicher Gewebe. Eine überdurchschnittlich hohe Expression von *Pacc1* wurde in professionellen Phagozyten, einschließlich B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Mikroglia, Langerhanszellen, Kupfferzellen und Hofbauerzellen gefunden. Unter den Nicht-Immunzellen wurde eine hohe *Pacc1* Expression in

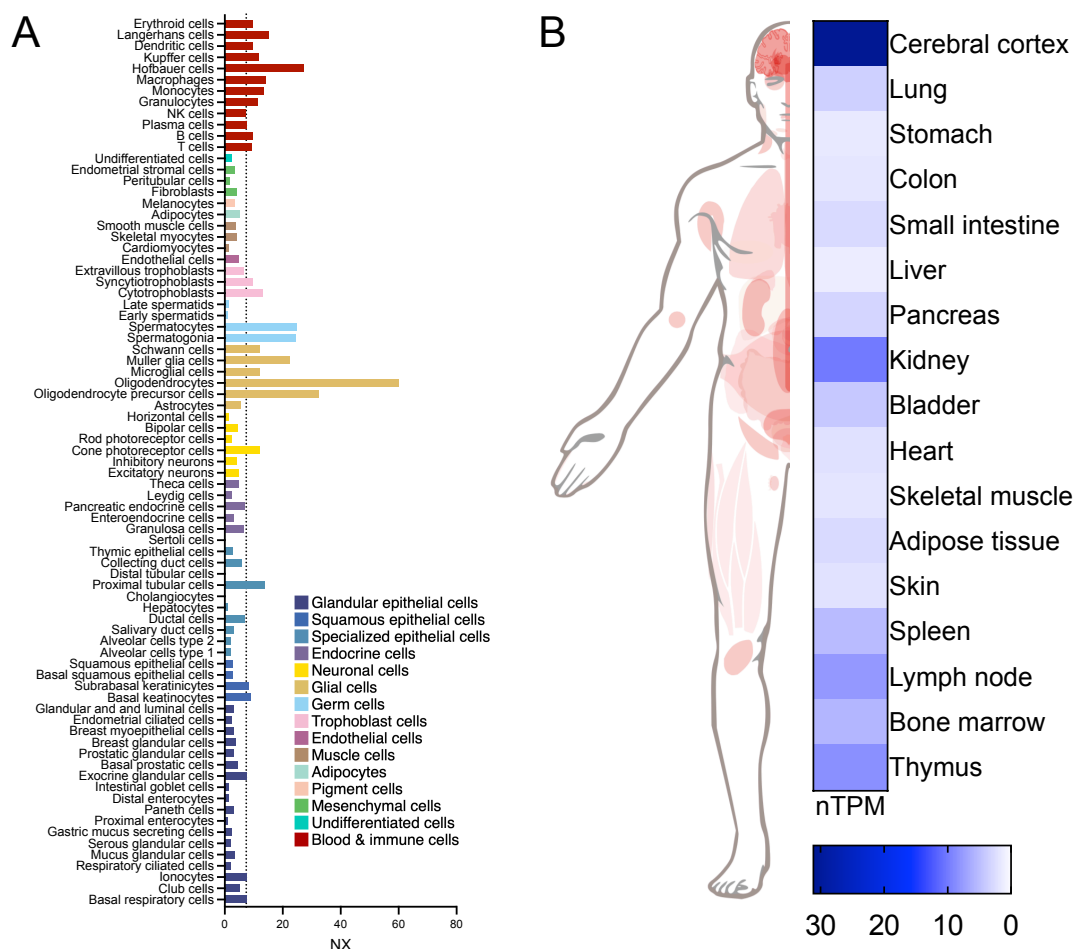


Abbildung 12 | ***Pacc1* wird in Organen und Zellen des Immunsystems exprimiert**  
**A** Die *Pacc1* Expressionswerte sind als Konsensdaten in normalisierten Transkripten pro Million (nTPM) aus den RNA-Sequenzierungsdaten des Human Protein Atlas (n=44) und des Genotype Tissue Expression Project (n=36) für ausgewählte menschliche Organe dargestellt. **B** Eine Metaanalyse von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (n=31) zeigt die Expression von *Pacc1* in ausgewählten menschlichen Zelltypen. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert (<https://www.proteinatlas.org/>, Uhlén et al., 2015).

Oligodendrozyten und -blasten, Spermatozyten, Spermatogonien, proximalen Tubuluszellen, Keratinozyten und Trophoblasten gefunden (**Abbildung 12A**). Die höchste *Pacc1* Expression im Gewebe wurde im Gehirn gefunden, gefolgt von der Niere und den primären lymphatischen Organen Thymus und Knochenmark und den sekundären lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten (**Abbildung 12B**).

### 8.3 Mikrobielle Moleküle beeinflussen die Expression von *Pacc1* in Makrophagen

Die Immunantwort wird durch Stimulation von Rezeptoren auf der Plasmamembran, in Vesikeln oder im Zytosol initiiert und koordiniert. Nach der Bindung des Liganden an einen dieser Rezeptoren wird eine Signalkaskade aktiviert, die z. B. eine Veränderung der Gentranskription zur Folge hat, um die Immunantwort an den jeweiligen Stimulus anzupassen. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem PRR, die konservierte Strukturen von Mikroben, sogenannte PAMP, erkennen und eine Entzündung auslösen können. Auch aktivierte Zytokinrezeptoren können je nach Zytokin und Kontext Entzündungen auslösen oder abschwächen. Im Gegensatz zu PAMP sind Zytokine jedoch keine mikrobiellen Substanzen, sondern werden von körpereigenen Zellen gebildet. Sie entstehen z. B. als Folge eines Traumas oder einer Infektion.

Um zu untersuchen, ob und durch welche mikrobiellen Substanzen die *Pacc1* Expression beeinflusst wird, wurden Makrophagen (BMDM) für 24 Stunden mit dem jeweiligen Liganden inkubiert und anschließend die relative *Pacc1* mRNA mittels qPCR bestimmt. Die Stimulation mit IFN $\gamma$  führte zu einer signifikanten Reduktion der *Pacc1* Expression um ca. -65%, mit Zymosan, PGN, LPS, Poly(I:C) und CpG ODN um ca. -70% und mit LPS um ca. -80%. Im Gegensatz dazu erhöhten IFN $\beta$  und

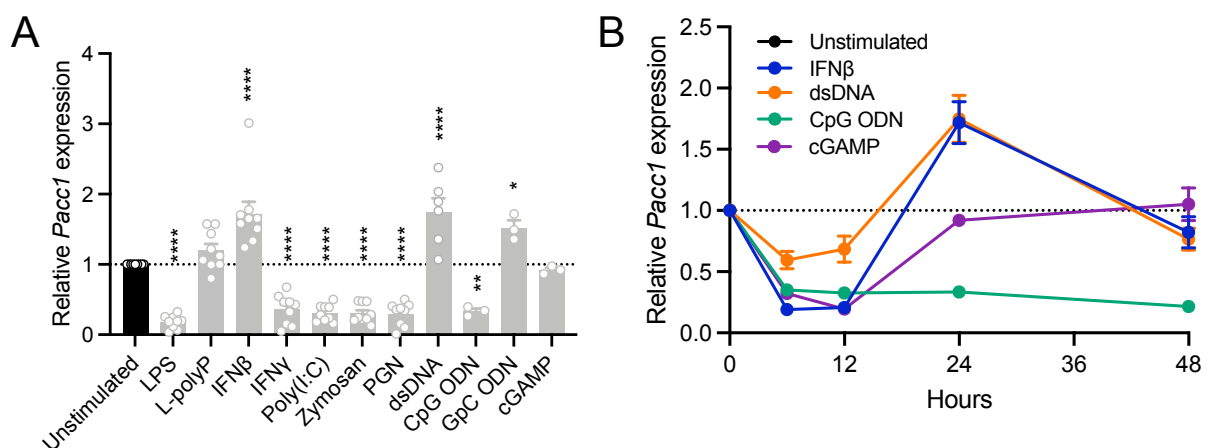
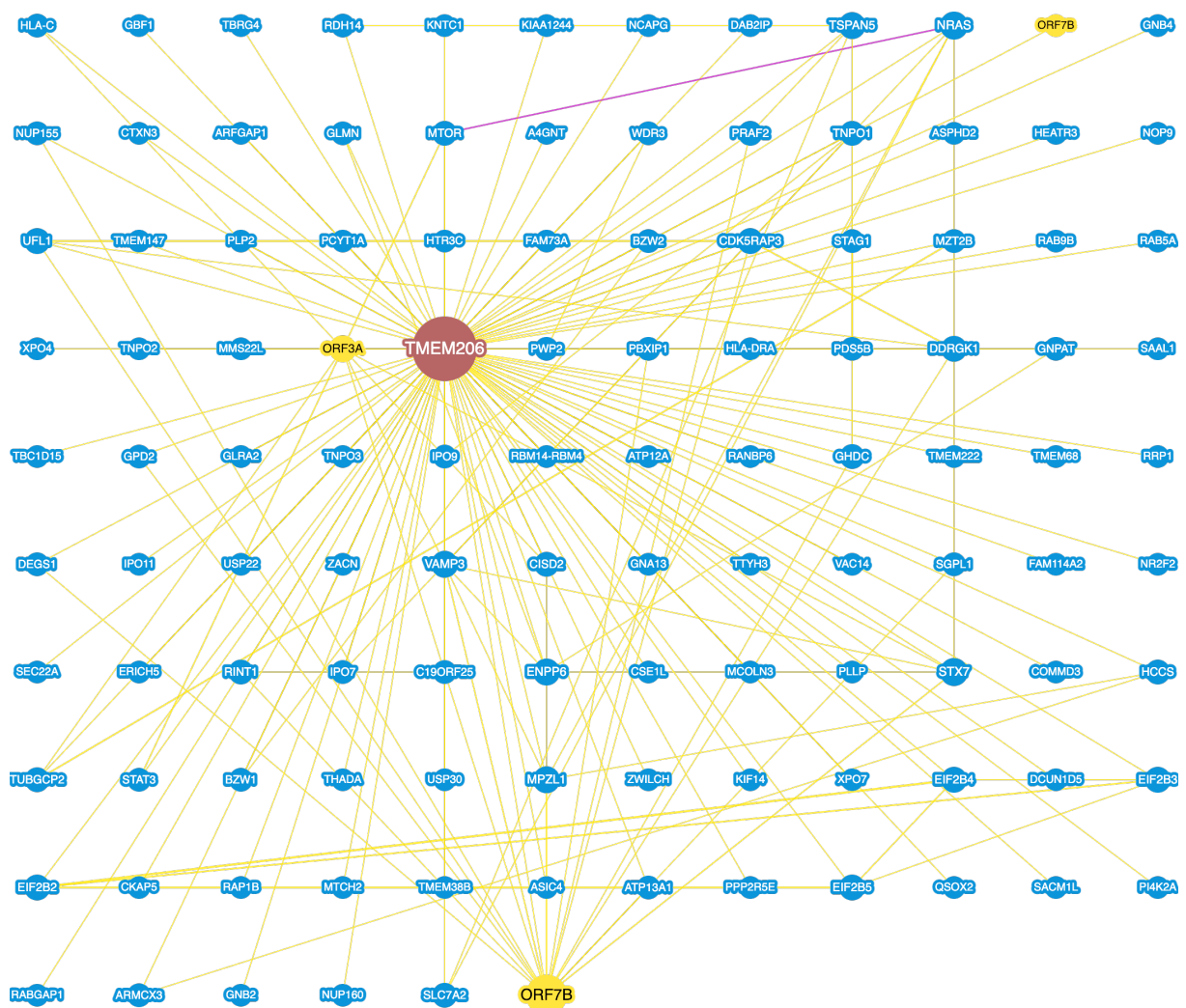


Abbildung 13 | **Die Expression von *Pacc1* wird durch mikrobielle Produkte differenziell reguliert**  
**A** 0,5x10<sup>6</sup> BMDM wurden für 24 Stunden inkubiert mit LPS (100 ng/mL), langkettige Polyphosphate (50  $\mu$ M), IFN $\beta$  (500 U/mL), IFN $\gamma$  (100 ng/mL), Poly(I:C) (1  $\mu$ g/mL), Zymosan (10  $\mu$ g/mL), PGN (10  $\mu$ g/mL), dsDNA (1  $\mu$ g/mL), CpG ODN (1  $\mu$ M), GpC ODN (1  $\mu$ M) oder cGAMP (10  $\mu$ g/mL). Die dsDNA wurde mit Oligofectamin transfiziert. Die Expressionslevel der *Pacc1* mRNA wurden mittels qPCR in unabhängigen Experimenten an n=3 Mäusen bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt und wurden mittels einseitiger Varianzanalyse und Dunnett-Vergleichstest analysiert. \*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,001, \*\*\*\*p $\leq$ 0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05. **B** Für ausgewählte Stimuli wurde eine Expressionskinetik der *Pacc1* mRNA in unabhängigen Experimenten von n=2 Mäusen erstellt.

dsDNA die *Pacc1* Expression um ca. 75% und GpC ODN um ca. 50%. Langkettige Polyphosphate und cGAMP zeigten keinen Effekt (**Abbildung 13A**). Die Kinetik der *Pacc1* Expression nach Stimulation mit IFN $\beta$ , dsDNA, CpG ODN und cGAMP war in den ersten 12 Stunden ähnlich, wobei die vorhandene Menge an *Pacc1* mRNA herunterreguliert wurde. Nach 24 Stunden stieg die *Pacc1* Expression nach Stimulation mit IFN $\beta$  und dsDNA um 170% an und fiel erst nach 48 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Nach Stimulation mit cGAMP erreichte die relative Menge an *Pacc1* mRNA bereits nach 24 Stunden wieder das Ausgangsniveau, während nach Stimulation mit CpG ODN die *Pacc1* Expression konstant niedrig blieb (**Abbildung 13B**).

## 8.4 PACC1 interagiert mit Proteinen und Signalwegen der Immunantwort

Ein bioinformatisches Screening wurde durchgeführt, um ein Interaktionsnetzwerk von PACC1 zu generieren. Die beschriebenen Interaktionspartner wurden analysiert, um Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von PACC1 an der Immunantwort und auf einen bestimmten Signalweg oder eine bestimmte Funktion zu ziehen (**Abbildung 14**). Die Suche ergab eine Trefferliste von 110 humanen Proteinen und 3 Proteinen des schweren akuten Atemwegssyndrom-Coronavirus (SARS-CoV) (**Tabelle 3**).



**Abbildung 14 | Das Interaktionsnetzwerk von humanem PACC1**  
 Humanes PACC1 (TMEM206, braun) interagiert mit 110 humanen (blau) und 3 viralen SARS-CoV Proteinen (gelb). Interaktionen, die durch physikalische Methoden nachgewiesen wurden, sind durch gelbe Verbindungen gekennzeichnet, violette Linien symbolisieren physikalische und genetische Evidenz. Die Daten stammen aus BioGRID (<https://thebiogrid.org>, Stark et al., 2006).

Der weitere Fokus der identifizierten Interaktionspartner lag auf Proteinen, für die bereits eine Rolle im Immunsystem beschrieben ist. Zu diesen Proteinen gehören die Haupthistokompatibilitätskomplexe HLA-C und HLA-DRA, mTOR und STAT3 (**Tabelle 2**).

Tabelle 2 | Interaktionspartner von humanem PACC1 mit einer Funktion in der Immunantwort

Abkürzung	Protein	Funktion	Lokalisation
HLA-C	Haupthistokompatibilitätskomplex I, C $\alpha$ -Kette	Antigenpräsentation für CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	Endosomales System, Plasmamembran
HLA-DRA	Haupthistokompatibilitätskomplex II, DR $\alpha$ -Kette	Antigenpräsentation für CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Endosomales System, Plasmamembran
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier	Regulation des Immunmetabolismus, Migration, Zytokinenexpression, Makrophagenpolarization und Antigenpräsentation	Zytosol
STAT3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3	Zytokinsignalgebung	Zytosol, Nukleus

HLA-C gehört zusammen mit HLA-A und HLA-B zu den MHC-I-Molekülen und bildet die schwere Kette des Rezeptors. MHC-I wird in fast allen Zellen exprimiert und ist an der Immunhomöostase-/überwachung beteiligt, indem es Peptide bindet und auf der Zelloberfläche präsentiert und so den Liganden für den TCR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen darstellt. MHC-I geben Auskunft über die Zusammensetzung zytosolischer Proteine (Neefjes et al., 2011). Körperfremde Proteine von intrazellulären Pathogenen und entartete Proteine von Krebszellen können so identifiziert werden. Der MHC-II wird ebenfalls von drei polymorphen Genen kodiert: HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP. MHC-II wird nur von bestimmten, antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, darunter Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. Extrazelluläre Antigene können von MHC-II aufgenommen und präsentiert werden. An der Oberfläche aktivieren sie CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deren TCR spezifisch für das präsentierte Peptid ist (Neefjes et al., 2011).

mTOR ist eine Serin/Threoninkinase, die an verschiedenen zellulären Prozessen wie Autophagie, Lysosombiogenese, Apoptose, Glykolyse, Lipid- und Nukleotidsynthese, Translation und Ribosombiogenese beteiligt ist (Liu & Sabatini, 2020). Im Immunsystem spielt mTOR eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Regulation der Immunantwort. Im angeborenen Immunsystem ist mTOR an der

Rekonfiguration des Immunstoffwechsels, der Migration, der Expression von Typ-I-Interferonen und Zytokinen, der Polarisierung von Makrophagen und der Antigenpräsentation beteiligt (Weichhart et al., 2015).

STAT3 ist an der Signaltransduktion von pro- und antiinflammatorischen Stimuli von der Zelloberfläche bis in den Zellkern beteiligt. Die Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung von STAT Proteinen, die das Signal in den Zellkern transportieren und dort als Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuern (Hu et al., 2021).

Tabelle 3 | Interaktionspartner von humanem PACC1

Abkürzung	Protein	Organismus	Methode	Datensatz
A4GNT	Alpha-1,4-N-Acetylglucosaminyl-Transferase	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
ARFGAP1	ADP-Ribosylierungsfaktor GTPase aktivierendes Protein 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
ARMCX3	Gürteltier Wiederholung enthaltend X-Linked 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
ASIC4	Säureempfindlicher Ionenkanal 4	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
ASPHD2	Aspartat-Beta-Hydroxylase-Domäne 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
ATP12A	ATPase 12A	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
ATP13A1	ATPase 13A1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
ATP1A3	ATPase 1A3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
ATP2C1	ATPase 2C1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
BZW1	Grundlegender Leucin-Reißverschluss und W2-Domänen enthaltendes Protein 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
BZW2	Grundlegender Leucin-Reißverschluss und W2-Domänen enthaltendes Protein 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
C19ORF25	Chromosom 19 offenes Leseraster 25	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
CANX	Calnexin	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Cho et al., 2022
CARKD	Kohlenhydrat-Kinase-Domäne enthaltendes Protein	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
CDK5RAP3	CDK5 regulatorische Untereinheit-assoziiertes Protein 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
CHRNA4	Nikotinischer cholinergischer Rezeptor Alpha 4	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021 Huttlin et al., 2021/ pre-pub
CHRN2	Nikotinischer cholinergischer Rezeptor Beta 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
CISD2	CDGSH Eisen-Schwefel-Domäne 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
CKAP5	Zytoskelett-assoziiertes Protein 5	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
COMM3	COMM-Domäne enthaltend 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
CSE1L	CSE1 Chromosomensegregation 1-ähnlich	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021

## ERGEBNISSE

Abkürzung	Protein	Organismus	Methode	Datensatz
CTXN3	Cortixin 3	<i>Homo sapiens</i>	Zwei-Hybrid-System	Luck et al., 2020
DAB2IP	DAB2 interagierendes Protein	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
DCUN1D5	Defektiv in Cullin Neddylation 1 Domain-enthaltend 5	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
DDRKG1	DDRKG-Domäne enthaltend 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
DEGS1	Delta-4-Desaturase Sphingolipid 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
EIF2B2	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 2B, Untereinheit 2 Beta	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
EIF2B3	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 2B, Untereinheit 3 Gamma	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
EIF2B4	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 2B, Untereinheit 4 Delta	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
EIF2B5	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 2B, Untereinheit 5 Epsilon	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
ENPP6	Ektonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 6	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
ERICH5	Glutamat-reiches 5	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
FAM114A2	Familie mit Sequenzähnlichkeit 114 Mitglied A2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
FAM73A	Familie mit Sequenzähnlichkeit 73 Mitglied A	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
GBF1	Golgi-Brefeldin-A-resistenter Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
GHDC	GH3-Domäne enthaltend	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
GLMN	Glomulin	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
GLRA2	Glycinrezeptor Alpha 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
GNA13	Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein (G-Protein), Alpha 13	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
GNB2	Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein (G-Protein), Beta Polypeptid 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
GNB4	Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein (G-Protein), Beta Polypeptid 4	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
GNPAT	Glyceronphosphat-O-Acyltransferase	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
GPD2	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
HCCS	Holozytochrom-c-Synthase	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
HEATR3	HEAT-Wiederholung enthaltend 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
HLA-C	Haupthistokompatibilitätskomplex I, C	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
HLA-DRA	Haupthistokompatibilitätskomplex II, DR	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015 Huttlin et al., 2021
HTR3C	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 3C	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
IPO11	Importin 11	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
IPO7	Importin 7	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021

Abkürzung	Protein	Organismus	Methode	Datensatz
IPO9	Importin 9	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021 Huttlin et al., 2021/ pre-pub
KIAA1244	ARFGEF-Familienmitglied 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
KIF14	Kinesin-Familienmitglied 14	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
KNTC1	Kinetochor-assoziiert 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
MCOLN3	Mucolipin 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
MMS22L	MMS22-ähnliches	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
MPZL1	MPZ-ähnliches 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
MTCH2	Mitochondriale Carrier 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
MTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
MZT2B	Mitotische Spindel organisierendes Protein 2B	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
NANS	N-Acetylneuraminsäure-Synthase	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021/ pre-pub
NCAPG	Nicht-SMC-Kondensin-I-Komplex, Untereinheit G	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
NOP9	Nukleolares Protein 9	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
NR2F2	Nukleare Rezeptor-Unterfamilie 2, Gruppe F, Mitglied 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
NRAS	Neuroblastoma viral RAS (v-ras) Onkogen Homolog	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
NRSN1	Neurensin 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
NUP155	Nukleopodin 155	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
NUP160	Nukleopodin 160	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
ORF3A	Protein 3a	SARS-CoV-2	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Stukalov et al., 2021
ORF7B	Nicht-strukturelles Protein 7b; ns7b; Akzessorisches Protein 7b	SARS-CoV	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Stukalov et al., 2021
ORF7B	Nicht-strukturelles Protein 7b	SARS-CoV-2	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Stukalov et al., 2021
PBXIP1	Prä-B-Zell-Leukämie-Homeobox-interagierendes Protein 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
PCYT1A	Phosphat-Cytidylyltransferase 1 Alpha	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
PDE2A	Phosphodiesterase 2A	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Lobo et al., (2020)
PI4K2A	Phosphatidylinositol-4-Kinase Typ 2 Alpha	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
PLLP	Plasmolipin	<i>Homo sapiens</i>	Zwei-Hybrid-System	Luck et al., 2020
PLP2	Proteolipidprotein 2	<i>Homo sapiens</i>	Zwei-Hybrid-System	Luck et al., 2020
PPP2R5E	Proteinphosphatase 2 regulatorische Untereinheit B Epsilon Isoform	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
PRAF2	PRA1-Domänen Familienmitglied 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
PWP2	Periodisches Tryptophan Protein 2 Homolog	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
QSOX2	Quiescin Q6 Sulfhydryl-Oxidase 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021

## ERGEBNISSE

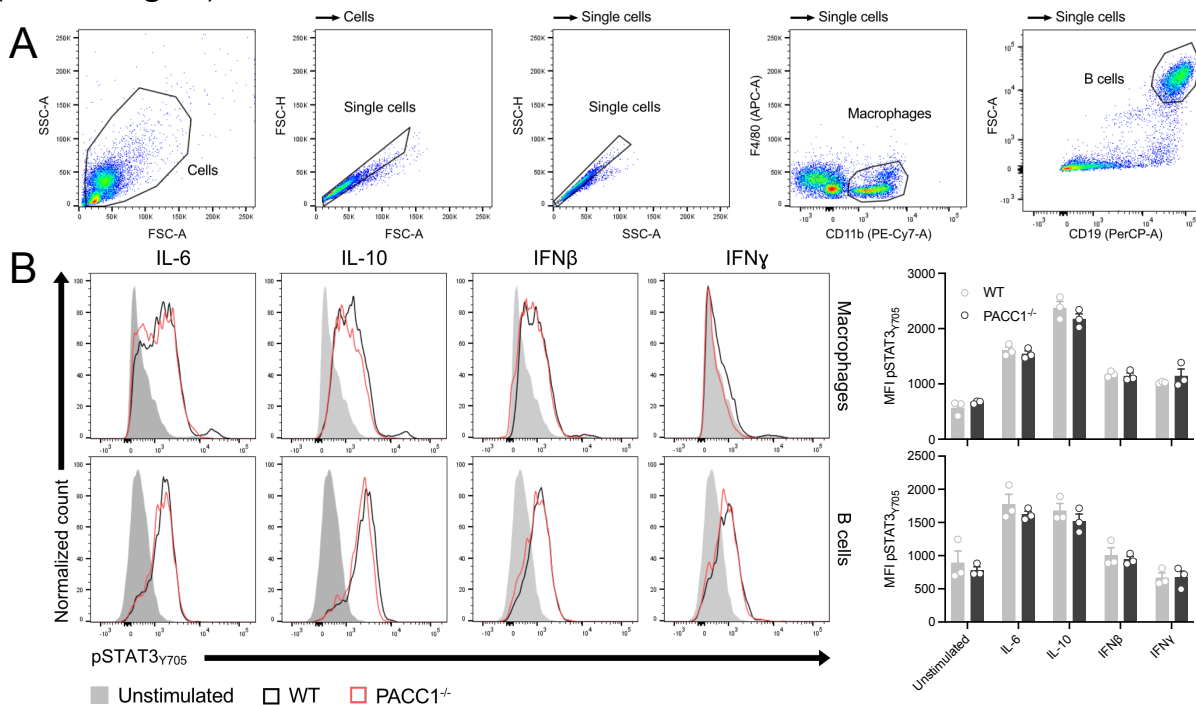
Abkürzung	Protein	Organismus	Methode	Datensatz
<a href="#">RAB9B</a>	Ras-assoziiertes Protein 9B	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RABGAP1</a>	RAB GTPase aktivierendes Protein 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RANBP6</a>	RAN-bindendes Protein 6	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RAP1B</a>	Mitglied der RAS-Onkogenfamilie	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RBM14-RBM4</a>	RBM14-RBM4-Durchsicht	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RDH14</a>	Retinol-Dehydrogenase 14	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RINT1</a>	RAD50 Interactor 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">RRP1</a>	Ribosomale RNA-Verarbeitung 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
<a href="#">SAAL1</a>	Serum Amyloid A-ähnliches 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">SACM1L</a>	SAC1-ähnliche Phosphatidylinositol-Phosphatase	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
<a href="#">SEC22A</a>	SEC22 Vesikel-Transportprotein Homolog A	<i>Homo sapiens</i>	Zwei-Hybrid-System	Luck et al., 2020
<a href="#">SGPL1</a>	Sphingosin-1-Phosphat-Lyase 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">STAG1</a>	Stromales Antigen 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
<a href="#">STAT3</a>	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017
<a href="#">STX7</a>	Syntaxin 7	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
<a href="#">TBC1D15</a>	TBC1-Domäne Familienmitglied 15	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TBRG4</a>	Transformierender Wachstumsfaktor Beta-Regulator 4	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">THADA</a>	Schilddrüsenadenom-assoziiert	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TMEM147</a>	Transmembranprotein 147	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie Zwei-Hybrid-System	Huttlin et al., 2017 Luck et al., 2020 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TMEM222</a>	Transmembranprotein 222	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TMEM38B</a>	Transmembranprotein 38B	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TMEM68</a>	Transmembranprotein 68	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TNPO1</a>	Transportin 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
<a href="#">TNPO2</a>	Transportin 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TNPO3</a>	Transportin 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TSPAN5</a>	Tetraspanin 5	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
<a href="#">TTYH1</a>	Tweety Familienmitglied 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021/ pre-pub
<a href="#">TTYH3</a>	Tweety Familienmitglied 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">TUBGCP2</a>	Gamma-Tubulin-Komplex Komponente 2	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
<a href="#">UFL1</a>	UFM1-spezifische Ligase 1	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021

Abkürzung	Protein	Organismus	Methode	Datensatz
USP22	Ubiquitinspezifische Peptidase 22	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
USP30	Ubiquitinspezifische Peptidase 30	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
VAC14	Vac14 Homolog	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2021
VAMP3	Vesikel-assoziiertes Membranprotein 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
WDR3	WD-Wiederholungen enthaltendes Protein 3	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
XPO4	Exportin 4	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
XPO7	Exportin 7	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021
ZACN	Zink-aktivierter Ionenkanal	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2015
ZWILCH	Zwilch Kinetochor	<i>Homo sapiens</i>	Affinitätsbindung-Massenspektrometrie	Huttlin et al., 2017 Huttlin et al., 2021

Humane Proteine sind blau, virale SARS-CoV-2 Proteine gelb markiert. Die Daten stammen aus BioGrid (<https://thebiogrid.org>, Stark et al., 2006).

## 8.5 Die Phosphorylierung von STAT3<sub>Y705</sub> ist unabhängig von PACC1

STAT3 ist ein mutmaßlicher Interaktionspartner von PACC1 (Huttlin et al., 2017) und ist an der Signaltransduktion von Zytokinen in den Zellkern beteiligt (Hu et al., 2021). Die Ligandenbindung löst die Dimerisierung des Zytokinrezeptors aus, gefolgt von der Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten JAKs und schließlich der Cisphosphorylierung der SH2-Rezeptordomänen. STAT Proteine binden an SH2-Domänen und werden ihrerseits durch JAKs phosphoryliert. Aktivierte STATs dissoziieren vom Rezeptor und bilden Homo- oder Heterodimere, die dann in den Zellkern wandern. Dort fungieren STATs als Transkriptionsfaktoren und steuern die Genexpression und epigenetische Veränderungen der Zelle (Hu et al., 2021). Um die PACC1-STAT3-Achse zu untersuchen, wurden peritoneale Makrophagen und B-Zellen von WT und PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen nach peritonealer Lavage mit den Zytokinen IL-6, IL-10, IFN $\beta$ , die mittels STAT3 signalisieren, und mit IFN $\gamma$  stimuliert. Anschließend wurde der Aktivierungsstatus von STAT3 mittels durchflusszytometrischer Analyse der Tyrosin<sup>705</sup>-Phosphorylierung untersucht. Als Ergebnis, wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden (Abbildung 15).



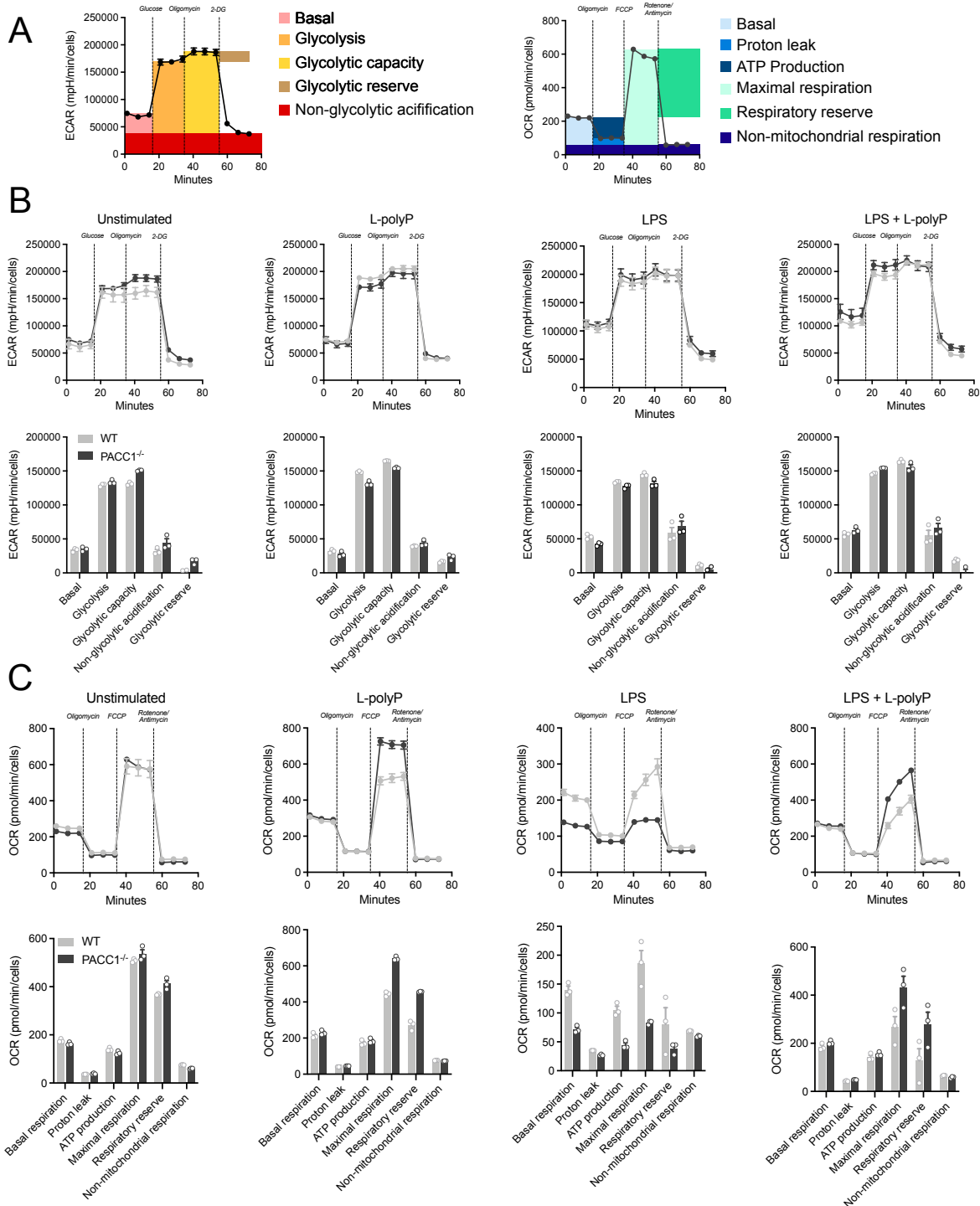
**Abbildung 15 | PACC1 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3**  
**A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von peritonealen Makrophagen und B-Zellen mittels Durchflusszytometrie. **B** 0,5x10<sup>6</sup> Peritonealzellen wurden für 45 Minuten mit IL-6 (10 ng/mL), IL-10 (10 ng/mL), IFN $\beta$  (500 U/mL) oder IFN $\gamma$  (100 ng/mL) stimuliert. Die Phosphorylierung des STAT3 Proteins wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme und die mittlere Fluoreszenzintensität von pSTAT3<sub>Y705</sub>. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt und wurden mit einem multiplen ungepaarten t-Test analysiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

## 8.6 PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigen einen veränderten Metabolismus nach mikrobieller Aktivierung

Immunzellen sind in der Lage, ihren Stoffwechsel an ihre Effektorfunktionen anzupassen, um diese zu unterstützen. Das Protein mTOR ist dabei ein Schlüsselregulator im Immunmetabolismus (Liu & Sabatini, 2020) und ein mutmaßlicher Bindungspartner von PACC1 (Huttlin et al., 2017, Huttlin et al., 2021). Um den Einfluss von PACC1<sup>-/-</sup> auf die Fähigkeit zur Regulation des Immunstoffwechsels zu untersuchen, wurden peritoneale Makrophagen mit LPS, langkettigen Polyphosphaten oder einer Kombination aus beiden stimuliert. LPS aktiviert Makrophagen und induziert metabolische Veränderungen (Jung et al., 2019). Langkettige Polyphosphate wurden zuvor als Bindungspartner von PACC1 identifiziert und sind als Phosphatreservoir am Stoffwechsel von Bakterien beteiligt (Kulaev & Kulakovskaya, 2000). Anschließend wurde die extrazelluläre Ansäuerung als Maß für die Glykolyse und der Sauerstoffverbrauch als Parameter für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) verwendet (**Abbildung 16A**).

Beim glykolytischen Stresstest werden die Zellen zunächst in glucose- und pyruvatfreiem Medium kultiviert, um den pH-Wert des Mediums zu messen, bevor eine gesättigte Glucoselösung zugegeben wird. Dies führt zur Metabolisierung der Glukose und zur Ansäuerung des Mediums. Durch Zugabe von Oligomycin wird die mitochondriale ATP-Synthase gehemmt. Die zelluläre Energieproduktion wird dann auf die Glykolyse verlagert und dient als Parameter für die maximale Glykolysekapazität. Durch Zugabe des Glucoseanalogons 2-Desoxy-D-glucose (2-DG) wird die Glykolyse durch kompetitive Bindung um das Enzym Hexokinase gestoppt (**Abbildung 16A**). WT und PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigten in allen glykolytischen Parametern unter nativen Bedingungen und unter dem Einfluss der verschiedenen Stimuli nur geringe Unterschiede (**Abbildung 16B**). Beim mitochondrialen Stresstest wird zunächst der basale Sauerstoffverbrauch bestimmt, bevor durch Injektion von Oligomycin die ATP-Synthase gehemmt wird. Dadurch wird die Elektronentransportkette gestört und der gemessene Sauerstoffverbrauch sinkt. FCCP ist ein Entkoppler, der den passiven Rückfluss der Protonen entlang des zuvor in der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten durch die Membran ermöglicht. Somit kann der maximale Sauerstoffverbrauch und die respiratorische Reserve als Differenz zwischen basaler und maximaler Ausnutzung bestimmt werden. Abschließend wird ein Gemisch aus Rotenon und Antimycin zugegeben, das

die Komplexe I und III der Atmungskette hemmt und damit die OXPHOS vollständig beendet. Der gemessene Sauerstoffverbrauch nach der letzten Injektion spiegelt die nicht-mitochondriale Atmung wider (**Abbildung 16A**). Unter unstimulierten



**Abbildung 16 | PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen haben keine veränderte Glykolyse, aber eine veränderte OXPHOS nach Stimulation mit LPS und langkettigen Polyphosphaten**

**A** Schematische Darstellung der glykolytischen und oxidativen Stressprofile. **B+C** 1,4x10<sup>5</sup> peritoneale Makrophagen wurden 1 Stunde mit langkettigen Polyphosphaten (75 µM) vorbehandelt und dann 16 Stunden mit LPS (100 ng/mL) stimuliert. Die extrazelluläre Ansäuerungsrate (**B**) und die Sauerstoffverbrauchsrate (**C**) wurden am Seahorse-Instrument gemessen und auf die Zellzahl normiert (WT: schwarz; PACC1<sup>-/-</sup>: grau). Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von gepoolten Zellen von n=4 (**B**) und n=3 (**C**) Mäusen/Gruppe dargestellt.

Bedingungen zeigten WT und PACCC1<sup>-/-</sup> Makrophagen keine Unterschiede in der OXPHOS. Langkettige Polyphosphate erhöhten die maximale Atmung und die Reserve in PACCC1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT um ca. 30%. Im Gegensatz dazu reduzierte die LPS Stimulation die basale und maximale Respiration (ca. -55%), die Reserve (ca. -50%) und die ATP-Produktion (ca. -60%) in PACCC1<sup>-/-</sup> drastisch. Eine Kombination von LPS und langkettigen Polyphosphaten ähnelte dem Phänotyp der Polyphosphat Stimulation, in der die maximale Atmung (ca. 60%) und die Reserve (ca. 120%) in PACCC1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT erhöht waren (**Abbildung 16C**).

## 8.7 PACC1<sup>-/-</sup> Immunzellen haben veränderte ROS-Konzentrationen unter unstimulierten Bedingungen und nach mikrobieller Aktivierung

ROS entstehen als Teil der mitochondrialen Atmung der OXPHOS des Zellstoffwechsels und aktivierte Phagozyten bilden ROS zur Bekämpfung von Mikroben (Sies & Jones, 2020). Die qualitative Menge an zellulären ROS wurde mit dem Indikator DHR123 untersucht, der nicht fluoresziert und passiv durch Membranen diffundiert. DHR123 wird erst durch Oxidation mit ROS fluoreszent. Um zu untersuchen, ob PACC1<sup>-/-</sup> Zellen unter unstimulierten Bedingungen oder nach mikrobieller Aktivierung eine veränderte Menge an ROS produzieren, wurden

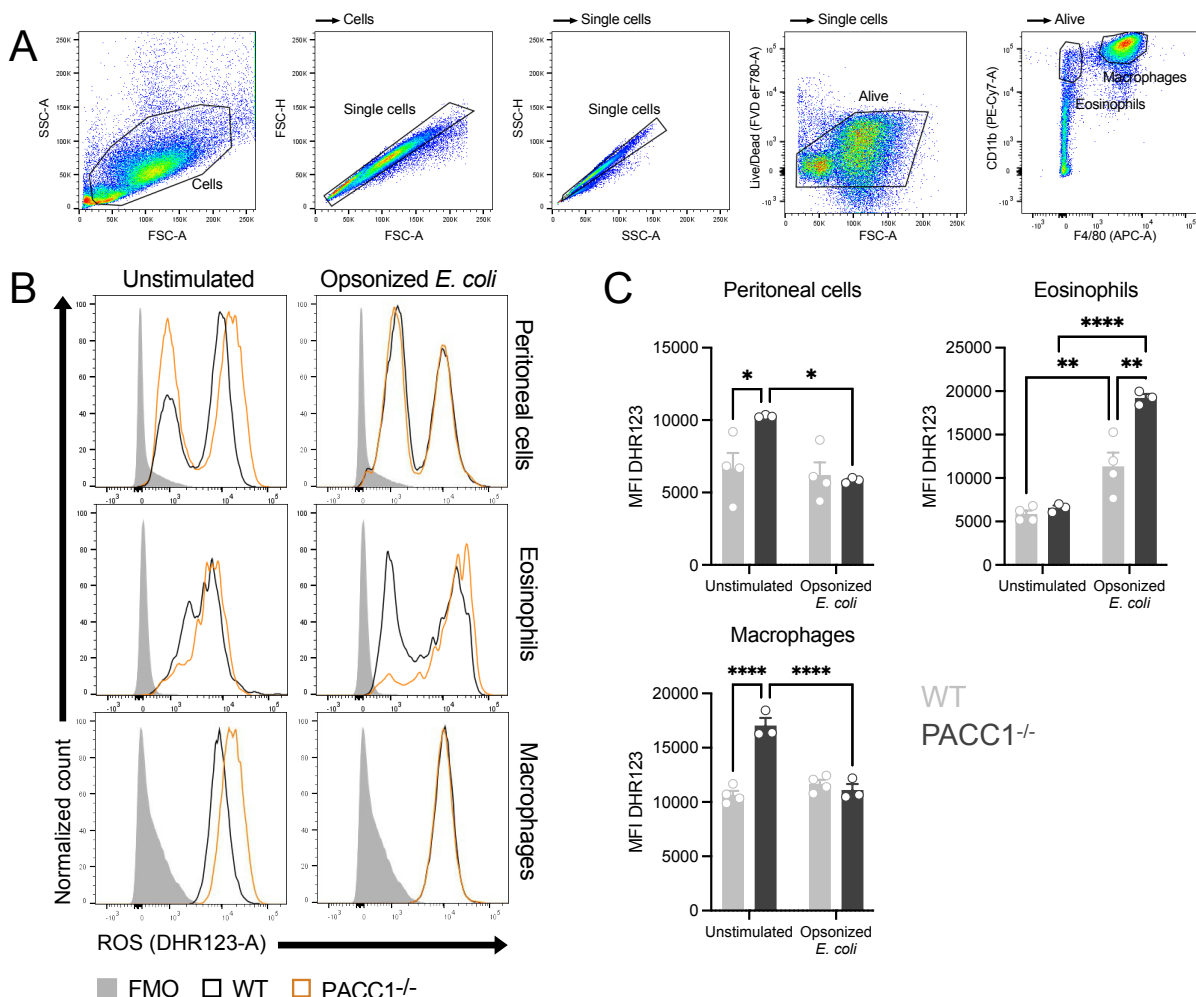


Abbildung 17 | **PACC1<sup>-/-</sup> Immunzellen haben veränderte ROS-Konzentrationen**

**A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von peritonealen Makrophagen und Eosinophilen mittels Durchflusszytometrie.  $1 \times 10^6$  Peritonealzellen wurden mit  $2-4 \times 10^7$  opsonisierten *E. coli* für 10 Minuten stimuliert, gefolgt von der Zugabe von DHR123 für weitere 10 Minuten. **B** Repräsentative Histogramme der Fluoreszenzintensität des ROS-Indikators DHR123. **C** Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus mit  $n=3-4$  Mäusen/Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die Daten wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit folgenden Signifikanzniveaus ausgewertet: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Keine Signifikanz bei  $p > 0,05$ .

peritoneale Zellen von Mäusen entnommen und mit opsonierten *E. coli* Bakterien aktiviert. Die mittlere Fluoreszenzintensität von oxidiertem DHR123 wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dabei zeigten PACCC1<sup>-/-</sup> Peritonealzellen und Makrophagen unter unstimulierten Bedingungen etwa doppelt so hohe ROS-Werte wie der WT (ca. 55% bzw. 60%). Die Aktivierung mit opsonierten *E. coli* in diesen Zelltypen senkte die ROS-Werte auf WT Niveau. PACCC1<sup>-/-</sup> Eosinophile zeigten keine Veränderung der basalen ROS-Werte im Vergleich zu WT, produzierten aber nach Aktivierung signifikant mehr ROS als die Kontrollgruppe (ca. 70%) (**Abbildung 17**).

## 8.8 PACC1 ist an der intrazellulären Ansäuerung während der Phagozytose von Mikroben beteiligt

PACC1 ist ein Membranprotein, das an der Regulation des endosomalen pH-Wertes beteiligt ist (Osei-Owusu et al., 2021). Aufgrund der hohen Expression von PACC1 in Phagozyten und der Aktivierung bei niedrigem pH-Wert sollte untersucht werden, ob PACC1 auch über die Regulation des intrazellulären pH-Wertes an der Phagozytose beteiligt ist. Dazu wurden WT und PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse intraperitoneal mit inaktivierten *E. coli* Bakterien injiziert, die mit dem pH-sensitiven Farbstoff pHrodo grün konjugiert waren. Bei neutralem pH ist der Farbstoff nicht fluoreszierend. Nach Aufnahme des Konjugats dient der Farbstoff als Indikator für die intrazelluläre Ansäuerung. Die Untersuchung wurde mit einem Durchflusszytometer durchgeführt.

PACC1<sup>-/-</sup> Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten und Neutrophile zeigten nach 24 Stunden eine geringere mittlere Fluoreszenzintensität des Farbstoffs pHrodo grün im Vergleich zu WT. Dabei zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Neutrophile, normalisiert auf WT Neutrophile, den größten Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität (-26,2%), gefolgt von Makrophagen (-17,6%) und Monozyten (-15,7%) (**Abbildung 18A-D**). Im Vergleich zu WT zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse eine etwa zweieinhalbfach erhöhte signifikante Anzahl an Monozyten. Die Anzahl der Neutrophilen und Makrophagen war in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht, aber nicht signifikant (**Abbildung 18E**).

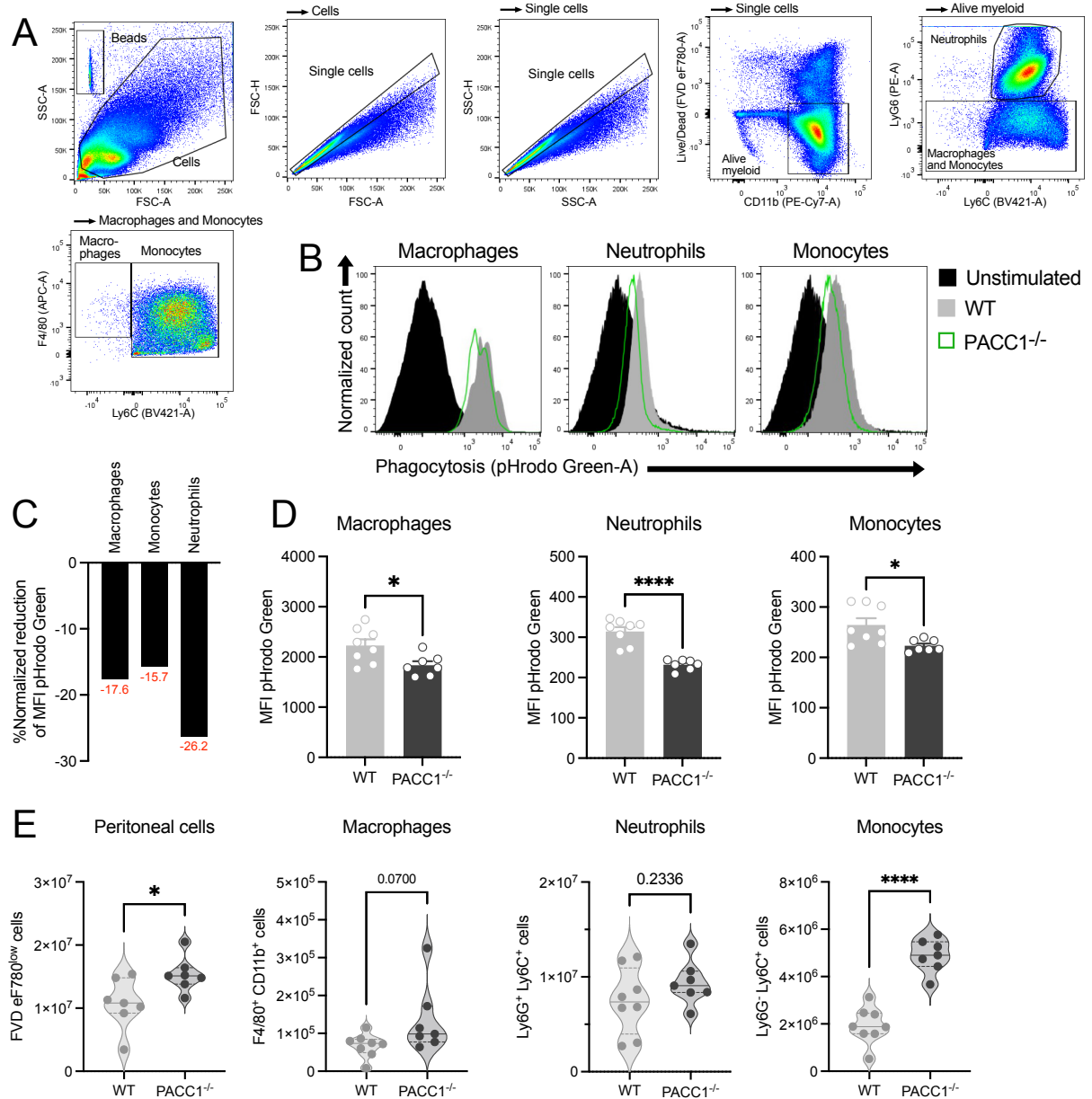


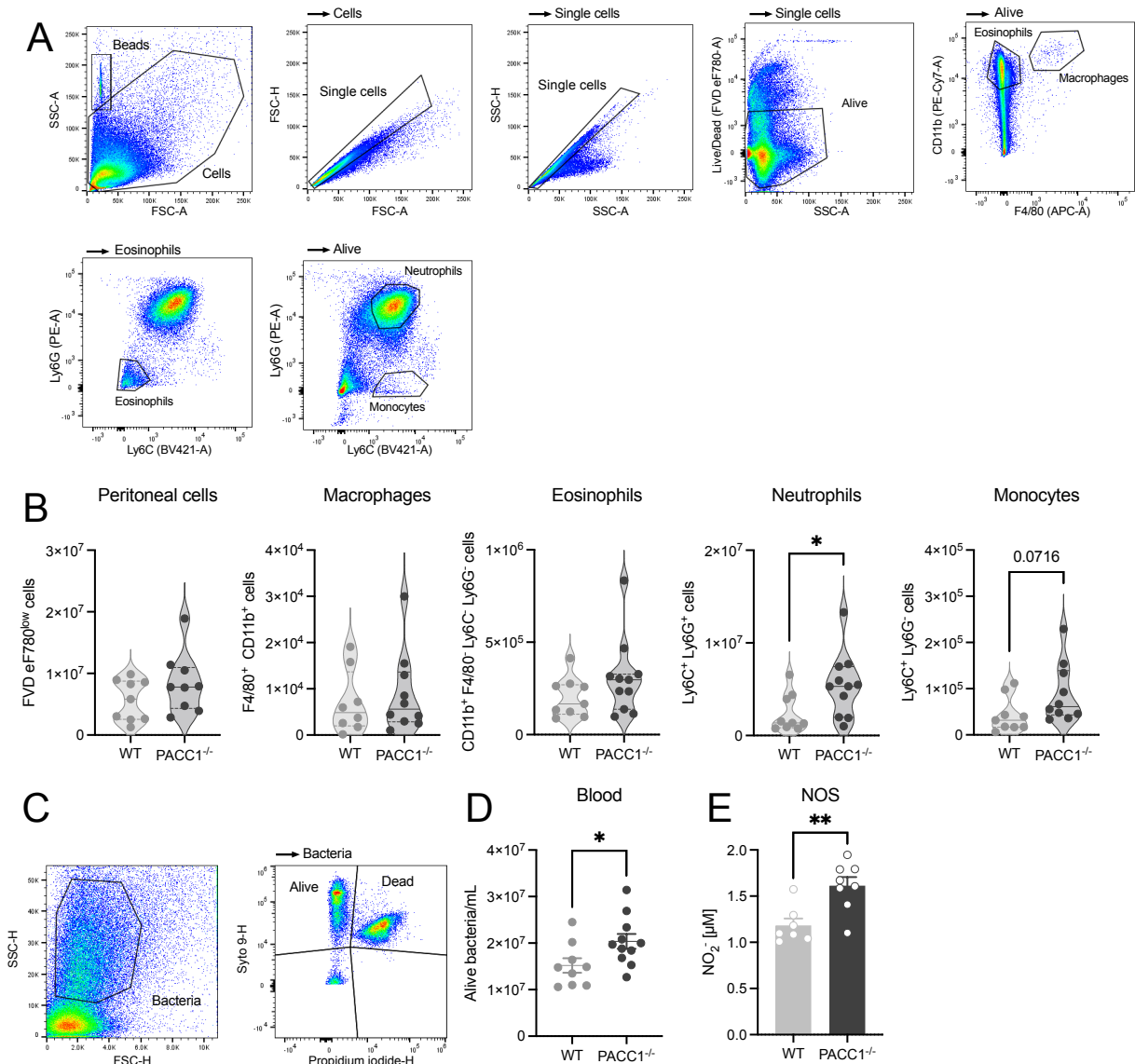
Abbildung 18 | **PACC1<sup>-/-</sup> Phagozyten zeigen eine verminderte intrazelluläre Ansäuerung und PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse eine verstärkte Rekrutierung von Immunzellen ins Peritoneum**

*E. coli* pHrodo grün Konjugate (100 µg) wurden Mäusen intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurde Peritoneallavage gesammelt und die Fluoreszenz des pH-sensitiven Farbstoffs pHrodo grün mittels Durchflusszytometrie untersucht. **A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von peritonealen Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie. **B-D** Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität von pHrodo grün als repräsentative Histogramme (**B**), als auf WT normalisierte Werte (**C**), und als Balkendiagramme (**D**). **E** Peritonealzellen wurden mit Hilfe von Zählkügelchen durchflusszytometrisch quantifiziert. Jeder Datenpunkt steht für eine Maus mit n=6-7 Mäusen/Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Daten (D+E) wurden mit einem ungepaarten t-Test mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05.

## 8.9 PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine erhöhte Entzündung und mikrobielle Belastung während einer *E. coli* Infektion

Anschließend zum Nachweis einer veränderten intrazellulären Ansäuerung bei PACC1<sup>-/-</sup> Phagozyten und einer erhöhten Immunzellpopulation im Peritoneum sollte darauf aufbauend die Rolle von PACC1 im Infektionsgeschehen näher untersucht werden. Dazu wurden statt eines Konjugats aus inaktivierten *E. coli* und dem Fluoreszenzfarbstoff pHrodo grün diesmal lebende *E. coli* Bakterien intraperitoneal appliziert. Dies führt zur Entwicklung einer monomikrobiellen Sepsis. Ansonsten war der Versuchsaufbau identisch. Ein weiterer Grund für die Verwendung dieses Infektionsmodells ist die hohe Anzahl gewebeständiger Makrophagen im Peritoneum, in denen die Rolle von PACC1 bei der Phagozytose und im angeborenen Immunsystem im Allgemeinen untersucht werden sollte.

24 Stunden nach der Infektion mit lebenden *E. coli* Bakterien wurde das Peritoneum lavagiert und die Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen eine signifikant erhöhte Anzahl von Neutrophilen auf, während die Populationen von Eosinophilen, Monozyten und Makrophagen vergleichbar bzw. nur tendenziell waren (**Abbildung 19A+B**). Die peritoneale Lavage und das retroorbitale Blut wurden mittels Durchflusszytometer auf die mikrobielle Belastung untersucht. Dabei zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant erhöhte Zahl von *E. coli* Bakterien im Blut (**Abbildung 19C+D**). Aktivierte Immunzellen produzieren antimikrobielle reaktive Stickstoffmonoxide (NOS) und geben diese an die Umgebung ab. Diese NOS oxidieren zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), das mittels Griess-Tests bestimmt wurde. Die Peritoneallavage von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte signifikant erhöhte Nitritwerte (**Abbildung 19E**).



**Abbildung 19 | PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine höhere mikrobielle Belastung und höhere Zahlen von rekrutierten Neutrophile bei einer *E. coli* Infektion**

Mäuse wurden intraperitoneal mit *E. coli* ( $9,3 \times 10^8$  CFU/Maus) infiziert. Nach 24 Stunden wurden Peritoneallavage und retroorbitales Blut gesammelt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. **A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von peritonealen Makrophagen, Monozyten, Eosinophilen und Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie. **B** Anzahl peritonealer Immunzellpopulationen. **C** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung der Bakterien im Blutplasma. **D** Anzahl der Bakterien im Blutplasma. **E** Die Nitritkonzentration in der Peritoneallavage wurde mittels Griess-Test bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus mit n=9-11 Mäusen/Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Ausreißer wurden mit der ROUT-Methode mit einer maximalen Falscherkennungsrate von Q=1% identifiziert. Die Daten wurden mit einem ungepaarten t-Test mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,001, \*\*\*\*p $\leq$ 0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05.

## 8.10 PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen größeren Lungenschaden, eine erhöhte Entzündung und Mortalität während einer *S. pneumoniae* Infektion

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Beteiligung von PACC1 an der bakteriellen Immunabwehr auf eine bestimmte Erregerklasse beschränkt ist oder ob es sich um eine allgemeinere Beteiligung gegen eine Vielzahl von Erregern handelt. Aus diesem Grund wurden nach der Untersuchung von PACC1 in der gram-negativen Sepsis mit *E. coli* auch gram-positive bakterielle Infektionen getestet. Dazu wurden WT und PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse intranasal mit dem Bakterium *S. pneumoniae* infiziert. Dies führt zur Entwicklung einer Lungenentzündung. Auch in dieser Infektion spielen geweberesidente Makrophagen in den Alveolen eine wichtige Rolle bei der initialen Immunantwort.

18 Stunden nach der Infektion wurden die Immunzellen in der bronchoalveolären Lavage mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl aller gemessenen Immunzellpopulationen, einschließlich Makrophagen, Neutrophilen, Monozyten und Eosinophilen (**Abbildung 20A+B**). Die bronchoalveoläre Lavage wurde auf Blutagarplatten ausgestrichen und die Bakterienkolonien am nächsten Tag gezählt. Dabei wiesen die PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse einen klaren Trend für eine erhöhte mikrobielle Belastung auf. Als Parameter für die Lungenschädigung wurde die Gesamtproteinkonzentration mittels Pierce BCA-Test bestimmt, da eine Lungenentzündung zu einer erhöhten Durchlässigkeit der endothelialen-epithelialen Barriere und damit zu einem Einstrom von Proteinen aus dem Blut führt ([Aman et al., 2011](#)). Hier zeigten die PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant höhere Proteinkonzentration als die WT Mäuse (**Abbildung 20C**), was einem größeren Lungenschaden gleichkam. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von Nitrit, als Parameter für die Sekretion reaktiver Stickstoffmonoxide, in der bronchoalveolären Lavage der PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse nicht signifikant niedriger als in den WT Mäusen (**Abbildung 20D**).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob PACC1 auch einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit während einer bakteriellen Infektion hat. Dazu wurden die Mäuse mit *S. pneumoniae* infiziert und über einen Zeitraum von zwei Wochen beobachtet. Dabei zeigten die PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse nach drei Tagen einen signifikant höheren Gewichtsverlust (ca. -20%) als die WT Mäuse (ca. -5%), der positiv mit einer erhöhten Sterblichkeit korrelierte. Während nach zwei Wochen noch die Hälfte der

WT Mäuse am Leben war (ca. 55%), betrug die Überlebenswahrscheinlichkeit der PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse nur etwa 10% (Abbildung 20E+F).

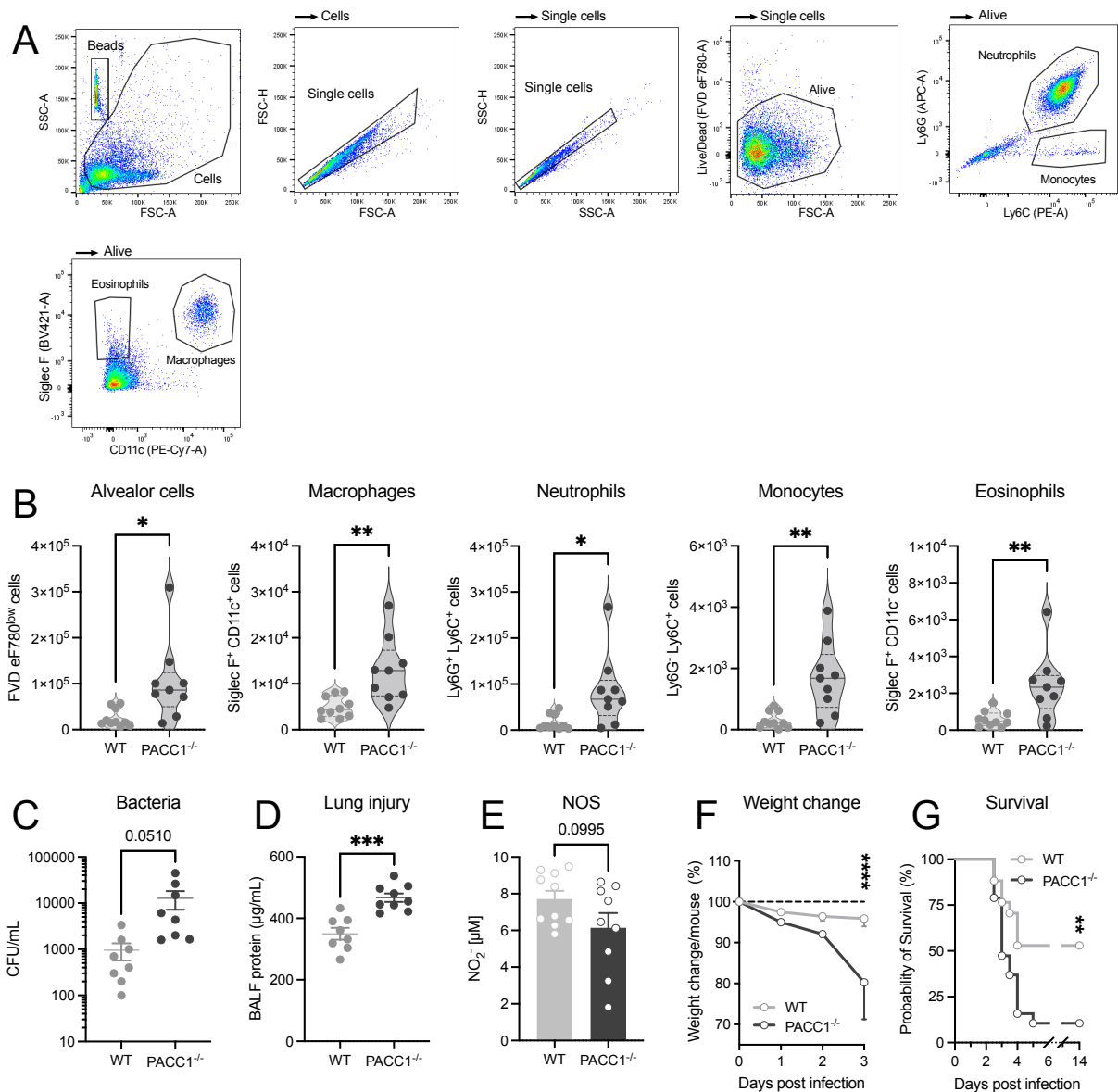
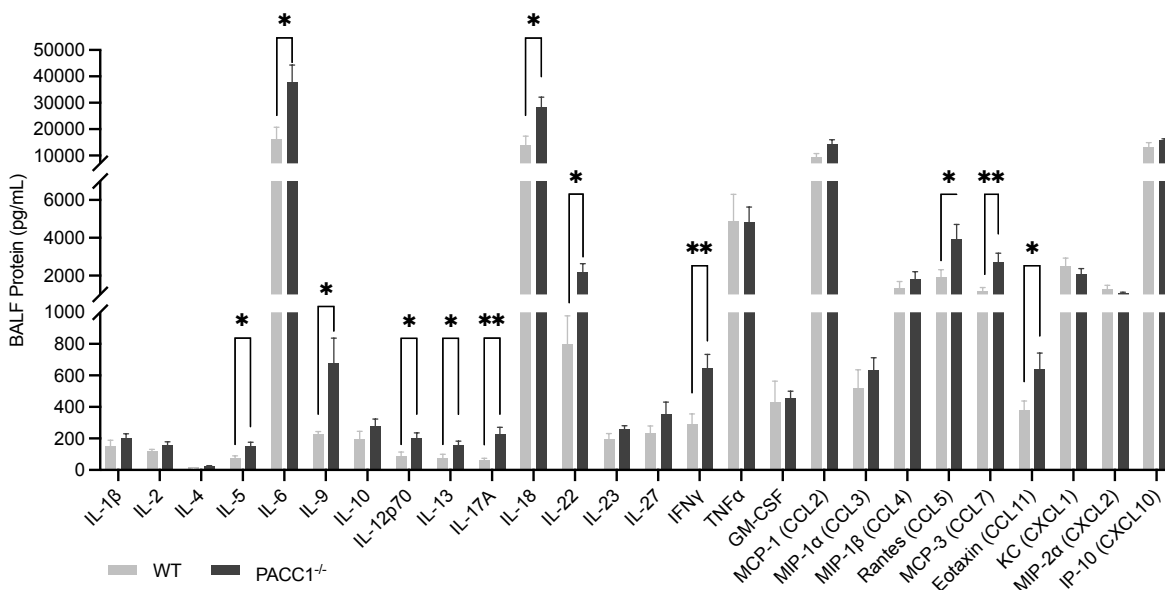


Abbildung 20 | PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen größeren Lungenschaden, mehr rekrutierte Immunzellen und eine höhere Mortalität bei einer Infektion mit *S. pneumoniae*

Mäuse wurden intranasal mit *S. pneumoniae* infiziert ( $2,35 \times 10^6$  CFU/Maus). Nach 18 Stunden wurde bronchoalveoläre Lavage gewonnen und die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. **A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von alveolären Makrophagen, Monozyten, Eosinophilen und Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie. **B** Anzahl alveolärer Immunzellpopulationen. **C** Die bronchoalveoläre Lavage wurde auf eine Blutagarplatte überführt und die Kolonien am folgenden Tag gezählt. **D** Der Grad der Lungenschädigung wurde durch Quantifizierung des Gesamtproteins in der bronchoalveolären Lavage mit dem Pierce BCA-Test bestimmt. **E** Die Nitritkonzentration in der Peritoneallavage wurde mittels Griess-Test bestimmt. **F** Mäuse wurden intranasal mit *S. pneumoniae* ( $1,18 \times 10^6$  CFU/Maus) infiziert und die Gewichtsentwicklung **G** sowie die Überlebenszeit beobachtet. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus mit  $n=9-10$  (B-E) und  $n=17-19$  (F+G) Mäusen/Gruppen. Ausreißer wurden mit der ROUT-Methode mit einer maximalen Falscherkennungsrate von  $Q=1\%$  identifiziert. Die Daten (B-E) wurden mit ungepaartem t-Test, die Gewichtsänderung (F) mit zweifaktorieller Varianzanalyse und die Überlebensrate (G) mit dem Log-Rang-Mantel-Cox-Test mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Keine Signifikanz bei  $p > 0,05$ .

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Zytokine und Chemokine bei der Infektion den oben beobachteten Phänotyp vermitteln. Dazu wurden WT und PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse mit *S. pneumoniae* infiziert und die bronchoalveoläre Lavage einer Multiplex-Analyse unterzogen. Diese Technik erlaubt die gleichzeitige Analyse von ≥26 Proteinen aus einem kleinen Probenvolumen. Im Allgemeinen waren die Konzentrationen der gemessenen Zytokine in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen höher als in WT Mäusen. In einigen Fällen war dieser Trend auch signifikant, unter anderem für die Zytokine IFN $\gamma$  und die Interleukine: IL-5, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-18 und IL-22. Darüber hinaus zeigten auch die Chemokine CCL5, CCL7 und CCL11 signifikante Unterschiede (**Abbildung 21**). Die Zytokinanalyse spiegelt den in den vorangegangenen Infektionsexperimenten beobachteten Phänotyp wider. In PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen sind proinflammatorische Zytokine und Chemokine während einer Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu WT signifikant erhöht. Dies steht im Einklang mit der erhöhten Anzahl von Immunzellen in der Lunge von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen, die zusammen mit den Epithelzellen proinflammatorische Zytokine als Teil der Immunantwort auf die Infektion produzieren.

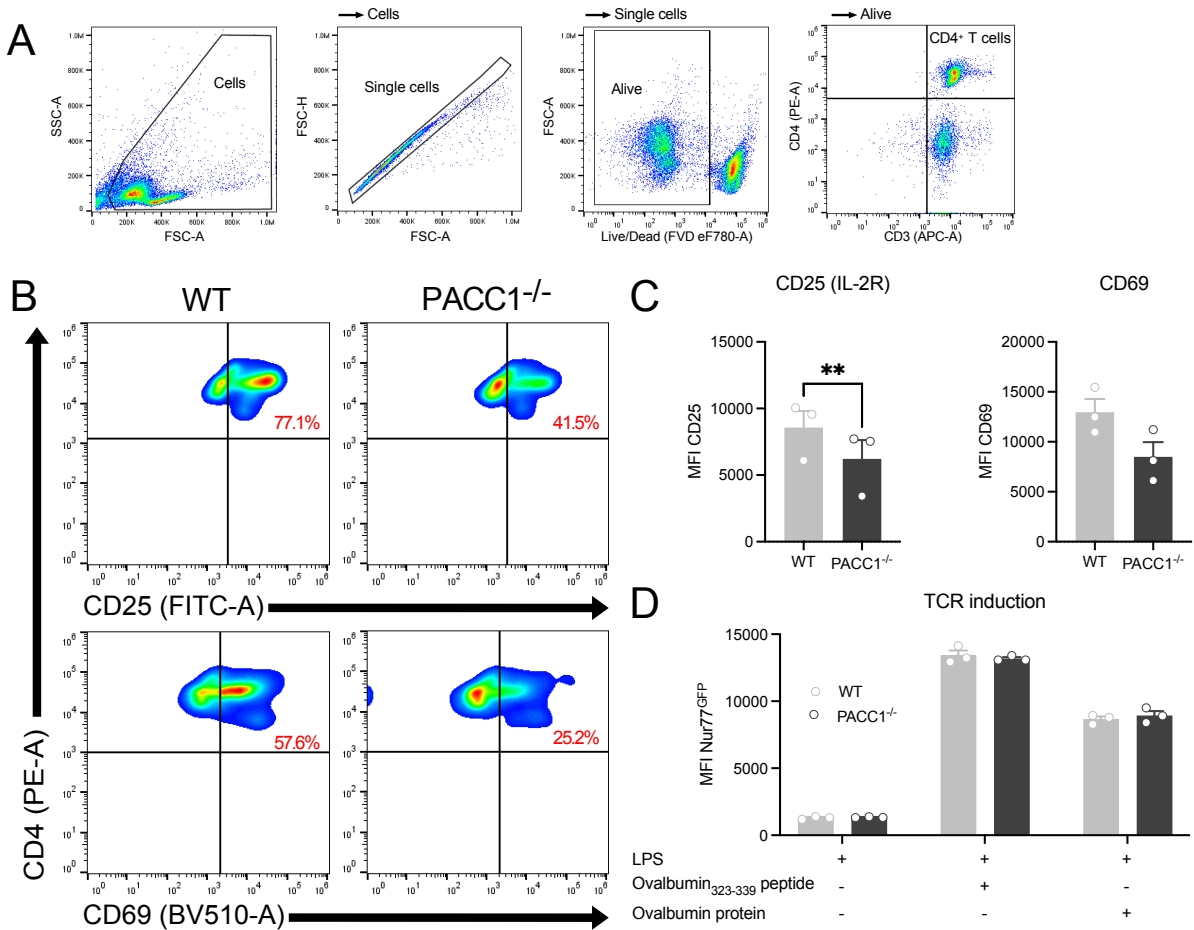


**Abbildung 21 | Erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Lunge von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen bei *S. pneumoniae* Infektion**  
Mäuse wurden intranasal mit *S. pneumoniae* infiziert (2,35x10<sup>6</sup> CFU/Maus). Nach 18 Stunden wurde bronchoalveoläre Lavage entnommen und die Konzentration von Zytokinen und Chemokinen mittels Multiplex-Technik bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus mit n=9-10 Mäusen/Gruppe. Ausreißer wurden mit der ROUT-Methode mit einer maximalen Falscherkennungsrate von Q=1% identifiziert. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test geprüft und mit folgenden Signifikanzniveaus angegeben: \*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,001, \*\*\*\*p $\leq$ 0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05.

### 8.11 PACC1<sup>-/-</sup> dendritische Zellen sind weniger effizient bei der Induktion früher T-Zell-Aktivierungsmarker

Antigenpräsentierende Zellen initiieren die adaptive Immunantwort, indem sie bei einer Infektion Mikroben phagozytieren und CD4<sup>+</sup> T-Zellen mikrobielle Antigene auf MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Ist ein TCR spezifisch für das präsentierte Antigen, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle (Neeffjes et al., 2011). Dendritische Zellen weisen eine hohe Expression von *Pacc1* auf und eignen sich daher gut, um zu untersuchen, inwieweit PACC1 an der Antigenpräsentation und damit T-Zellaktivierung beteiligt ist. Darüber hinaus wurde HLA-DRA, ein MHC-II-Molekül, als Bindungspartner von PACC1 identifiziert (Huttlin et al., 2015, Huttlin et al., 2021) (**Tabelle 3**).

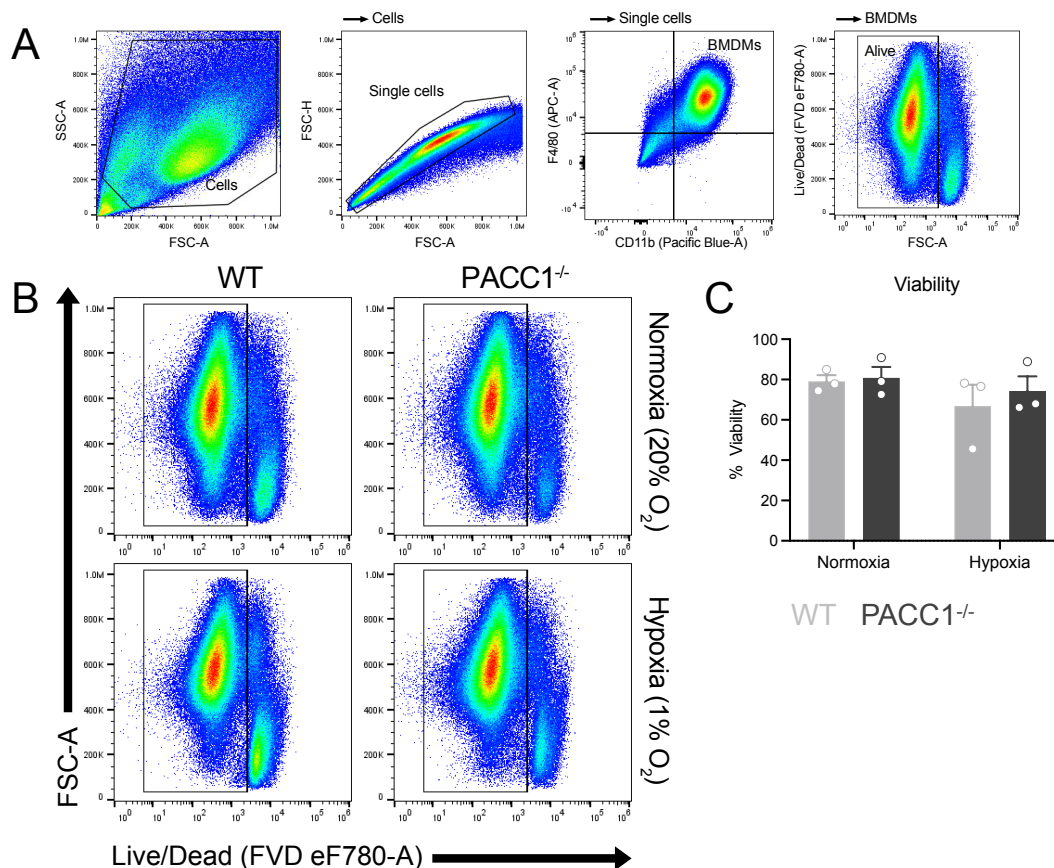
Dendritische Zellen aus der Milz von WT und PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden durch Dichtezentrifugation angereichert. Anschließend wurden die Zellen mit LPS aktiviert und mit dem Protein Ovalbumin inkubiert. T-Zellen aus der Milz von OT-II Mäusen besitzen einen TCR, der spezifisch für das Peptid Ovalbumin<sub>323-339</sub> ist, welches nach Prozessierung durch dendritische Zellen auf den MHC-II-Rezeptor geladen und präsentiert wird. T-Zellen und dendritische Zellen wurden gemeinsam inkubiert und anschließend die Expression der frühen Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigte sich, dass T-Zellen, die mit PACC1<sup>-/-</sup> dendritischen Zellen inkubiert wurden, eine geringere Expression der Aktivierungsmarker aufwiesen. Für CD69 zeigte sich ein Trend, während CD25 ebenfalls signifikant weniger exprimiert wurde (**Abbildung 22A-C**). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der beobachtete Effekt auf die Bindungsstärke des TCR:MHC-II-Komplexes zurückzuführen ist. Der experimentelle Ablauf folgte dem vorhergehenden Experiment mit der Ausnahme, dass diesmal T-Zellen aus der Milz von OT-IIxNur77<sup>GFP</sup> Mäusen verwendet wurden. Diese Mäuse exprimieren GFP unter der Kontrolle des Nur77-Promotors, der wiederum nach Induktion des TCR aktiviert wird. Die Fluoreszenz von Nur77<sup>GFP</sup> dient als Indikator für die Stärke der TCR-Aktivierung (Moran et al., 2011). Dabei konnten keine Unterschiede zwischen WT und PACC1<sup>-/-</sup> dendritischen Zellen beobachtet werden. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit dem Peptid Ovalbumin<sub>323-339</sub>, das nicht intrazellulär prozessiert werden muss, sondern sofort auf den MHC-II-Rezeptor geladen werden kann und sich so einer phagolysosomalen Ansäuerung unter möglicher Beteiligung von PACC1 entzieht (**Abbildung 22D**).



**Abbildung 22 | PACC1<sup>-/-</sup> dendritische Zellen induzieren die Expression der frühen T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD69 unabhängig von der Stärke der TCR:MHC-II-Interaktion weniger stark**  
 Dendritische Zellen aus der Milz wurden durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert und 24 Stunden mit LPS (100 ng/mL) stimuliert. Die aktivierten dendritischen Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit dem Protein Ovalbumin (100 µg/mL) oder dem Peptid Ovalbumin<sub>323-339</sub> inkubiert. T-Zellen aus der Milz von OT-II oder OT-IxNur77<sup>GFP</sup> Mäusen wurden durch magnetische Aufreinigung angereichert und für 24 Stunden mit den dendritischen Zellen inkubiert. Die frühen T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 und CD69 bzw. Nur77<sup>GFP</sup> als Indikator für die Stärke der TCR-Aktivierung wurden durchflusszytometrisch analysiert. **A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. **B** Repräsentative Diagramme der Expressionsstärke von CD25 und CD69 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. **C** Balkendiagramme der mittleren Fluoreszenzintensität von CD25, CD69 und **D** Nur77<sup>GFP</sup>. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus. Dendritische Zellen wurden von n=1-2 (C) und n=4 (D) Mäusen/Gruppe entnommen. Die Daten wurden mit dem gepaarten t-Test (C) oder dem multiplen ungepaarten t-Test (D) mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \*p≤0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001, \*\*\*\*p≤0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05.

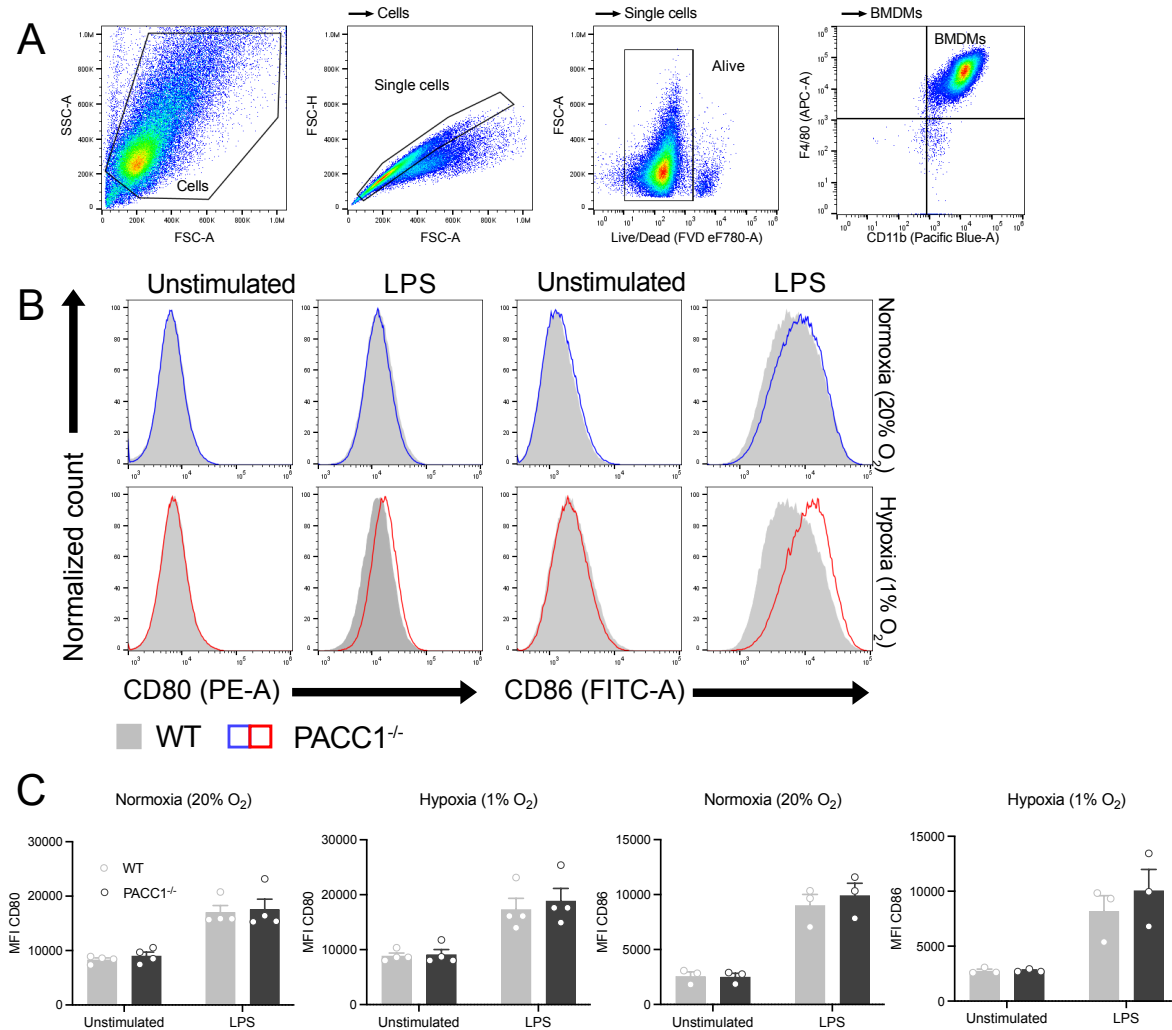
## 8.12 Keine protektive Rolle von PACC1 für das Überleben von Makrophagen unter Hypoxie und keine Veränderung der Expression von kostimulatorischen Aktivierungsmarkern

PACC1 ist am säureinduzierten Zelltod beteiligt, wie er beispielsweise nach einer Ischämie auftreten kann (Ullrich et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2020, Osei-Owusu et al., 2021). Lokal sinkt der Sauerstoffgehalt und es kommt zu einer Übersäuerung des Gewebes. Darüber hinaus ist der *Pacc1* Locus bei Menschen und Schweinen, die sich an die Höhe und damit an die geringere Sauerstoffversorgung angepasst haben, vermehrt mutiert (Yi et al., 2010, Dong et al., 2014). Da es während einer Entzündung auch zu einer lokalen Hypoxie und Azidose kommt, sollte untersucht werden, ob PACC1 auch eine Rolle beim Hypoxie-induzierten Zelltod spielt. Dazu wurden BMDM unter normoxischen (20% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) für zwei Tage kultiviert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der prozentualen Viabilität zwischen WT und PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen (**Abbildung 23**).



**Abbildung 23 | PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigen keine veränderte Viabilität unter Hypoxie**  
 2x10<sup>6</sup> BMDM wurden 48 Stunden lang unter Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) kultiviert. Die Viabilität der Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. **A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von BMDM mittels Durchflusszytometrie. **B** Repräsentative Diagramme und **C** Balkendiagramme der Zellviabilität von n=3 Mäusen/Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Daten wurden mit dem multiplen ungepaarten t-Test mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05.

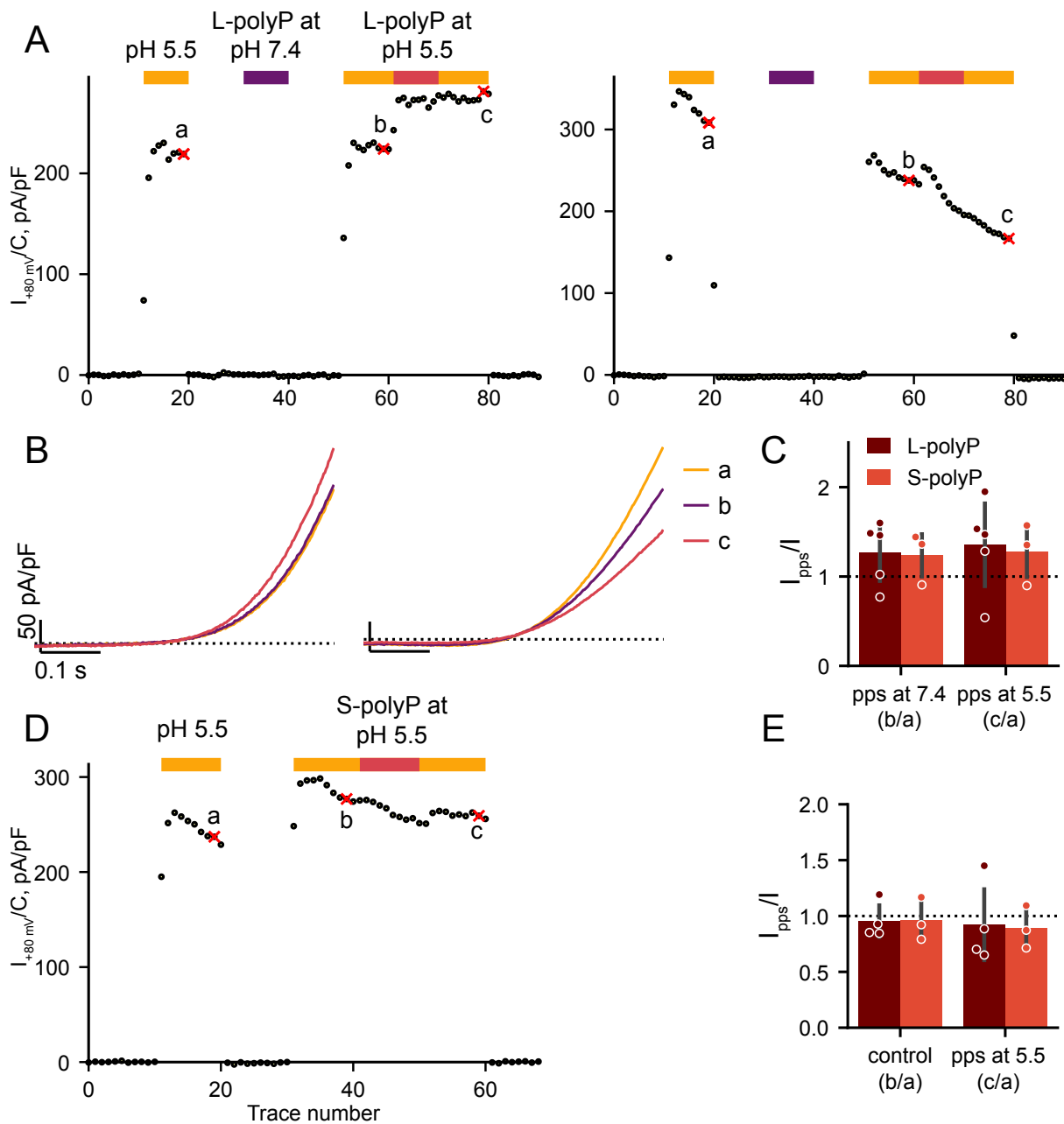
Weiterhin sollte untersucht werden, ob hypoxische Bedingungen einen Einfluss auf die LPS-induzierten Aktivierungsmarker CD80 und CD86 haben, die kostimulatorisch auf die Antigenpräsentation wirken. Dazu wurden BMDM unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit LPS stimuliert und die Expression der Aktivierungsmarker durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigten sich in keiner der möglichen Kombinationen signifikante Unterschiede zwischen WT und PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen (**Abbildung 24**).



**Abbildung 24 | Keine veränderte Expression der kostimulatorischen Aktivierungsmarker CD80 und CD86 in PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen unter Hypoxie**  
 0,5x10<sup>6</sup> BMDM wurden 24 Stunden lang mit LPS (100 ng/mL) stimuliert unter Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>). Die Expression der kostimulatorischen Aktivierungsmarker CD80 und CD86 wurde durchflusszytometrisch analysiert. **A** Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von BMDM mittels Durchflusszytometrie. **B** Repräsentative Histogramme und **C** Balkendiagramme der mittleren Fluoreszenzintensität von CD80 und CD86. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus von n=3-4 Mäusen/Gruppe. Die Daten wurden mittels multiplem ungepaartem t-Test mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05.

### 8.13 Polyphosphate haben keinen Einfluss auf die Aktivität von PACC1

PACC1 wurde durch Affinitätsaufreinigung und Massenspektrometrie in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] als Bindungspartner für langkettige Polyphosphate in Makrophagen identifiziert. Da langkettige Polyphosphate mit der angeborenen Immunantwort in Makrophagen interferieren, indem sie unter anderem die Phagozytose reduzieren (Roewe et al., 2020), und PACC1 an der Regulation der Phagozytose beteiligt sein könnte, stellt PACC1 ein plausibles Ziel für die mikrobielle Immunmodulation durch langkettige Polyphosphate dar. Um zu untersuchen, inwieweit Polyphosphate die Aktivität von PACC1 beeinflussen, wurden HEK293 Zellen durch einen Kollaborationspartner elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht. Dazu wurde an einzelne Zellen eine Spannung angelegt und die Stromänderung bei neutralem pH-Wert (7,4), bei dem PACC1 inaktiv ist, und bei saurem pH-Wert (5,5), bei dem PACC1 aktiv ist, gemessen. Langkettige Polyphosphate mit einer mittleren Kettenlänge von 700 Monophosphaten (L-polyP) wurden entweder bei neutralem pH-Wert (**Abbildung 25A-C**) oder bei saurem pH-Wert (**Abbildung 25D+E**) zugegeben und die Stromänderung bei neutralem und saurem pH-Wert untersucht. Als Kontrolle wurden kurzkettige Polyphosphate mit einer mittleren Kettenlänge von 75 Monomeren (S-polyP) verwendet. Es zeigte sich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die gemessenen Effekte unabhängig vom pH-Wert während der Behandlung und weder durch kurz- noch durch langkettige Polyphosphate signifikant beeinflusst wurden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine längere Präinkubation oder Beschichtung von phagozytierbaren Mikropartikeln mit Polyphosphaten erforderlich ist, damit Polyphosphate in ausreichender Konzentration in die Phagolysosomen gelangen können.



**Abbildung 25 | Weder kurz- noch langkettige Polyphosphate beeinflussen die PACC1 Aktivität**  
 HEK293 Zellen wurden elektrophysiologisch auf ihre PACC1 Aktivität nach Behandlung mit kurzkettingen (S-polyP, 100  $\mu\text{M}$ ) oder langkettigen Polyphosphaten (L-polyP, 100  $\mu\text{M}$ ) mittels ganzzelligem Patch-Clamp untersucht. **A** Die Stromstärke wurde zunächst bei saurem pH-Wert (5,5) gemessen, dann wurden Polyphosphate für 40 Sekunden bei neutralem pH-Wert (7,4) zugegeben und danach wieder ausgespült. Anschließend wurde der pH-Wert wieder angesäuert und die Stromstärke erneut gemessen. **B** Repräsentative Kurven, die durch Anlegen einer Spannung von -80 bis +80 mV zu den Zeitpunkten a, b und c erhalten wurden. **C** Balkendiagramme zeigen das Verhältnis der Stromstärken zwischen den Zeitpunkten a und b. **D+E** Polyphosphate wurden bei saurem pH-Wert für 40 Sekunden exponiert, gewaschen und die Stromstärke anschließend bei saurem pH-Wert gemessen. Die Messungen wurden von [redacted] aus der Arbeitsgruppe von [redacted] am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin durchgeführt.

### 8.14 Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Wirkung bakterieller Polyphosphate auf das intestinale Immunsystem

Polyphosphate sind bakterielle Stoffwechselprodukte mit vielfältigen biologischen Eigenschaften. Im Darm leben eine Vielzahl von Bakterien als Teil des Darmmikrobioms in räumlicher Nähe zu den Immunzellen der Darmschleimhaut, der Lamina propria. Um die Wirkung bakterieller Polyphosphate auf das Immunsystem des Darms zu untersuchen, wurde ein Mausmodell etabliert. Dazu wurden keimfreie Mäuse für 3 Wochen mit zwei verschiedenen Stämmen des Bakteriums *E. coli* kolonisiert. Der Wildtypstamm ist in der Lage, Polyphosphate zu produzieren, während die Mutante eine Defizienz des Polyphosphatkinase 1 Gens ( $\Delta ppk$ ), dem Schlüsselenzym für die bakterielle Synthese von Polyphosphaten, aufweist. *E. coli* kodieren keine *Ppk2* (Neville et al., 2022). Die erfolgreiche Monokolonisierung mit den korrekten Bakterienstämmen wurde auf zwei Arten getestet. Erstens durch PCR-Amplifikation des *Ppk1* Gens aus LB-Kulturen vor der Monokolonisation und aus Kotproben von monokolonisierten Mäusen. Keimfreie (GF) und spezifisch pathogenfreie (SPF) Mäuse wurden als Kontrollen verwendet. Die PCR des WT *Ppk1* Gens ergab eine Bande bei 2067 bp und die der  $\Delta ppk$  Mutante eine Bande bei etwa 450 bp (Abbildung 26A).

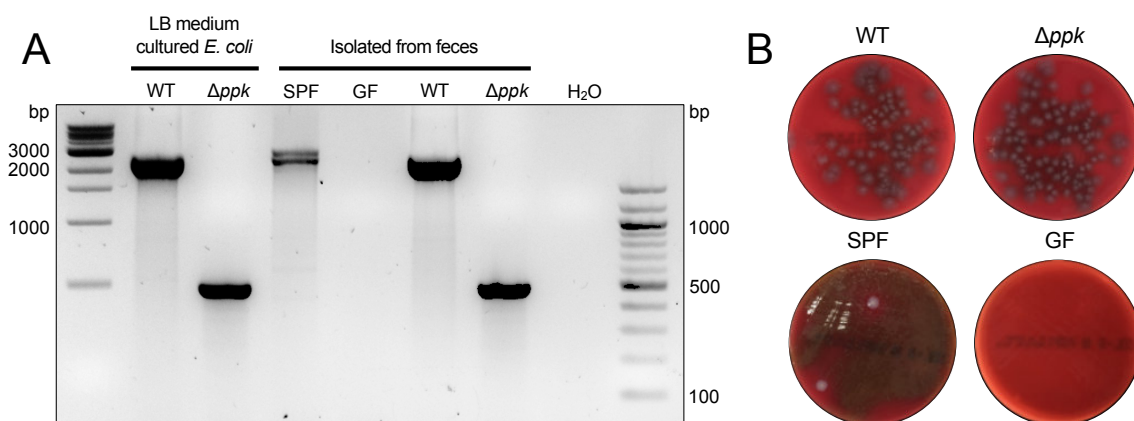


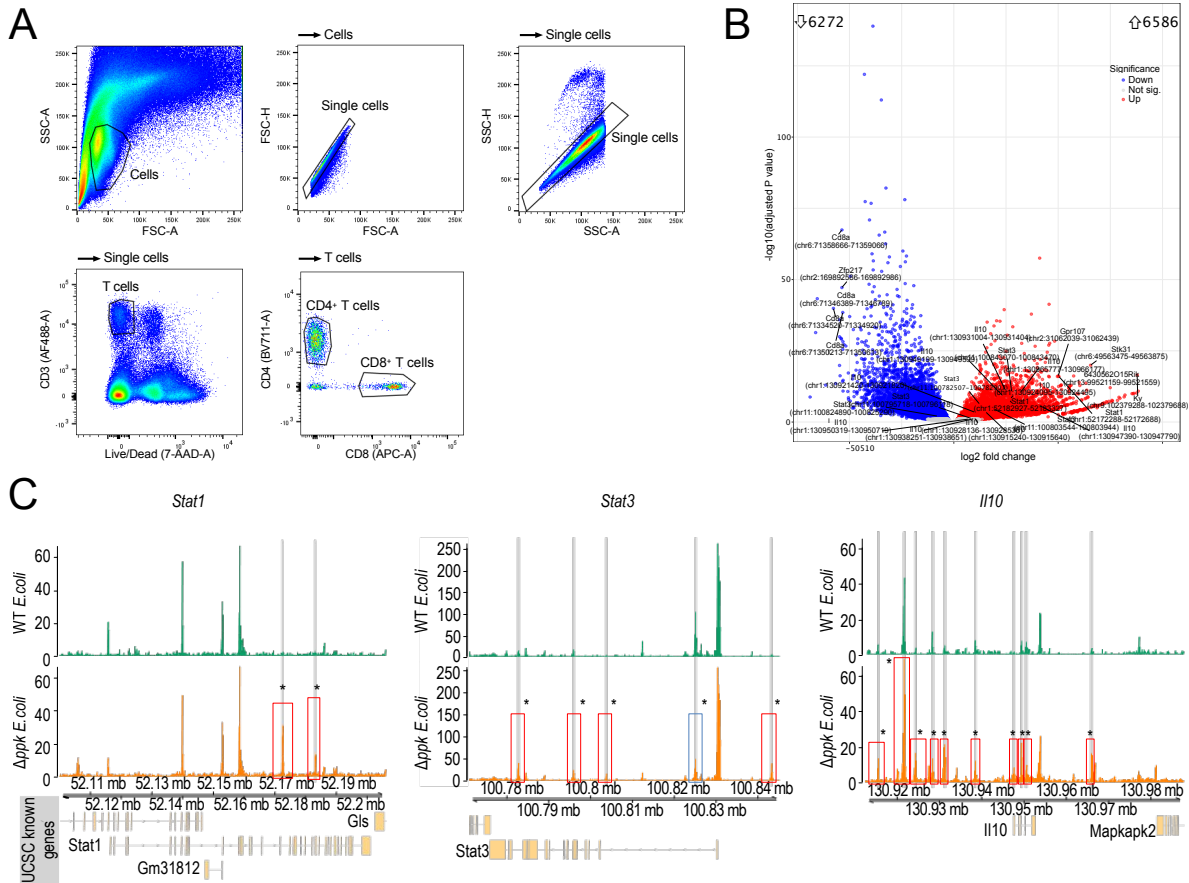
Abbildung 26 | **Verifizierung der Monokolonisierung keimfreier Mäuse**

**A** Keimfreie Mäuse wurden 3 Wochen lang mit Wildtyp (WT) oder Polyphosphatkinase-defizienten ( $\Delta ppk$ ) *E. coli* monokolonisiert. Die PCR von *Ppk1* wurde aus LB-gezüchteten *E. coli* vor der Monokolonisation und aus dem Kot der monokolonisierten Mäuse durchgeführt. Spezifisch pathogenfreie (SPF) und keimfreie (GF) Mäuse wurden als Kontrollen verwendet. Die PCR von WT *Ppk1* ergab eine Bande von 2067 bp und  $\Delta ppk$  ~450 bp. **B** Kot von monokolonisierten, GF und SPF Mäusen wurde auf eine Agarplatte ausgestrichen. Homogene Kolonien wurden für WT und  $\Delta ppk$  *E. coli* beobachtet und heterogene Kolonien für SPF. Im Kot der GF-Mäuse waren keine Kolonien nachweisbar.

Anschließend wurden Kotproben von monokolonisierten, keimfreien und SPF-Mäusen auf Blutagarplatten ausgestrichen und die Kolonie am nächsten Tag auf Homogenität untersucht. Bei WT und  $\Delta ppk$  *E. coli* monokolonisierten Mäusen wurden homogene Kolonien, bei keimfreien Mäusen keine Kolonien und bei SPF Mäusen heterogene Kolonien beobachtet (**Abbildung 26B**).

## 8.15 Bakterielle Polyphosphate verändern das Epigenom des intestinalen Immunsystems

Im Darm werden Immunzellen über einen längeren Zeitraum mit verschiedenen Nahrungsmittelantigenen, Bakterienspezies und deren Metaboliten konfrontiert, welche die Eigenschaften des intestinalen Immunsystems modulieren können. Um die Effekte bakterieller Polyphosphate in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wurden keimfreie Mäuse für 3 Wochen mit Polyphosphat-produzierenden WT *E. coli* Stamm oder einem  $\Delta ppk$  *E. coli* Stamm, der keine Polyphosphate produzieren kann, monokolonisiert. Anschließend wurde die Lamina propria des Kolons, in der sich die Immunzellen befinden, isoliert und mittels Durchflusszytometrie nach CD4<sup>+</sup> T-Zellen sortiert (**Abbildung 27A**). Dieser Zelltyp wurde ausgewählt, um die Veränderungen durch Polyphosphate zu untersuchen, da T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Orchestrierung der Immunantwort spielen. Anschließend wurde eine ATAC-Sequenzierung durchgeführt, die eine epigenetische Untersuchung der Chromatinzugänglichkeit in den Zellen ermöglicht. DNA-Bereiche, die transkribiert werden, müssen für Transkriptionsfaktoren zugänglich sein. Die bioinformatische Analyse der Daten durch Dr. Jayaraman ergab, dass insgesamt etwa 6.300 Bereiche signifikant weniger zugänglich und etwa 6.600 Bereiche signifikant besser zugänglich in CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren, die aus mit  $\Delta ppk$  *E. coli* monokolonisierten Mäusen stammten und nicht bakteriellen Polyphosphaten ausgesetzt waren (**Abbildung 27B**). Als nächstes wurde der Datensatz daraufhin untersucht, ob sich unter den signifikant regulierten Bereichen immunrelevante Gene befanden. Der Fokus lag dabei insbesondere auf Genen, die an Signalwegen der IL-12 Zytokinfamilie (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35) beteiligt sind. Dabei wurden vor allem vermehrt zugängliche Bereiche in den Genen *Stat1*, *Stat3* und *I110* und assoziierten Regionen in  $\Delta ppk$  im Vergleich zu monokolonisierten WT *E. coli* Mäusen gefunden (**Abbildung 27C**).



**Abbildung 27 | Bakterielle Polyphosphate regulieren die Chromatinzugänglichkeit in CD4<sup>+</sup> T-Zellen**  
**A** Keimfreie Mäuse wurden für 3 Wochen mit WT oder  $\Delta ppk$  *E. coli* monokolonisiert und Zellen aus der Lamina propria des Kolons isoliert. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert (n=5 Mäuse/Gruppe). **B** Eine ATAC-Sequenzierung wurde durchgeführt und das Vulkandiagramm zeigt die hochregulierten (rot) und herunterregulierten (blau) Regionen, die differenziell zugänglich sind. Hervorgehoben sind die fünf wichtigsten differenziell zugänglichen Regionen (*Cd8a*, *Zfp217*, *Stk31*, *Gpr107*) sowie die signifikanten Regionen für *Stat1*, *Stat3* und *Il10*. **C** Chromatinzugänglichkeit der *Stat1*, *Stat3* und *Il10* Gene von WT und  $\Delta ppk$  *E. coli* monokolonisierten Mäusen. Die statistische Analyse zwischen WT und  $\Delta ppk$  *E. coli* monokolonisierter Mäuse wurde mit dem Wald-Test in DESeq2 mit folgendem Signifikanzniveau analysiert: \* $p \leq 0,05$ . Rote Kästen zeigen an, dass das Gen in  $\Delta ppk$  Zellen im Vergleich zu WT Zellen hochreguliert ist. Blaue Kästen zeigen an, dass das Gen herunterreguliert ist. Die bioinformatische Auswertung und Anfertigung der Abbildungen (B+C) erfolgte durch Dr. Jayaraman.

### 8.16 Langkettige Polyphosphate interferieren mit dem IL-27 Signalweg in T-Zellen

Die ATAC-Sequenzierung zeigte, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus WT *E. coli*, die Polyphosphat produzieren, weniger zugängliches Chromatin für die Gene *Stat1*, *Stat3* und *Il10* haben. Diese Gene spielen eine Rolle im Signalweg von IL-27 in T-Zellen. Die Bindung von IL-27 an den IL-27-Rezeptor führt zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT3, die dadurch aktiviert werden und unter anderem die Expression von *Il10* induzieren. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob bakterielle Polyphosphate auch auf Proteinebene in den IL-27 Signalweg eingreifen. Dazu wurden Splenozyten isoliert und in Kombination mit IL-27 und langkettigen Polyphosphaten inkubiert. Der Phosphorylierungszustand von STAT1 wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers analysiert (**Abbildung 28A**). Es zeigte sich, dass langkettige Polyphosphate, wie sie auch in Bakterien vorkommen, die Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 fast vollständig blockieren, und zwar sowohl in CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 28B**).

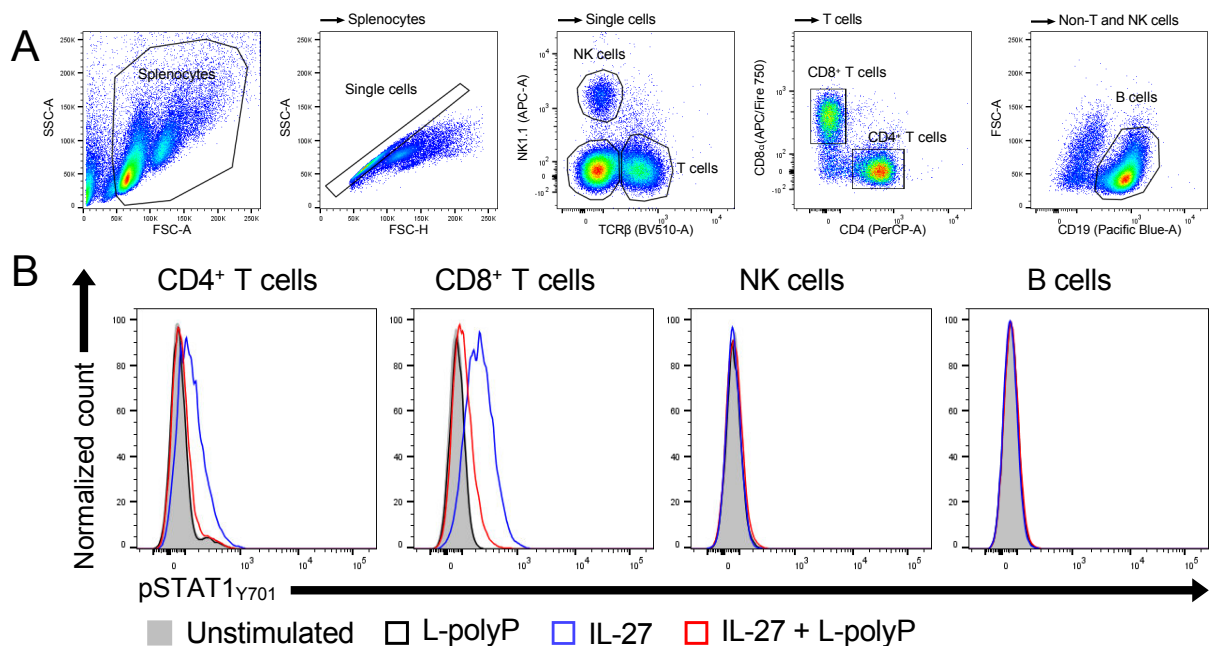


Abbildung 28 | **Langkettige Polyphosphate blockieren die IL-27-induzierte STAT1-Phosphorylierung in T-Zellen.** **A** Representative Gating-Strategie von Splenozyten. **B** 0,5x10<sup>6</sup> Splenozyten wurden für 45 Minuten mit IL-27 (10 ng/mL) und langkettigen Polyphosphaten (L-polyP, 50 μM) stimuliert. Die Phosphorylierung des STAT1 Proteins wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 8.17 Langkettige Polyphosphate regulieren das Transkriptom und Epigenom von myeloiden und lymphoiden Zellen

Nachdem die Rolle bakterieller Polyphosphate auf das Epigenom und den Signalweg von CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht wurde, sollte im nächsten Schritt die Wirkung auf myeloide Zellen charakterisiert werden. Dazu wurden Peritonealzellen verwendet, da sie eine große Population myeloider Zellen, insbesondere Makrophagen, enthalten. Isolierte Peritonealzellen wurden kultiviert und über Nacht mit langkettigen Polyphosphaten stimuliert. Anschließend wurden alle lebenden Immunzellen mittels Durchflusszytometrie positiv sortiert und eine Einzelkern-ATAC und RNA-Sequenzierung durchgeführt (**Abbildung 29A**). Die bioinformatische Analyse ergab ein differenziertes Bild der Zelltypcluster im Peritoneum: große peritoneale Makrophagen (LPM), kleine peritoneale Makrophagen (SPM), Monozyten, klassische dendritische Zellen (cDC), NK-Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B1- und B2-Zellen (**Abbildung 29B**). Die Zellcluster wurden anhand von Markergenen gebildet (**Abbildung 29C**). Die weitere Analyse konzentrierte sich auf die Wirkung der Polyphosphate auf den IL-27 Signalweg. Hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression des *Stat1* Gens von großen peritonealen Makrophagen, Monozyten, B1- und B2-Zellen nach Stimulation mit langkettigen Polyphosphaten. Auch die Chromatinzugänglichkeit des *Stat1* Gens war in der Gruppe der Polyphosphat-stimulierten Zellen geringer, wenn auch nicht signifikant (**Abbildung 29D**).

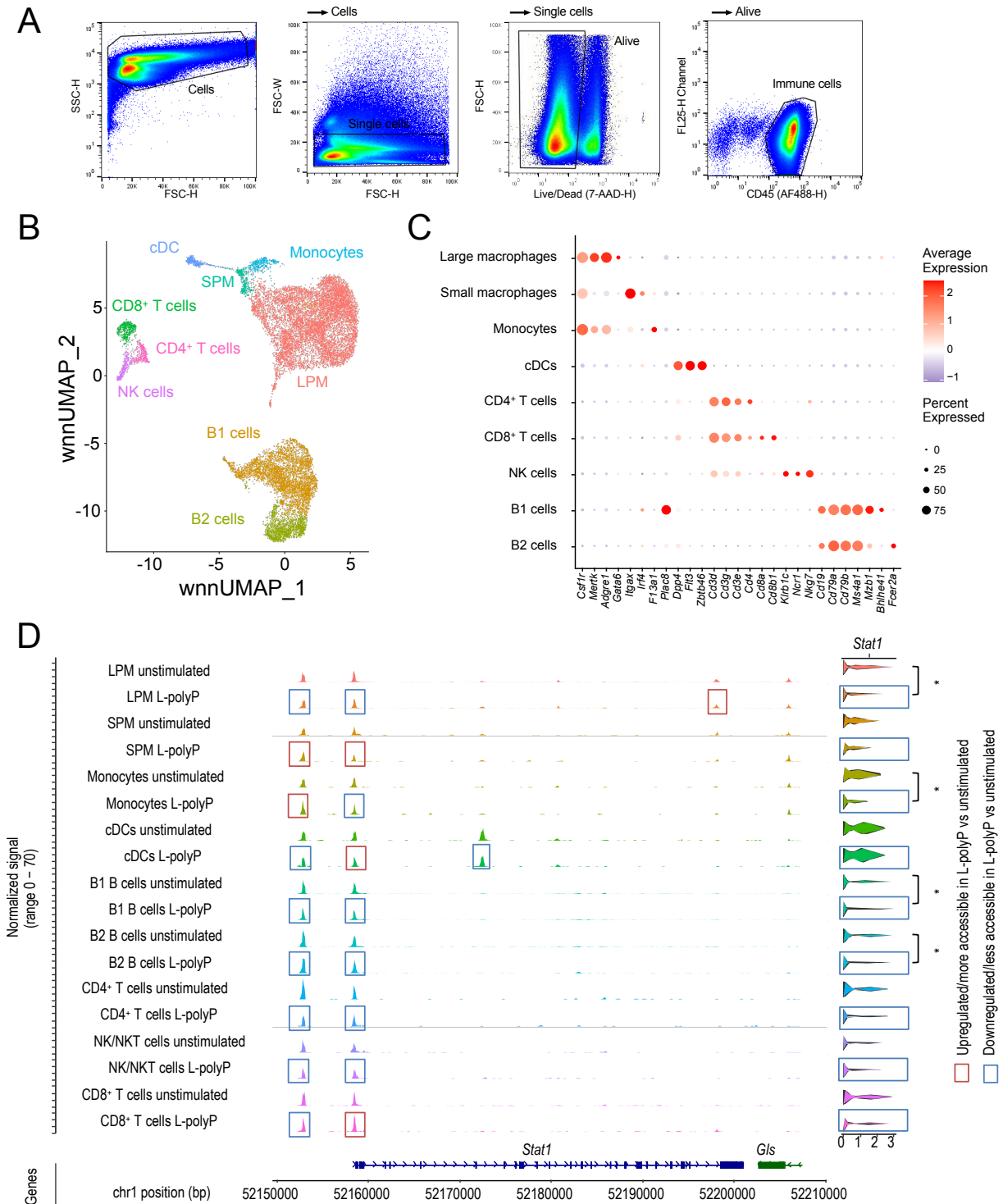


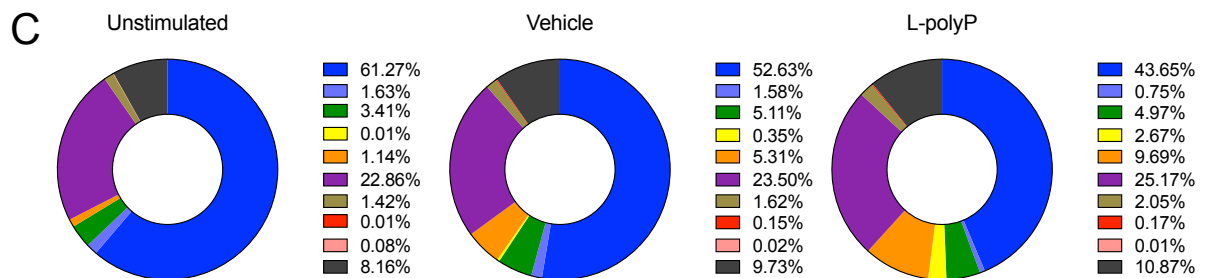
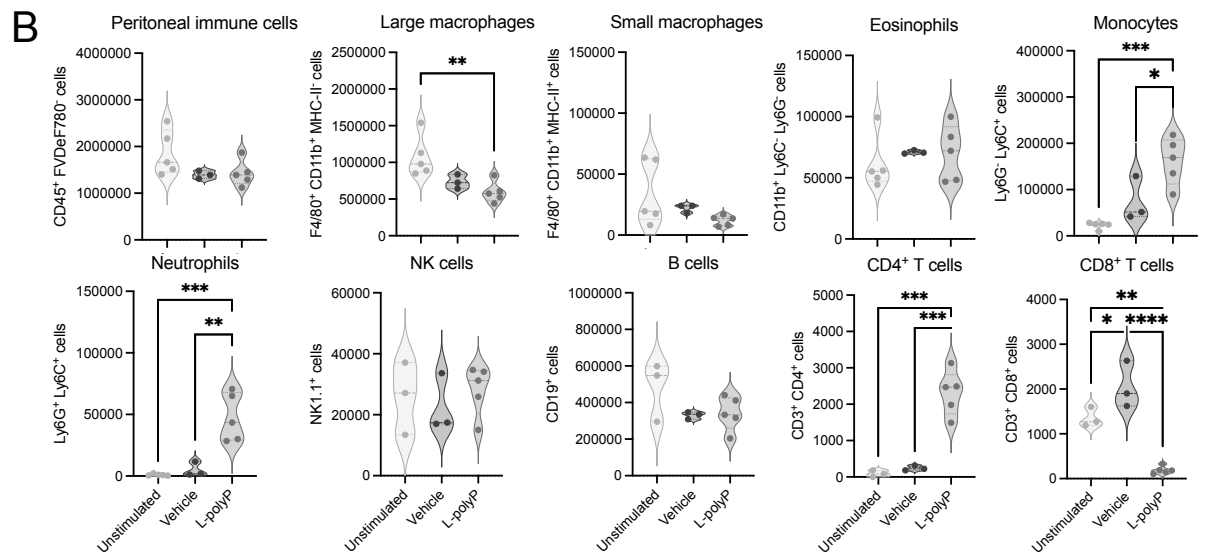
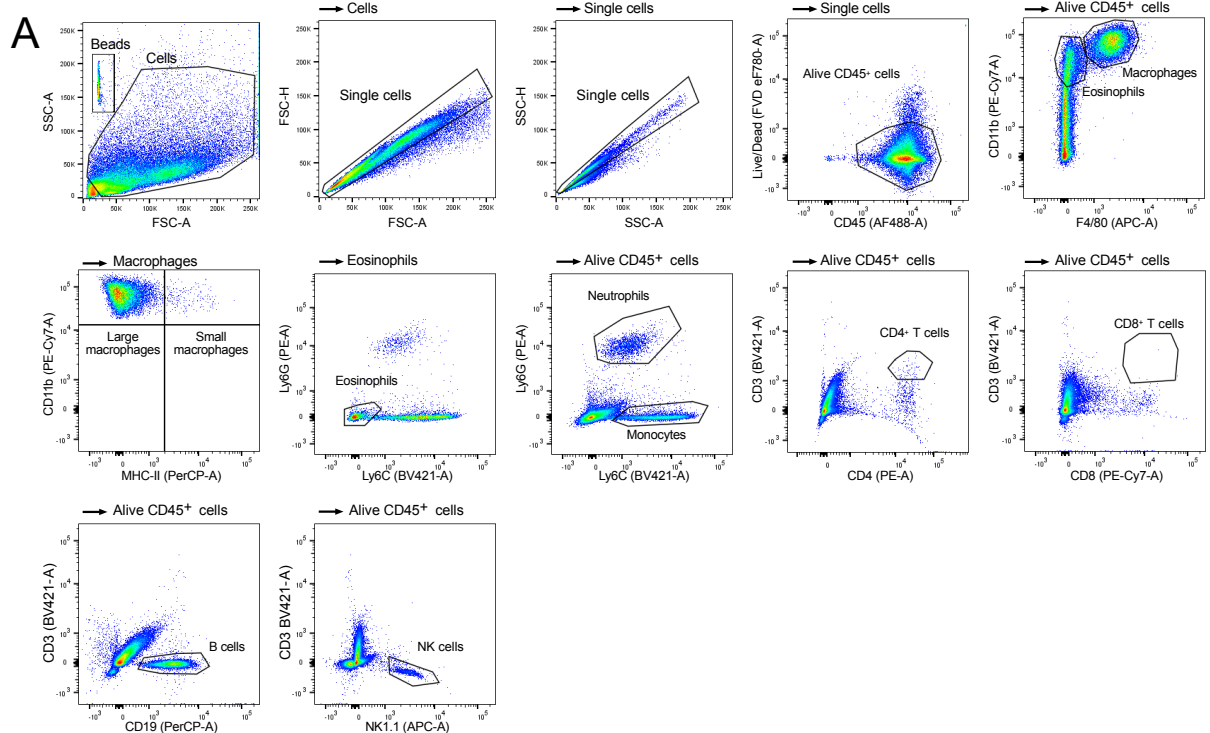
Abbildung 29 | Langkettige Polyphosphate reduzieren die *Stat1* Expression und die Chromatinzugänglichkeit in peritonealen myeloiden und lymphoiden Zellen

**A** Peritonealzellen wurden durch Lavage isoliert, kultiviert und über Nacht mit langkettigen Polyphosphaten (75  $\mu$ M) inkubiert. Lebende Peritonealzellen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert. **B** Einzelkern-ATAC- und Genexpressions-Sequenzierung wurden durchgeführt. Das UMAP-Diagramm (Gleichmäßige Annäherung und Projektion von Mannigfaltigkeiten) zeigt die Zelltypcluster des Peritoneums. **C** Punktdiagramme zeigen die durchschnittliche RNA-Expression ausgewählter Markergene zur Definition von Zelltypclustern im Peritoneum. Die Größe der Punkte ist proportional zum Prozentsatz der Zellen, die das jeweilige Gen exprimieren. Die Punkte sind entsprechend der mittleren RNA-Expression auf einer Gradientenskala eingefärbt. **D** *Stat1* Expression und Chromatinzugänglichkeit in peritonealen myeloiden und lymphoiden Zellen. Statistische Tests zwischen Polyphosphat-stimulierten und nicht-stimulierten Zellen wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest in Seurat durchgeführt. Rote Kästchen zeigen an, dass das Gen in Polyphosphat-stimulierten Zellen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen hochreguliert/zugänglicher ist. Blaue Kästchen zeigen an, dass das Gen herunterreguliert/weniger zugänglich ist. Die bioinformatische Auswertung und Anfertigung der Abbildungen (B-D) erfolgte durch Dr. Jayaraman.

### 8.18 Langkettige Polyphosphate verändern die Zahlen von Immunzellen des Peritoneums

Um die Effekte von langkettigen Polyphosphaten auf das Epigenom und Transkriptom von Immunzellen zu untersuchen, wurden Peritonealzellen *ex vivo* stimuliert. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, weil Polyphosphate chemotaktische Eigenschaften besitzen und eine veränderte Zusammensetzung der Immunzellzahlen im Peritoneum die Sequenzierung hätte beeinflussen können. Frühere Studien haben gezeigt, dass sowohl kurzkettige (Hou et al., 2018, Du et al., 2019, Suess et al., 2019) als auch langkettige Polyphosphate (Krenzlin et al., 2023) die Infiltration von Neutrophilen ins Gewebe fördern. Bisher ist jedoch unbekannt, wie langkettige Polyphosphate diese Effekte auslösen. Um dies zu untersuchen, wurde Mäusen intraperitoneal eine sterile Lösung langkettiger Polyphosphate in einer Dosierung von 20 µg/g Körpergewicht injiziert. Unstimulierte Mäuse dienten als Kontrolle für naive Bedingungen. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt eine sterile PBS-Lösung (Vehicle), um Effekte der Injektion selbst auszuschließen. Nach 16 Stunden wurde das Peritoneum lavagiert und die Immunzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 30A**). Anschließend wurde die absolute Anzahl sowie die prozentuale Zusammensetzung der Immunzellpopulationen im Peritoneum ermittelt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl der großen peritonealen Makrophagen nach Stimulation mit langkettigen Polyphosphaten signifikant abnahm, während die Anzahl der kleinen peritonealen Makrophagen unverändert blieb. Eosinophile Granulozyten, NK-Zellen und B-Zellen wiesen keine statistisch signifikanten Veränderungen auf. Dagegen stieg die Anzahl der Neutrophilen, Monozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Injektion von langkettigen Polyphosphaten signifikant an, während in der PBS-Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden. Interessanterweise nahm die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Polyphosphat-injektion signifikant ab, während sie in der PBS-Kontrollgruppe leicht anstieg. Aufgrund technischer Limitationen bei Kombination der verwendeten Antikörpern wurde eine Zellfraktion nicht weiter analysiert (Unknown) (**Abbildung 30B**). Die prozentuale Zusammensetzung der Immunzellen zeigte, dass der Anteil der großen peritonealen Makrophagen nach Polyphosphatinjektion um etwa ein Drittel von ca. 61% unter unstimulierten Bedingungen auf ca. 44% sank. In der PBS-Kontrolle wurde eine ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Abnahme auf ca. 53%



Large macrophages, Small macrophages, Eosinophils, Monocytes, Neutrophils, NK cells, B cells, CD4+ T cells, CD8+ T cells, Unknown

Abbildung 30 | **Langkettige Polyphosphate verändern die Immuzelllandschaft der Peritonealhöhle**  
**A** Mäuse blieben entweder unstimuliert, oder wurden intraperitoneal mit einer PBS-Lösung (Vehicle) oder mit langkettigen Polyphosphaten (L-polyP, 20 µg/g Körpergewicht) injiziert. Nach 16 Stunden wurde das Peritoneum laviert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist eine repräsentative Gating-Strategie. **B** Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus (Unstimuliert n=5, Vehicle n=3, L-polyP n=5). Die Daten wurden mit einem mittels einseitiger Varianzanalyse und Tukey-Vergleichstest mit folgenden Signifikanzniveaus analysiert: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Keine Signifikanz bei p>0,05. **C** Prozentuale Zusammensetzung der Peritonealzellen berechnet aus den Mittelwerten aller Mäuse einer Gruppe.

beobachtet. Weitere starke prozentuale Veränderungen traten bei Monozyten und Neutrophilen auf. Der Anteil der Monozyten verzehnfachte sich nach Polyphosphatinjektion von ca. 1% auf ca. 10% und verfünffachte sich in der PBS-Kontrolle. Neutrophile machten nach Polyphosphatinjektion ca. 3% der Zellpopulation aus, während ihr Anteil in der PBS-Kontrolle gering (0,35%) und unter naiven Bedingungen praktisch nicht vorhanden war (0,01%). Interessanterweise war der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen der PBS-Kontrollgruppe (0,15%) und der Polyphosphatgruppe (0,17%) vergleichbar, obwohl die absoluten Zahlen signifikant unterschiedlich waren (**Abbildung 30C**).

## 9 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung bakterieller Polyphosphate in der Wirt-Pathogen-Interaktion zu untersuchen. In der Arbeitsgruppe von [REDACTED] wurde zuvor der neuartige protonenaktivierte Chloridionenkanal 1 (PACC1) als Bindungspartner bakterieller Polyphosphate in Makrophagen identifiziert. Welche Rolle PACC1 bei der Immunantwort gegen Bakterien spielt und wie diese durch Polyphosphate moduliert wird, war bisher unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass PACC1 an der Immunantwort gegen Bakterien beteiligt ist, jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden, dass die immunmodulatorische Wirkung von Polyphosphaten durch PACC1 vermittelt wird. Stattdessen wurde die Rolle von PACC1 in der Immunantwort unabhängig von Polyphosphaten weiter untersucht. Es zeigte sich, dass Phagozyten eine hohe *Pacc1* Expression und PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen, Monozyten und Neutrophile eine verminderte intrazelluläre Ansäuerung während der Phagozytose aufwiesen. Bei einer Infektion mit *E. coli* oder *S. pneumoniae* Bakterien zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse eine stärkere Entzündung bei gleichzeitig höherer Bakterienlast und geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit. Zusätzlich wurde die Wirkung von bakteriellen Polyphosphaten auf die Darmimmunität untersucht. Es zeigte sich, dass Polyphosphate das Epigenom intestinaler CD4<sup>+</sup> T-Zellen veränderten, einschließlich der Gene der *Stat* Familie, die für die Immunantwort von Bedeutung sind. In Makrophagen reduzierten bakterielle Polyphosphate die *Stat* Genexpression und blockierten die Zytokin-induzierte STAT1-Phosphorylierung in T-Zellen.

### 9.1 Die intrazelluläre Ansäuerung während einer Phagozytose verläuft unter Beteiligung von PACC1

#### **PACC1 ist ein Membranprotein, das an endosomalen Prozessen beteiligt ist**

PACC1 ist ein konserviertes, trimeres Membranprotein mit zwei TMDs pro Untereinheit und Aminosäureresten für posttranslationale Modifikationen (Ubiquitinierung, Phosphorylierung) am N-Terminus (**Abbildung 7**). In ersten Studien zu PACC1 wurde das Protein in der Plasmamembran nachgewiesen und eine Beteiligung von PACC1 am säureinduzierten Zelltod nach extrazellulärer Azidose

beschrieben (Ullrich et al., 2019, Yang et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2020). In der Folge wurde entdeckt, dass PACC1 auch in intrazellulären Membranen des endosomalen Systems lokalisiert ist. Dort reguliert PACC1 zusammen mit anderen Membranproteinen den luminalen pH-Wert und ist am Transferrin-Recycling beteiligt (Osei-Owusu et al., 2021). Außerdem ist PACC1 an der Volumenreduktion des Makropinosoms in BMDM involviert (Zeziulia et al., 2022). Makropinozytose ist ein endozytotischer Prozess, bei dem Flüssigkeit und darin gelöste Substanzen unselektiv internalisiert werden. Die Makropinozytose ist unter anderem für die Immunabwehr von Bedeutung. Dendritische Zellen überwachen ihre Umgebung, indem sie durch Makropinozytose einen Teil des umgebenden Milieus aufnehmen und die in der Flüssigkeit enthaltenen Proteine auf ihrer Oberfläche als Antigene präsentieren (Norbury, 2006). Neben den Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von PACC1 in der Plasmamembran und im Endosom sind die dargestellten Bindungspartner von PACC1 ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von PACC1 an intrazellulären, vesikulären Prozessen. Das Ras-assoziierte Protein (RAB) 9B und das Vesikel-assoziierte Membranprotein (VAMP) 3 vermitteln den Vesikeltransport durch Andocken und Fusion der Membranen und wurden durch Affinitätsbindung und Massenspektrometrie als mutmaßliche Interaktionspartner von PACC1 detektiert (Huttlin et al., 2017, Huttlin et al., 2021) (**Tabelle 3**). Inwieweit PACC1 darüber hinaus an weiteren vesikulären Prozessen wie der Phagozytose beteiligt ist, wurde bisher nicht untersucht.

### ***Pacc1* wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, unter anderem in Phagozyten**

Beim Menschen wird *Pacc1* ubiquitär in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert (<https://www.proteinatlas.org/>, Uhlén et al., 2015) (**Abbildung 12**). Funktionell wurde die PACC1 Aktivität, die einen Chloridioneneinstrom unter extrazellulärem saurem pH bewirkt, in zahlreichen Zellen beschrieben: Sertoli-Zellen der Ratte (Auzanneau et al., 2003), humane HEK293 Zellen (Lambert & Oberwinkler, 2005, Capurro et al., 2015), kardiale Myozyten von Maus und Meerschweinchen (Yamamoto & Ehara, 2006), humane Endothelzellen der Nabelvene (Ma et al., 2008), murine Osteoklasten (Kajiya et al., 2009), murine RAW264.7 Makrophagen und

humane Monozyten aus dem Blut (Shi et al., 2009), humane THP-1 Monozyten (Fu et al., 2013), humane HeLA Epithelzellen (Wang et al., 2007, Sato-Numata et al., 2013), murine BV-2 Mikroglia (Kittl et al., 2019), murine peritoneale Makrophagen (Cang et al., 2014), und humane Chondrozyten (Kittl et al., 2020). Die ubiquitäre Expression von *Pacc1* deutet auf eine Beteiligung an physiologischen Prozessen hin, die in jeder Zelle vorkommen, wie z. B. der endosomale Vesikeltransport. Es ist jedoch auffällig, dass Zellen des mononukleären phagozytären Systems (MPS) eine erhöhte *Pacc1* Expression aufweisen, was darauf hindeutet, dass PACC1 in diesen Zellen auch an anderen Prozessen wie der Phagozytose beteiligt sein könnte. MPS ist ein deskriptives Konzept, das die Gesamtheit aller Zellen umfasst, die in der Lage sind, Partikel zu phagozytieren. Dazu gehören Zellen mit einer erhöhten *Pacc1* Expression wie Monozyten, Fettgewebismakrophagen, Mikroglia des zentralen Nervensystems, Langerhanszellen in der Haut, Kupfferzellen der Leber und Hofbauerzellen der Plazenta (**Abbildung 12A**) (Banoub & Gendelman, 2017, Guilliams et al., 2014, Hume et al., 2019). In vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von [REDACTED] konnte zudem eine hohe Expression von *Pacc1* in murinen BMDM sowie in dendritischen Zellen und Makrophagen der Milz identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, weitere Phagozyten hinsichtlich ihrer *Pacc1* Expression zu untersuchen, um Rückschlüsse auf eine grundlegende Rolle von PACC1 bei der Phagozytose zu erhalten. In Frage kämen andere Zellen des MPS, wie z. B: Osteoklasten im Knochen, oder Sinus-Histozyten der Lymphknoten (Banoub & Gendelman, 2017, Guilliams et al., 2014, Hume et al., 2019).

### **PACC1 ist in der Plasmamembran und den Endosomen lokalisiert, der Nachweis im Phagolysosom steht jedoch noch aus**

Die Lokalisation von PACC1 in der Plasmamembran wurde von mehreren Gruppen nachgewiesen (Yang et al., 2019, Ullrich et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2022). Alle Chloridionenkanäle werden in der Membran des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und anschließend über den Golgi-Apparat zu ihrem Zielorganell transportiert. Gelegentlich erfolgt dieser Prozess auch über die Plasmamembran (Stauber & Jentsch, 2013). Für PACC1 konnte gezeigt werden, dass es

beispielsweise über das YxxL-Motiv von der Plasmamembran zum Endosom rekrutiert werden kann (Osei-Owusu et al., 2021). Immunhistochemische Untersuchungen in PACC1 überexprimierenden HEK293T Zellen zeigen eine Kolokalisation von PACC1 mit dem frühen endosomalen Antigen 1 (EEA1) und Transferrin (Recycling-Endosom), jedoch nur eine minimale bis keine Kolokalisation mit dem lysosomal-assoziierten Membranprotein 1 (LAMP1) (Osei-Owusu et al., 2021). In PACC1 überexprimierenden HeLa Zellen wurde keine Kolokalisation mit LAMP1 beobachtet (Ullrich et al., 2019). In BMDM konnte eine Kolokalisation von PACC1 mit EEA1 und RAB5 (frühes Endosom), aber nur eine geringe Kolokalisation mit RAB7 (spätes Endosom) und LAMP1 (Lysosom) nachgewiesen werden (Zeziulia et al., 2022). Nach der Phagozytose von *E. coli* pHrodo grün Konjugaten zeigt sich nach 15 Minuten eine Kolokalisation von PACC1 im frühen Phagosom von BMDM (Zeziulia et al., 2022). Der Nachweis, dass PACC1 auch im Phagolysosom lokalisiert ist, steht noch aus. Allerdings weisen die vorhandenen Studien auch einige Defizite auf. Die verwendeten HEK293 und HeLa Zellen sind beide humane Zelllinien. Beide Zelllinien sind immortalisiert und weisen eine Aneuploidie, einen mehrfachen, atypischen Chromosomensatz auf. Infolgedessen sind das Genom, das Transkriptom und einige zelluläre Prozesse stark degeneriert (Landry et al., 2013, Lin et al., 2014). Die Übertragung der Ergebnisse von Experimenten zu Ionenkanälen an Zelllinien auf primäre Zellen ist schwierig, da die biologischen Prozesse, in denen die gemessenen Effekte eingebettet sind, in den Zelllinien deutlich verändert sein können. Außerdem sind die beiden Zelllinien HEK293 und HeLa nicht unbedingt die Zelltypen, die Phagozyten oder Immunzellen am besten repräsentieren. HEK293 Zellen stammen von embryonalen Nierenzellen ab, während HeLa Zellen von Gebärmutterhalskrebs entnommen wurden. Auch die Überexpression in diesen Zelllinien entspricht nicht der physiologischen Expression von PACC1, was zu einer veränderten Lokalisation von PACC1 führen könnte, wie sie unter physiologischen Bedingungen in primären Zellen nicht vorkommt. Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass die Lokalisation von PACC1 auch stimulusabhängig ist, ähnlich wie die Expression von *Pacc1* in BMDM durch immunologische Stimuli differenziell reguliert wurde (**Abbildung 13**). In diesem Sinne wäre es möglich, dass PACC1 nicht wie die Markerproteine LAMP1 oder CIC-7 konstitutiv im Lysosom lokalisiert ist, sondern erst nach einem inflammatorischen Stimulus in das Vesikel rekrutiert wird. PACC1 könnte möglicherweise auch durch die Reifung des Phagosoms über die Plasmamembran oder durch Fusion mit

endosomalen Vesikeln in das Phagolysosom gelangen. In früheren Studien wurde das Lysosom auf die Anwesenheit von PACC1 untersucht, jedoch keine Phagozytose induziert, um die Lokalisation von PACC1 im Phagolysosom zu untersuchen.

Eine weitere interessante Frage betrifft die Kinetik der Phagozytose und die Rolle von PACC1 in diesem Prozess. Es wurden signifikante Unterschiede in der intrazellulären Ansäuerung nach 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von *E. coli* pHrodo grün Konjugaten gefunden (**Abbildung 18**), während zu einem deutlich früheren Zeitpunkt von 30 Minuten keine Unterschiede in BMDM nachgewiesen werden konnten ([Zeziulia et al., 2022](#)). Es ist möglich, dass PACC1 unterschiedliche Funktionen im dynamischen Prozess der initialen Phagozytose, des Verdauens der internalisierten Bakterien und schließlich der Auflösung des Phagolysosoms übernimmt. Vor dem Hintergrund, dass die Aktivierung und Desensibilisierung von PACC1 pH-abhängig ist und sich der pH-Wert im Verlauf der Phagozytose zeitlich ändert und sich in verschiedenen Vesikeltypen unterscheidet, wäre dieses Szenario möglich. Da jedoch trotz erhöhter Anzahl von Immunzellen in den PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen eine verschlechterte Elimination der Bakterien beobachtet wird, liegt eine direkte Beteiligung von PACC1 an phagolysosomalen oder anderen antimikrobiellen Prozessen nahe (**Abbildung 19+20**).

Die technische Limitation für Experimente mit *E. coli* pHrodo grün Konjugaten liegt in der Auflösungsgrenze. Obwohl der pH-Indikator pHrodo grün bei einem neutralen pH-Wert von 7,5 nicht oder nur schwach fluoresziert und sein Maximum bei einem pH-Wert von 4 erreicht, lässt er bei der durchflusszytometrischen Analyse keine Rückschlüsse auf das für das saure Milieu verantwortliche intrazelluläre Kompartiment zu. Der pH-sensitive Farbstoff pHrodo grün erlaubt keine Aussage über den Vesikeltyp (frühes Endosom, sekretorisches Vesikel, spätes Endosom, Lysosom, Phagosom, Phagolysosom), sondern detektiert allgemein Unterschiede im intrazellulären pH-Wert. Dieser Nachweis könnte z. B. fluoreszenzmikroskopisch durch Kolo-kalisation mit vesikelspezifischen Proteinen erfolgen.

### **PACC1 ist an der intrazellulären Ansäuerung während der Phagozytose beteiligt**

PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen, Monozyten und Neutrophile zeigten 24 Stunden nach

intraperitonealer Injektion eine signifikant verminderte Fluoreszenzintensität des *E. coli* pHrodo grün Konjugats. Interessanterweise zeigten sich zellspezifische Unterschiede in der normalisierten Abnahme der intrazellulären Ansäuerung der PACCC1<sup>-/-</sup> Immunzellen im Vergleich zu den entsprechenden WT Zellen. PACCC1<sup>-/-</sup> Neutrophile zeigten die stärkste Abnahme der pHrodo grün Fluoreszenzintensität (-26,2%), gefolgt von Makrophagen (-17,6%) und Monozyten (-15,7%). Interessanterweise wiesen sowohl WT als auch PACCC1<sup>-/-</sup> Makrophagen eine zehnfach höhere Fluoreszenz auf als Neutrophile und Monozyten (**Abbildung 18**). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass peritoneale Makrophagen als geweberesidente Zellen die *E. coli* pHrodo grün Konjugate zuerst aufnehmen, bevor Neutrophile und Monozyten rekrutiert werden. Diese frühe Phagozytose durch Makrophagen könnte die hohe Fluoreszenz in diesen Zellen erklären. Neutrophile und Monozyten gelangen erst später ins entzündete Gewebe, nachdem Chemokine produziert und freigesetzt wurden, was ihre geringere Fluoreszenzintensität bedingen könnte. Eine weitere Erklärung könnte in der höheren Autofluoreszenz von Makrophagen im Vergleich zu Neutrophilen und Monozyten liegen (Li et al., 2012). Der signifikant größere Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen PACCC1<sup>-/-</sup> und WT in Neutrophilen könnte darauf hindeuten, dass Neutrophile aufgrund ihrer schnellen Phagozytose anfälliger für Defizite in der PACCC1 Aktivität sind als Makrophagen (Silva, 2010, Nordenfelt & Tapper, 2011). Da die Fluoreszenzintensität nicht auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen normiert wurde, könnte auch die erhöhte Zellzahl in den PACCC1<sup>-/-</sup> Mäusen einen Teil des Effekts erklären. Es ist jedoch davon auszugehen, dass nach 24 Stunden der größte Teil der Partikel bereits phagozytiert war. Die Applikation der fixierten *E. coli* pHrodo grün Konjugate ist nicht letal und induziert eine milde, selbstlimitierende Peritonitis, da die fixierten Mikroben nicht replizieren können. Eine geeignete Kontrollmethode wäre, den Überstand der zellfreien Peritoneallavage anzusäuern und die Fluoreszenz zu messen, um Rückschlüsse auf nicht phagozytierte Konjugate zu ziehen, wie zuvor beschrieben (Roewe et al., 2020).

In einer anderen Studie zeigten murine PACCC1<sup>-/-</sup> BMDM keine verminderte Phagozytose von *E. coli* pHrodo grün fluoreszierenden Konjugaten nach 30 Minuten. Die Anzahl der Konjugate pro Zelle wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht und war identisch (Zeziulia et al., 2022). Die initiale Phagosomenbildung scheint also unabhängig von PACCC1 zu verlaufen. Die luminale Ansäuerung zu einem späteren

Zeitpunkt oder auch die Reifung und Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom könnten jedoch beeinträchtigt sein und damit auch die Phagozytoseleistung der Immunzellen. Dies könnte den vulnerablen Phänotyp von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen bei *E. coli* und *S. pneumoniae* Infektionen erklären (**Abbildung 19+20**), ohne im Widerspruch zur unveränderten Phagozytose nach 30 Minuten zu stehen ([Zeziulia et al., 2022](#)). Die genaue Rolle von PACC1 im phagozytotischen Prozess, ob bei der schrittweisen Ansäuerung des Phagosoms, des Phagolysosoms oder bei der Verdauung, bleibt unklar.

### **Zur Rolle der PACC1 Aktivität bei der luminalen Ansäuerung liegen widersprüchliche Daten vor**

PACC1 wird als ein nach außen gerichteter Chloridionenstrom beschrieben, der durch extrazelluläre oder luminalen Ansäuerung aktiviert wird und Chloridionen aus dem extrazellulären Raum oder aus dem Endosom in das Zytosol schleust ([Ullrich et al., 2019](#), [Yang et al., 2019](#), [Osei-Owusu et al., 2021](#)). PACC1 verhindert die Übersäuerung des Endosoms durch die Freisetzung von Chloridionen aus dem Lumen ([Stauber & Jentsch, 2013](#), [Osei-Owusu et al., 2021](#)). PACC1<sup>-/-</sup> HEK293T Zellen zeigen eine Hyperazidität des endosomalen Lumens, während eine Überexpression von PACC1 zu einer Hypoazidität führt ([Osei-Owusu et al., 2021](#)). Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese, dass PACC1 die phagolysosomale Ansäuerung durch das Prinzip des Gegenionenstroms unterstützt (**Abbildung 9**). Darüber hinaus zeigt der pH-sensitive Farbstoff pHrodo grün nach 24 Stunden eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in PACC1<sup>-/-</sup> Immunzellen, was auf eine verminderte intrazelluläre Ansäuerung hindeutet (**Abbildung 18**). PACC1 ist ein Kanal, der Ionen entlang des elektrochemischen Potentials kanalisiert. Unter geeigneten elektrochemischen Gradienten könnte PACC1, obwohl als nach außen gerichteter Chloridionenstrom beschrieben, die luminalen Chloridionenkonzentration erhöhen und damit zur Ansäuerung beitragen, wie die Autoren selbst anmerken ([Osei-Owusu et al., 2021](#)). Darüber hinaus besteht, wie bereits diskutiert, die Möglichkeit, dass die Untersuchungen unter stabilen Bedingungen zu anderen Ergebnissen führen als unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli, wie sie z. B. während einer Infektion vorherrschen. Möglicherweise hängt die Funktion von

PACC1 bei der pH-Kontrolle vom Vesikeltyp ab. Proteom, pH-Wert, Chloridionenkonzentration und Funktion von Makropinosom, Endosom und Phagolysosom unterscheiden sich und damit möglicherweise auch die Rolle, die PACC1 in diesen Vesikeln und zellulären Prozessen spielt.

Die Chloridionenkonzentration und der pH-Wert variieren innerhalb der Zellorganellen und unterliegen einer strengen Regulation. Vom extrazellulären Raum (pH 7,4 / 110 mM Cl<sup>-</sup>), über das Zytosol (pH 7,2 / 10-40 mM Cl<sup>-</sup>), das frühe Endosom (pH 6 / 40 mM Cl<sup>-</sup>) und das späte Endosom (pH 5,5 / 60 mM Cl<sup>-</sup>), bis zum Lysosom (pH <5,5 / >80 mM Cl<sup>-</sup>) nimmt der pH ab und die Chloridionenkonzentration zu (Stauber & Jentsch, 2013). Zwischen dem extrazellulären Raum und dem Zytosol besteht ein hoher Chloridionengradient und eine geringe pH-Differenz. Infolge der extrazellulären Ansäuerung kommt es zu einem Chloridioneneinstrom. Diese Aktivität wurde erstmals für PACC1 beschrieben, in dessen Folge es zum säureinduzierten Zelltod kommt (Ullrich et al., 2019, Yang et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2020). Im Gegensatz dazu besteht zwischen Zytosol und Lysosom ein starker Gradient sowohl in der Chloridionenkonzentration als auch im pH-Wert. Geht man von diesen Werten aus, so müssten Chloridionen passiv aus dem lysosomalen Lumen durch PACC1 in das Zytosol strömen und damit der durch das Gegenionenstromprinzip getriebene Ansäuerung entgegenwirken. Dagegen spricht jedoch, dass zumindest in Endosomen und im Golgi-Apparat die Chloridionenkonzentration mit der Ansäuerung ansteigt (Sonawane et al., 2002, Sonawane & Verkman 2003). Andererseits zeigt sich auch, dass in Makropinosomen die luminale Ansäuerung stärker ist, bei niedriger Chloridionenkonzentration (Zeziulia et al., 2022).

### **Die Bedeutung von Chloriden und Chloridkanälen für die lysosomale Ansäuerung wird allgemein kontrovers diskutiert.**

Trotz des häufigen Vorkommens von Chloridionen innerhalb und außerhalb der Zelle ist die biologische Bedeutung sowohl der Proteine, die diese Ionen transportieren, als auch der Anionen selbst oft umstritten. Zur Klärung der Rolle von PACC1 ist daher ein Vergleich mit anderen Membranproteinen hilfreich, die ebenfalls Chloridionen transportieren und möglicherweise an der lysosomalen Ansäuerung beteiligt sind. Andere prominente Proteine dieser Art sind CIC-7 und der Zystische-Fibrose-

Transmembran-Regulator (CFTR). CIC-7 ist ein  $H^+/2Cl^-$  Antiporter und kann Chloridionen über die Membran transportieren, indem es den Transport von zwei Chloridionen in das Lumen mit dem Ausstrom eines Protons in das Zytosol koppelt. CFTR ist ein spezieller ABC-Transporter, der wie andere ABC-Transporter durch die Bindung von ATP aktiviert wird, dann aber nicht aktiv Substanzen gegen ein elektrochemisches Potential transportiert. Stattdessen bildet CFTR einen Chloridionenkanal und ermöglicht eine passive Diffusion (Sheppard & Welsh, 1999, Vergani et al., 2005). Für beide Chloridionenkanäle, CFTR und CIC-7, ist die Datenlage zur Beteiligung an der lysosomalen Ansäuerung umstritten. In einer Studie zeigten CFTR<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Ansäuerung des Phagolysosoms und eine schlechtere Elimination von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in alveolären Makrophagen. Phagozytose, oxidativer Burst und Vesikelfusion blieben unverändert (Di et al., 2006, Deriy et al., 2009). Auch in Lungenepithelzellen führte ein CFTR-Defekt zu einer verminderten Ansäuerung intrazellulärer Vesikel und zu einer Akkumulation von Ceramid, so dass die Bildung des luminalen pH für den enzymatischen Abbau durch Ceramidase gestört war (Teichgräber et al., 2008). In zwei weiteren Studien mit pharmakologischen CFTR-Inhibitoren konnte eine Beteiligung von CFTR an der phagolysosomalen Ansäuerung in Makrophagen und respiratorischen Epithelzellen nicht bestätigt werden (Haggie & Verkman, 2007, Haggie & Verkman, 2009).

Eine transiente Defizienz des CIC-7 Antiporters durch RNA-Interferenz in HeLa Zellen verhinderte die lysosomale Ansäuerung (Graves et al., 2008), während in einer weiteren Studie mit CIC7<sup>-/-</sup> Mäusen die lysosomale Ansäuerung nicht gestört war (Weinert et al., 2010). Überraschenderweise konnte auch gezeigt werden, dass die lysosomale Ansäuerung unabhängig von der Chloridionenkonzentration der Umgebung war. In chloridionenfreiem Medium war die lysosomale Ansäuerung isolierter Vesikel identisch (Weinert et al., 2010). Das Konzept des Gegenionensstroms geht davon aus, dass der parallele Einstrom negativ geladener Anionen und der Ausstrom positiv geladener Kationen wichtig ist, um das elektrochemische Potential zu maximieren und eine effiziente Ansäuerung des Vesikellumens durch die V-ATPase zu gewährleisten (DiCiccio & Steinberg, 2011). In einer weiteren Studie konnte die Bedeutung des Kationenausstroms für die lysosomale Ansäuerung gezeigt werden, wobei die Ansäuerung unabhängig von CFTR<sup>-/-</sup> und CIC-7<sup>-/-</sup> auftrat. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Ansäuerung der Lysosomen auch ohne

Chloridionen möglich ist. Durch Permeabilisierung der Plasmamembran und Substitution der Chloridionen durch sperrige negativ geladene Moleküle, die nur nach Permeabilisierung durch die Membran diffundieren können, war eine Ansäuerung der Lysosomen dennoch möglich. Die Substitution von positiv geladenen einwertigen Kationen, Natrium- und Kaliumionen, durch sterisch komplexe positiv geladene Moleküle führte dagegen dazu, dass diese Lysosomen nicht mehr korrekt angesäuert wurden. Der Gegenionenstrom wurde also hauptsächlich durch den Kationenausstrom als Chloridioneneinstrom angetrieben. Die Chloride waren nicht essentiell, sondern eher unterstützend. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass die Defekte der mikrobiellen Elimination in CFTR<sup>-/-</sup> Makrophagen nicht durch eine verminderte Chloridionenleitfähigkeit erklärt werden können (Steinberg et al., 2010). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie, dass in Mausleberzellen die lysosomale Ansäuerung unter Beteiligung von CIC-7 abläuft und das Chloridion als Gegenion fungiert (Amin et al., 2016). Die Widersprüchlichkeit der Studien könnte in der unterschiedlichen Methodik begründet sein. Isolierte Lysosomen repräsentieren nicht das komplexe und dynamische Vesikelnetzwerk der Zelle und können daher zu anderen Ergebnissen führen als unter physiologischen Bedingungen in der Zelle. Außerdem unterscheiden sich Lysosomen von Phagolysosomen, die erst durch die Fusion von Lysosomen mit Phagosomen entstehen. Das Phagosom entsteht durch Einstülpung der Plasmamembran, gefolgt von sequentieller Ansäuerung und Fusion mit frühen und späten Endosomen (Flannagan et al., 2009). Damit unterscheidet sich das Proteom des Lysosoms von dem des Phagolysosoms, das Proteine der Plasmamembran und der vorgeschalteten Vesikel durch Fusion einbringt. Die Datenlage zur Rolle von CIC-7 und CFTR im Speziellen und Chloridionenkanälen im Allgemeinen hinsichtlich ihrer Funktion in der lysosomalen Ansäuerung durch den Gegenionenstrom bleibt widersprüchlich. Die gleichen Überlegungen und Erkenntnisse bezüglich CIC-7 und CFTR lassen sich auch auf PACC1 übertragen. Abgesehen von der unklaren Bedeutung des Chloridions als Gegenion für die lysosomale Ansäuerung ist seine Rolle in anderen Vesikeltypen klarer. In Endosomen und im Golgi-Apparat ist das Chloridion wichtig für die luminalen Ansäuerung (Glickman et al., 1983, Fuchs et al., 1989, Dyke, 1993, Stauber & Jentsch, 2013). Ebenso könnte PACC1 an Immunfunktionen beteiligt sein, indem es den luminalen pH-Wert nicht nur in Phagolysosomen, sondern auch in anderen Vesikeltypen wie Endosomen oder dem Golgi-Apparat reguliert.

Mittlerweile wird auch vermutet, dass Chloridion neben seiner möglichen Funktion als Anion im Gegenionenstrom weitere biologische Funktionen hat. Die Funktion der Kontrolle der luminalen Chloridionenkonzentration ist jedoch noch wenig erforscht (Novarino et al., 2010, Weinert et al., 2010). Die wenigen bekannten Effekte beschränken sich auf die Freisetzung von Eisenionen aus Transferrin (Byrne et al., 2010) und die Regulation des Enzyms Cathepsin C im Lysosom (Cigić & Pain, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Chloridmangel beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zu einer verminderten Abbaukapazität des Lysosoms führt (Chakraborty et al., 2017). Luminale Chloridionen modulieren möglicherweise auch indirekt den Calciumionenausstrom aus endosomalen Vesikeln. In frühen Endosomen von HEK293 Zellen reguliert die Chloridionenkonzentration im Lumen die Aktivität von Calciumkanälen (Saito et al., 2007). Calciumionen fungieren als sekundäre Botenstoffe und regulieren eine Vielzahl zellulärer Funktionen. So könnte PACC1 nicht nur über die Regulation des luminalen pH-Wertes des Phagolysosoms oder anderer Vesikel, sondern auch über die Kontrolle der luminalen Chloridionenkonzentration in diesen Kompartimenten an Immunfunktionen beteiligt sein. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu verstehen, unter welchen Bedingungen PACC1 Chloridionen in welchen Vesikeltyp und in welche Richtung schleust, und welche Auswirkungen dies hat.

## 9.2 PACC1 ist essentiell für die Immunantwort gegen bakterielle Infektionen in Mausmodellen für Pneumonie und Sepsis

### Die Immunantwort gegen *E. coli* und *S. pneumoniae* verläuft unter Beteiligung von PACC1

Aufgrund der Lokalisation von PACC1 im endosomalen System und seiner Funktion als pH-aktivierter Chloridionenkanal wurde die Hypothese aufgestellt, dass PACC1 an zellulären Mechanismen beteiligt sein könnte, die für die Immunantwort wichtig sind. Dazu gehören z. B. die Phagozytose von Mikroben, die anschließende Verdauung und Antigenpräsentation im Phagolysosom oder die Freisetzung von Zytokinen über den Golgi-Apparat. Um eine mögliche Beteiligung von PACC1 im Immunsystem zu untersuchen, wurde die gentechnisch hergestellte PACC1<sup>-/-</sup> Maus in verschiedenen Infektionsmodellen charakterisiert. Für die Experimente wurden die klinisch relevanten Erreger *E. coli* und *S. pneumoniae* ausgewählt, die im Jahr 2019 zu den weltweit tödlichsten fakultativ-pathogenen Bakterien zählten. *E. coli* Bakterien belegten mit ca. 950.000 Todesfällen den zweiten Platz und *S. pneumoniae* mit 829.000 Todesfällen den dritten Platz in der Rangliste der bakteriellen Erreger mit der höchsten Infektions-assoziierten Mortalität ([Ikuta et al., 2022](#)).

Im Modell der monomikrobiellen Sepsis mit intraperitoneal injizierten lebenden *E. coli* Bakterien zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse nach 24 Stunden eine erhöhte Bakterienlast im Blut (**Abbildung 19D**). Gleichzeitig hatten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Anzahl von Immunzellen (Makrophagen, Monozyten, Eosinophile und Neutrophile), wobei nur die Anzahl der Neutrophilen im Vergleich zu WT signifikant verändert war (**Abbildung 19B**). Da zu erwarten ist, dass eine erhöhte Anzahl von Immunzellen, insbesondere Phagozyten, die Bakterienlast reduzieren sollte, spricht dieser Befund dafür, dass das antimikrobielle Potential in PACC1<sup>-/-</sup> Zellen eingeschränkt ist. Die erhöhte Anzahl von Immunzellen, die das Peritoneum infiltrieren, könnte für einen kompensatorischen Effekt sprechen. Auf diese Weise könnte der Körper versuchen, Defizite in der Elimination der invasiven Bakterien, z. B. durch eine verminderte PACC1-vermittelte phagolysosomale Degradation oder ROS-Produktion, durch eine verstärkte Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut auszugleichen. Die erhöhte Konzentration antimikrobieller NOS in der Peritoneallavage von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen sind mit der erhöhten Zellzahl angeborener Immunzellen gut vereinbar (**Abbildung 19E**). Makrophagen, Monozyten, Eosinophile und Neutrophile produzieren als

Reaktion auf eine Infektion reaktives Stickstoffmonoxid ([Bogdan, 2001](#)). Im Infektionsmodell der Pneumonie mit *S. pneumoniae* zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse nach 18 Stunden ebenfalls eine tendenziell erhöhte mikrobielle Belastung in der Lunge (**Abbildung 20C**). Ebenso waren signifikant mehr myeloide Immunzellen (Makrophagen, Monozyten, Eosinophile und Neutrophile) in der bronchoalveolären Lavage der PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse nachweisbar (**Abbildung 20B**). Auch in diesen Infektionsexperimenten könnte die erhöhte Anzahl von einwandernden Immunzellen als Kompensationseffekt die verminderte bakterielle Phagozytoseleistung in den Immunzellen der PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse erklären. PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten auch eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage, die als Parameter für das Ausmaß einer Lungenschädigung gilt (**Abbildung 20D**). Dies könnte sowohl auf die erhöhte Bakterienlast als auch auf die erhöhte Anzahl von Immunzellen zurückzuführen sein, die im Rahmen der Immunantwort das umliegende Gewebe schädigen. Im Gegensatz zum Infektionsmodell mit *E. coli* Bakterien zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse bei einer Infektion mit *S. pneumoniae* eine nicht signifikant reduzierte Konzentration von NOS in der Lavage (**Abbildung 20E**). Die verstärkte Entzündung bei gleichzeitig verminderter bakterieller Elimination in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen spiegelt sich auch in der Überlebenswahrscheinlichkeit wider. PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen am dritten Tag nach Infektion mit *S. pneumoniae* einen signifikant höheren Gewichtsverlust (ca. -20%) im Vergleich zu WT Mäusen (ca. -4%), der mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit nach zwei Wochen in PACC1<sup>-/-</sup> (ca. 10%) im Vergleich zu WT Mäusen (ca. 53%) einherging (**Abbildung 20F+G**). Da ein ähnlicher Phänotyp sowohl in der monomikrobiellen Sepsis mit gramnegativen *E. coli* Bakterien als auch in einem Pneumonie-Infektionsmodell mit grampositiven *S. pneumoniae* Bakterien beobachtet wurde, deutet dies auf eine breitere Beteiligung von PACC1 an der antibakteriellen Immunantwort hin. Interessanterweise zeigten PACC1<sup>-/-</sup> BMDM eine reduzierte Migration, wenn sie mit dem Chemokin und dem Komplementfaktor C5a stimuliert wurden ([Zeziulia et al., 2022](#)). Die Autoren vermuten, dass dies auf eine verminderte Volumenreduktion der Makropinosomen in PACC1<sup>-/-</sup> Zellen zurückzuführen ist ([Zeziulia et al., 2022](#)), da dysfunktionale Makropinosomen sehr groß sind und viel Plasmamembran enthalten und dadurch z. B. die Menge an C5a-Rezeptoren auf der Plasmamembran reduzieren könnten ([Freeman et al., 2020](#)). Diese *in vitro* Beobachtung steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen nach intraperitonealer

Applikation von inaktivierten *E. coli* pHrodo grün Konjugaten (**Abbildung 18**), Infektion mit lebenden *E. coli* (**Abbildung 19**), oder *S. pneumoniae* Bakterien (**Abbildung 20**) mehr Immunzellen gemessen wurden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass trotz der eingeschränkten Migrationsfähigkeit in PACC1<sup>-/-</sup> Zellen andere, wie z. B. eine erhöhte Chemokinfreisetzung, diesen Zustand überkompensieren und es deshalb in den *in vivo* Infektionsmodellen zu einer verstärkten Immunzellinfiltration kommt. Möglicherweise unterliegt auch die Chemotaxis von Immunzellen, die aus dem Blut in das Gewebe infiltrieren, nicht der PACC1-vermittelten gestörten Makropinozytose.

Die ersten Zellen, die mit invasiven *S. pneumoniae* Bakterien in der Lunge in Kontakt kommen, sind Epithelzellen und geweberesidente Immunzellen. Dazu gehören Makrophagen in den Alveolen und Lymphozyten im Interstitium wie T- und B-Gedächtniszellen, ILCs und nicht-klassische T-Zellen wie MAITs. Da der Beobachtungszeitraum von 18 Stunden für die Initiierung einer klassischen, adaptiven Immunantwort über z. B. Antigen-präsentierende dendritische Zellen zu kurz ist, stammen die in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesenen Zytokine wahrscheinlich von bereits vorhandenen Zellen oder von Zellen, die bei einer Entzündung rasch einwandern, wie Monozyten und Neutrophile. Insgesamt passen die erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der bronchoalveolären Lavage von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen gut zu dem beobachteten Phänotyp, dass PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse während einer bakteriellen Infektion mehr Immunzellen und mehr Lungenschaden aufweisen, was zu einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit beitragen kann. Die erhöhte Zytokinkonzentration könnte ein Kompensationseffekt aufgrund einer verminderten bakteriellen Elimination in PACC1<sup>-/-</sup> Phagozyten sein. Darüber hinaus könnte auch eine erhöhte Zahl von Immunzellen am Entzündungsort die erhöhte Zytokinfreisetzung bewirken (**Abbildung 21**).

### **PACC1 ist an der Produktion von ROS beteiligt**

Das antimikrobielle Repertoire der Zellen des angeborenen Immunsystems umfasst auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. In den Phagolysosomen von Makrophagen und Neutrophilen reagieren die gebildeten ROS unspezifisch mit

Biomolekülen, indem sie Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oxidieren. Dies führt z. B. zur Störung von Eisen-Schwefel-Zentren in der Atmungskette von Bakterien. Außerdem aktivieren ROS phagosomale Proteasen, die phagozytierte Mikroben verdauen (Lambeth, 2004). Die NADPH Oxidase erzeugt aus Sauerstoff Superoxid, das seinerseits spontan zu Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikalen reagieren kann. Darüber hinaus katalysieren die Myeloperoxidase und die eosinophile Peroxidase die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridion zu hypochloriger Säure und anderen Oxidantien (Lambeth, 2004, Sies & Jones, 2020). PACC1 könnte an der Bildung von ROS beteiligt sein, indem es die luminale Chloridionkonzentration reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition des Chloridionenflusses oder ein chloridfreies Milieu den oxidativen Burst in Neutrophilen reduziert (Menegazzi et al., 1996). Daher ist davon auszugehen, dass Chloridion als Substrat für die volle Entfaltung der antimikrobiellen ROS-Produktion wichtig ist. Unter unstimulierten Bedingungen waren die intrazelluläre ROS-Konzentration in peritonealen PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen signifikant erhöht, nicht jedoch in PACC1<sup>-/-</sup> Eosinophilen. Nach Aktivierung mit opsonierten *E. coli* Bakterien kehrte sich dieses Bild um. Während die ROS-Konzentration in PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen auf das Niveau von WT Zellen gesenkt wurden, stiegen die ROS-Konzentration in PACC1<sup>-/-</sup> Eosinophilen signifikant an (**Abbildung 17**). Die in Abwesenheit inflammatorischer Stimuli detektierten intrazellulären ROS sind vermutlich mitochondrialen Ursprungs und ein Nebenprodukt der Zellatmung. Die signifikant erhöhten ROS-Werte in PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen unter unstimulierten Bedingungen könnten daher auf eine erhöhte Abhängigkeit der PACC1<sup>-/-</sup> Zellen von OXPHOS im stationären Zustand hinweisen. In der metabolischen Echtzeitstudie zeigte sich jedoch keine Veränderung der Sauerstoffverbrauchsrate unter unstimulierten Bedingungen in peritonealen PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen im Vergleich zu WT Zellen (**Abbildung 16C**). Da die ROS-Produktion nach bakterieller Stimulation in peritonealen PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen und Eosinophilen entgegengesetzt war, ist es schwierig, eine plausible Schlussfolgerung über die Rolle von PACC1 in diesem Prozess zu ziehen. Sicher scheint nur, dass PACC1 sowohl unter unstimulierten als auch unter stimulierten Bedingungen einen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Konzentration hat und dass dieser Einfluss möglicherweise zellspezifisch ist. Um die Rolle von PACC1 bei der ROS-Produktion besser zu verstehen, kann es sinnvoll sein, andere Chloridionenkanäle, die an diesem Prozess beteiligt sind, zu betrachten,

um Rückschlüsse auf PACC1 zu ziehen. Dazu gehört z. B. der endosomale H<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Antiporter CIC-3. CIC-3<sup>-/-</sup> Neutrophile in der Maus zeigen einen reduzierten oxidativen Burst durch verminderte NADPH Oxidase-Aktivität, Phagozytose und transendotheliale Migration (Moreland et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wäre zu erwarten, dass in aktivierten PACC1<sup>-/-</sup> Phagozyten auch die Fähigkeit zur Produktion von ROS reduziert ist. Möglicherweise ist PACC1 zusammen mit anderen Chloridionenkanälen wie CIC-3 an der Regulation der luminalen Chloridionenkonzentration und damit an der Produktion von ROS beteiligt.

### **PACC1 könnte auch für die Immunantwort gegen andere Krankheitserreger wichtig sein**

Ein Defekt des *Pacc1* Gens führt zu einer schlechteren Eliminierung der extrazellulären Bakterien *E. coli* und *S. pneumoniae* und zu einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit während einer Pneumonie (**Abbildung 19-21**). PACC1 ist folglich an der Immunantwort gegen diese Pathogene beteiligt. Es wäre daher interessant, PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse mit anderen Pathogenen zu infizieren, um zu untersuchen, ob PACC1 an der Immunantwort allgemein beteiligt ist oder ob die Effekte auch pathogenspezifisch sind. Falls die Hypothese zutrifft, dass PACC1 eine Rolle bei der phagolysosomalen Verdauung aufgenommener Mikroben spielt, wäre es besonders interessant, Pathogene zu untersuchen, deren Pathomechanismus eine Interaktion mit dem Phagolysosom beinhaltet, z. B. die obligat intrazellulären Bakterien *Mycobacterium tuberculosis* und *Coxiella burnetii* oder die fakultativ intrazellulären Bakterien *Legionella pneumophila* und *Listeria monocytogenes* (Flannagan et al., 2009). Neben bakteriellen Infektionen könnte PACC1 auch bei der Immunabwehr von Pilzen wie *Candida* oder *Aspergillus* eine Rolle spielen, da auch hier die Phagozytose ein wichtiger Teil der Immunantwort gegen diese Erreger ist (Brown, 2011). Auch Leishmanien wären interessante Kandidaten, um zu untersuchen, ob PACC1 eine Rolle in diesem immunologischen Pathomechanismus spielt. Leishmanien sind Parasiten mit einem Replikationszyklus im Phagolysosom von Makrophagen und Neutrophilen. Nach der Phagozytose durchlaufen Leishmanien im Phagolysosom eine Metamorphose von Promastigoten zu Amastigoten und sind so in der Lage, der Verdauung zu entgehen (Kaye & Scott,

2011). Darüber hinaus wären auch Viren interessant, die für ihre Replikation auf das endosomale System angewiesen sind. Insbesondere SARS-CoV-2, dessen Proteine an PACC1 binden (Stukalov et al., 2021), wäre ein bevorzugter Kandidat. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) die Aktivität von PACC1 hemmt (Mihaljević et al., 2023, Ko et al., 2024). Die Autoren stellten daher die Hypothese auf, dass PIP<sub>2</sub> an der Modulation der Immunantwort durch PACC1 beteiligt sein könnte. Sie wiesen darauf hin, dass die Hülle bestimmter Pathogene wie HIV eine erhöhte PIP<sub>2</sub> Dichte aufweist (Mücksch et al., 2019). Durch die Fusion der Pathogenmembran mit der Wirtsmembran könnte PIP<sub>2</sub> in räumliche Nähe zu PACC1 gelangen und so die PACC1 Aktivität zum Vorteil des Virus modulieren (Mihaljević et al., 2023). Ob PACC1 tatsächlich auf diese Weise während einer viralen Infektion inhibiert wird, ist noch nicht getestet, unterstreicht aber die mögliche Bedeutung von PACC1 in der Infektionsimmunologie.

### **Hypoxische Bedingungen beeinträchtigen weder die Aktivierung noch die Viabilität von PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen**

Entzündetes Gewebe ist häufig durch einen lokalen Abfall des Sauerstoffgehalts gekennzeichnet, was zu einer hypoxischen Mikroumgebung führt (Eltzschig & Carmeliet, 2011). Während einer bakteriellen Infektion ist Hypoxie ein charakteristisches Merkmal (Werth et al., 2010, Thompson et al., 2017). Da der *Pacc1* Locus vermehrt Mutationen aufweist, die mit der Höhenanpassung von Mensch und Schwein in Verbindung gebracht wurden (Yi et al., 2010, Dong et al., 2014), könnte PACC1 auch unter hypoxischen Bedingungen während einer Infektion eine Rolle spielen. In zwei durchgeführten Experimenten, in denen BMDM unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) versus normoxischen (20% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert wurden, konnten keine Unterschiede in der Viabilität nach 48 Stunden oder in der Expression der kostimulatorischen Marker CD80 und CD86 nach LPS-Aktivierung festgestellt werden (Abbildung 23+24). Es ist möglich, dass PACC1 keine Rolle bei der Anpassung an hypoxische Bedingungen spielt oder dass die modulierten *in vitro* Versuchsanordnungen die *in vivo* Bedingungen, z. B. während einer bakteriellen Infektion in entzündetem Gewebe, nicht ausreichend widerspiegeln. Es ist auch möglich, dass Unterschiede in einem nicht getesteten Parameter wie Phagozytose,

Zytokinfreisetzung oder Antigenpräsentation unter hypoxischen Bedingungen auftreten.

### 9.3 Das Interaktionsnetzwerk und die Regulation von PACC1 bleiben unvollständig charakterisiert, deuten aber auf eine Beteiligung an diversen zellulären Prozessen hin

**PACC1 bindet an eine Reihe immunologisch relevanter Proteine. Die biologische Konsequenz dieser Interaktion ist jedoch noch ungeklärt**

PACC1 ist ein neuartiges Protein, dessen Struktur und biologische Funktion erst kürzlich entdeckt wurden und noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Dennoch konnten in drei unabhängigen Studien 113 Bindungspartner von humanem PACC1 durch Affinitätsbindung und anschließende Massenspektrometrie bzw. das Zwei-Hybrid-System identifiziert werden. Diese erlauben eine erste Einordnung, an welchen zellulären Prozessen PACC1 beteiligt sein könnte. Im immunologischen Kontext sind vor allem Proteine der Signaltransduktion (STAT3), des Stoffwechsels (mTOR) und der Antigenpräsentation (HLA-C, HLA-DR) von Interesse (**Abbildung 14, Tabelle 2+3**).

STAT3 ist ein mutmaßlicher Interaktionspartner von humanem PACC1 ([Huttlin et al., 2017](#)) und vermittelt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Aktivitäten durch die Transduktion von Zytokinsignalen in die Zelle, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert. STAT3 ist an der Akute-Phase-Reaktion von IL-6 sowie an der Vermittlung der entzündungshemmenden Eigenschaften von IL-10 beteiligt ([O'Shea & Plenge, 2012](#)). Darüber hinaus wird STAT3 durch IFN $\beta$  aktiviert, interferiert allerdings negativ mit der durch diese IFNs stimulierten Immunantwort ([Wang et al., 2011b](#)). Eine Beeinträchtigung der STAT3-Phosphorylierung, wenn PACC1 als Interaktionspartner fehlt, konnte in peritonealen PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen und B-Zellen nach Stimulation mit IL-6, IL-10, IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$  nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 15**). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine oder mehrere andere Phosphorylierungsstellen als das untersuchte Tyrosin<sup>705</sup> dennoch verändert sein könnten. Es ist auch möglich, dass die Phosphorylierung von STAT3 unabhängig von einer Interaktion mit PACC1 abläuft, aber die durch STAT3 als Transkriptionsfaktor vermittelten Effekte beeinträchtigt sein könnten. Eine Möglichkeit für zukünftige Experimente wäre, die durch IL-6, IL-10 oder IFN $\beta$  Stimulation induzierten und durch STAT3 vermittelten Veränderungen der Genexpression mittels qPCR oder RNA-Sequenzierung in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT zu untersuchen. Es könnte aber auch sein, dass die Interaktion von PACC1 und STAT3 erst in einem komplexen

immunologischen Geschehen zum Tragen kommt, das sich von den *in vitro* Stimulationsbedingungen ausgewählter Zytokine unterscheidet und daher nicht gemessen werden konnte. Die Interaktion von PACC1 und STAT3 ist auch im Zusammenhang mit den durchgeführten Pneumonieexperimenten von Interesse. STAT3 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Resilienz der Lunge und ein Gegenspieler des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFkB (Quinton & Mizgerd, 2015). Bei einer Infektion mit *S. pneumoniae* zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu WT eine stärkere Entzündung, eine schlechtere Elimination der Bakterien und eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit (**Abbildung 20+21**). Der in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtete Phänotyp könnte eine Kombination aus einer verminderten Immunantwort, z. B. der PACC1-vermittelten phagolysosomale Ansäuerung, und einer verminderten Geweberesilienz aufgrund einer gestörten PACC1-STAT3-Interaktion sein.

Ein weiterer identifizierter Bindungspartner von humanem PACC1 ist die Serin/Threonin Kinase mTOR (Huttlin et al., 2017, Huttlin et al., 2021), die in Form der mTOR-Komplexe (mTORC) 1 und 2 an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist, unter anderem an der Regulation des Immunstoffwechsels. mTORC1 erhöht die Glucoseaufnahme, Glykolyse, OXPHOS und Fettsäuresynthese, während der Fettsäureabbau reduziert wird (Pollizzi & Powell, 2014). Eine räumliche Nähe, die eine Interaktion zwischen PACC1 und mTOR ermöglicht, könnte am Lysosom stattfinden. Aminosäuren führen zur Rekrutierung und Aktivierung von mTORC1 an der lysosomalen Oberfläche, wo anschließend Proteine abgebaut und Aminosäuren recycelt werden (Sancak et al., 2010). Vor diesem Hintergrund wäre es möglich, dass mTORC1 über die Regulation der PACC1 Aktivität den Lysosomstoffwechsel, z. B. den pH-Wert und die Chloridionenkonzentration im Lumen, moduliert. Da mTOR eine Serin/Threonin Kinase ist, könnte diese Modulation z. B. über die Phosphorylierung von Serinresten (Serin<sup>9,14,24</sup>) am N-Terminus von PACC1 erfolgen. In Echtzeit-Metabolismusstudien zeigten PACC1<sup>-/-</sup> peritoneale Makrophagen unter unstimulierten Bedingungen keine Veränderung der Glykolyse oder OXPHOS. Auch in der extrazellulären Ansäuerung als Parameter der Glykolyse waren nach 18 Stunden LPS-Stimulation keine Unterschiede nachweisbar. Anders verhielt es sich mit der Sauerstoffverbrauchsrate als Parameter für die OXPHOS. Nach 18 Stunden LPS-Stimulation zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen eine um die Hälfte reduzierte basale und maximale Respiration. Die mit der ATP-Produktion assoziierte Respiration war bei

PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen ebenfalls um etwa die Hälfte reduziert (**Abbildung 16**). Es wäre interessant zu untersuchen, ob diese Veränderungen im Immunstoffwechsel nach entzündlichem Stimulus für den Phänotyp in Infektionsmodellen mitverantwortlich sind, z. B. indem weniger Energie für die Immunantwort in PACC1<sup>-/-</sup> Zellen zur Verfügung gestellt wird. Darüber hinaus wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Stoffwechseleränderungen auf die Interaktion von PACC1 mit mTOR zurückzuführen sind. Da mTORC1 durch Aminosäuren aktiviert und zum Lysosom rekrutiert wird, wären Stoffwechselstudien zur PACC1-mTOR-Interaktion unter Zugabe und Mangel von Aminosäuren interessant. In T-Zellen ist mTOR ebenfalls wichtig für die Aktivierung und Differenzierung (Pollizzi & Powell, 2014). Eine mögliche funktionelle Bedeutung der PACC1-mTOR-Achse im adaptiven Immunsystem wurde bisher nicht untersucht. Ein weiterer zellulärer Prozess, bei dem eine Interaktion zwischen PACC1 und mTOR eine Rolle spielen könnte, ist die Autophagie. Autophagie umfasst eine Reihe von Prozessen, bei denen Proteine oder ganze Organellen zur Verdauung in das Lysosom transportiert werden (Yamamoto et al., 2023). Die Rolle von PACC1 in der Autophagie wurde bisher nicht untersucht.

HLA-C (MHC-I) und HLA-DR (MHC-II) präsentieren Antigene gegenüber CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen und sind mutmaßliche Interaktionspartner von humanem PACC1 (Huttlin et al., 2015, Huttlin et al., 2021). MHC-I und MHC-II kommen in der Plasmamembran und im Endosom vor, MHC-II insbesondere auch im späten Endosom und Lysosom (Neefjes et al., 2011), wo eine Interaktion mit PACC1 stattfinden könnte. Hier könnte PACC1 an der Kontrolle des phagolysosomalen und luminalen pH-Wertes und der Chloridionenkonzentration beteiligt sein, um optimale Bedingungen für den mikrobiellen Verdau, die Antigenprozessierung und die MHC-II-Beladung zu gewährleisten. In PACC1<sup>-/-</sup> dendritischen Zellen war die Induktion des frühen T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 (IL-2 Rezeptor) im Vergleich zu WT Zellen signifikant reduziert (**Abbildung 22B+C**). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Antigenpräsentation in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen eingeschränkt ist, auch wenn in einem nachfolgenden Experiment gezeigt werden konnte, dass die beobachteten Effekte unabhängig von der Stärke der TCR:MHC-II Induktion sind (**Abbildung 22D**). Möglicherweise sind auch kostimulatorische Proteine oder freigesetzte Zytokine am Phänotyp beteiligt, die jedoch im Kontext der Antigenpräsentation noch nicht untersucht wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Volumenreduktion des Makropinosoms in PACC1<sup>-/-</sup> BMDM eingeschränkt ist (Zeziulia

et al., 2022). Die Makropinozytose ist wichtig für die Antigenpräsentation der dendritischen Zellen (Norbury, 2006) und könnte den beobachteten Phänotyp teilweise erklären. Die Feinsteuerung des pH-Wertes im Lysosom ist wichtig für seine verschiedenen Funktionen. Stark angesäuerte Lysosomen sind eher an katabolen Stoffwechselprozessen beteiligt, während weniger stark angesäuerte Lysosomen die Antigenpräsentation unterstützen (Freeman et al., 2022). PACC1 könnte in Zusammenarbeit mit der V-Typ ATPase und anderen Kanälen wie CIC-7 eine Schlüsselrolle bei der Feinregulation dieser Prozesse spielen.

Darüber hinaus wurde das humane PACC1 Protein als mutmaßlicher Interaktionspartner der viralen Proteine von SARS-CoV (ORF7B) und SARS-CoV-2 (ORF3A, ORF7B) identifiziert (Stukalov et al., 2021). In diesem Zusammenhang könnte PACC1 ein mögliches Zielprotein für die virale Modulation der Wirtszelle sein. SARS-CoV könnte über die Modulation der PACC1 Aktivität die Antigenpräsentation im Sinne einer Immunvermeidungsstrategie reduzieren. Darüber hinaus könnte die Modulation der PACC1 Aktivität auch für die virale Replikation von Bedeutung sein.  $\beta$ -Coronaviren wie SARS-CoV-2 verlassen die Zelle nicht über den für behüllte Viren üblichen sekretorischen Weg, sondern über lysosomale Exozytose (Ghosh et al., 2020). Dadurch wird das Lysosom entsäuert und die Verdauung und Antigenpräsentation eingeschränkt. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass durch die virale Modulation von PACC1 die luminalen Ansäuerung im späten Endosom oder Lysosom reguliert wird, um eine effektive Freisetzung von SARS-CoV-2 aus der infizierten Wirtszelle zu gewährleisten. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass in einer Studie *Pacc1* als ein Top-Gen identifiziert wurde, das bei Überexpression die virale Replikation von SARS-CoV-2 einschränkt (Biering et al., 2022).

### **Die Regulation der PACC1 Aktivität ist bisher nur in Ansätzen verstanden**

Das intrazelluläre Netzwerk, das die Aktivität von PACC1 reguliert, ist unvollständig. Die Aktivität von PACC1 scheint jedoch unabhängig von Calciumionen (Auzanneau et al., 2003, Nobles et al., 2004, Yamamoto & Ehara, 2006, Kittl et al., 2019), Magnesiumionen (Lambert & Oberwinkler, 2005), ATP (Yamamoto & Ehara, 2006, Capurro et al., 2015) und von G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu sein (Yamamoto

& Ehara, 2006, Ko et al., 2024). Diese anfänglichen Ergebnisse stimmen mit dem derzeitigen Forschungsstand überein, dass PACC1 ein pH-aktivierter Chloridionenkanal und kein ABC-Transporter oder G-Protein gekoppelter Rezeptor ist. Die pharmakologische Hemmung der Phosphorylierung durch PKA, PKC und PKG durch 1-(5-Isoquinolinsulfonyl)-2-methylpiperazin hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von PACC1, wohl aber die Hemmung der PI3K durch Wortmannin und der Tyrosinkinase durch Genistein (Capurro et al., 2015). Konservierte Phosphorylierungsstellen im N-terminalen PACC1 (Serin<sup>9,14,24</sup>, Tyrosin<sup>10</sup>) (<https://www.uniprot.org/>, Consortium, 2020) könnten Ziele dieser Phosphorylierung darstellen und an der intrazellulären Regulation der PACC1 Aktivität beteiligt sein. Darüber hinaus wurde Serin<sup>7</sup> als Phosphorylierungsstelle des humanen PACC1 Proteins identifiziert, das auch in Vertebraten konserviert ist (Ordureau et al., 2020). Die Serin/Threonin Kinase mTOR ist ein mutmaßlicher Interaktionspartner von humanem PACC1 und könnte für die Phosphorylierung von PACC1 mitverantwortlich sein. Die Untersuchung der PACC1 Aktivität nach pharmakologischer Hemmung mit einem mTOR-Inhibitor, z. B. mit dem Immunsuppressivum Rapamycin oder dessen Analoga, wurde bisher nicht auf diesen Zusammenhang getestet. Darüber hinaus besitzt humanes PACC1 einen vielversprechenden Aminosäurerest für die Ubiquitinierung (Lysin<sup>227</sup>), der in mehreren unabhängigen Studien identifiziert wurde (Emanuele et al., 2011, Beltrao et al., 2012, Akimov et al., 2018). Untersuchungen zur Aktivität von PACC1 nach pharmakologischer Hemmung der Ubiquitinierung oder nach Austausch der relevanten Aminosäure durch eine nicht-funktionelle Gruppe wurden bisher nicht durchgeführt. Im Allgemeinen stellen posttranslationale Modifikationen wichtige Kontrollmechanismen der Proteinaktivität dar. Die Hemmung der NADPH Oxidase durch Diphenyliodoniumchlorid oder durch das Peptid gp91ds-tat hatte keinen Effekt auf die PACC1 Aktivität, während ROS-Radikalfänger wie Tiron und N-Acetylcystein sowie die mitochondrialen Inhibitoren Rotenon und 5-Hydroxydecansäure die PACC1 Aktivität reduzierten (Fu et al., 2013). Diese Ergebnisse decken sich mit der veränderten intrazellulären ROS-Konzentration (**Abbildung 17**) und OXPHOS in den PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 16**). Die Hemmung von GTPasen, die z. B. an der Endozytose und Exozytose beteiligt sind, durch Dynasore reduzierte ebenfalls die Aktivität von PACC1 (Capurro et al., 2015). Dieser Befund stimmt mit der Lokalisation des PACC1 Proteins im endosomalen System überein (Osei-Owusu et al., 2021).

## 9.4 Potentielle Interaktionen von Polyphosphaten und PACC1

PACC1 wurde als Bindungspartner für langkettige Polyphosphate in Makrophagen der Maus durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] identifiziert. Ziel war es, die Wirtsproteine zu identifizieren, über welche die immunmodulatorischen Effekte von langkettigen Polyphosphaten, wie sie auch in Bakterien vorkommen, vermittelt werden. Darüber hinaus wurde PACC1 erstmals als pH-aktivierter Chloridionenkanal beschrieben. Darauf aufbauend wurde die Hypothese formuliert, dass PACC1 an der Immunantwort beteiligt ist und bakterielle Polyphosphate PACC1 als Zielstruktur für eine Immunausweichstrategie nutzen. In einer Kooperation mit dem Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin wurden HEK293 Zellen kurz- und langkettigen Polyphosphaten ausgesetzt und die PACC1 Aktivität bei neutralem und saurem pH gemessen. Dabei konnte unter keiner der Bedingungen ein konsistenter, signifikanter Effekt der Polyphosphate auf die PACC1 Aktivität nachgewiesen werden (**Abbildung 25**). Dies deutet darauf hin, dass Polyphosphate die Aktivität von PACC1 nicht modulieren. Andererseits hat die durchgeführte Studie auch Einschränkungen, welche die Möglichkeit offen lassen, dass Polyphosphate die Aktivität von PACC1 dennoch regulieren können. Zum einen repräsentieren die verwendeten HEK293-Zellen nicht die Phagozyten, z. B. Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Neutrophile, in denen bakterielle Polyphosphate die Immunantwort über die PACC1 Aktivität modulieren würden. Außerdem könnte die kurze Exposition von Polyphosphaten von 40 Sekunden nicht lang genug sein, um einen Effekt zu vermitteln. Ebenso könnte es sein, dass bakterielle Polyphosphate nicht allein, sondern in Kombination mit anderen Liganden einen immunmodulatorischen Effekt vermitteln. Unabhängig davon bleibt PACC1 für Bakterien ein attraktives Ziel für die Immunausweichstrategie. Wenn die Effekte nicht über Polyphosphate vermittelt werden, dann vielleicht über ein anderes bakterielles Molekül. Allerdings hat die ursprüngliche Aufreinigungsstrategie zur Identifizierung von Polyphosphat-bindenden Proteinen auch ihre Limitationen. Für die Affinitätsaufreinigung mittels polyphosphat-beschichteter Magnetkügelchen und anschließender Massenspektrometrie wurden keine lebenden Makrophagen, sondern Zelllysate verwendet (**Abbildung 9**). Die Bedingungen, unter denen auf diese Weise eine Bindung von langkettigen Polyphosphaten an PACC1 nachgewiesen wurde, unterscheiden sich von den physiologischen Bedingungen, unter denen eine Bindung während einer Infektion

stattfinden würde. Der verwendete Lysepuffer entspricht nicht der Zusammensetzung des angesäuerten Lumens des Phagolysosoms und könnte daher die Wechselwirkung zwischen Polyphosphaten und PACC1 beeinflussen. Die Bindungseigenschaften der Polyphosphate sind auf die sterische Kettenlänge und die starke negative Ladung zurückzuführen. Der pH-Wert und die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen beeinflussen diese Bindungseigenschaften weiter. Andererseits zeigen langkettige Polyphosphate auch in lebenden BMDM eine verminderte Phagozytoseleistung von *E. coli* pHrodo grün Konjugate (Roewe et al., 2020). Es ist daher davon auszugehen, dass Polyphosphate auch unter den Bedingungen des Phagolysosoms funktionell aktiv bleiben. Dennoch bedeutet eine nachgewiesene Bindung in der Affinitätsaufreinigung von langkettigen Polyphosphaten an PACC1 nicht zwangsläufig, dass damit auch eine biologische Wirkung einhergeht. Offen bleibt weiterhin die Frage, ob Polyphosphate von Bakterien aktiv freigesetzt werden, als Teil einer Immunabwehrstrategie, oder passiv entweichen, z. B. während des Verdauens im Phagolysosom. Interessanterweise sind Polyphosphate ein Bestandteil der Kapsel der pathogenen Bakteriengattung *Neisseria* (Noegel & Gotschlich, 1983, Tinsley et al., 1993) und vermitteln eine erhöhte Phagozytoseresistenz (Manca et al., 2023).

Polyphosphate sind bakterielle Stoffwechselprodukte und dienen als Energie- und Phosphatspeicher (Kulaev & Kulakovskaya, 2000). Andere bakterielle Moleküle wie LPS sind in der Lage, den Stoffwechsel von Immunzellen zu verändern (Jung et al., 2019). Da PACC1 unter anderem mTOR bindet (Huttlin et al., 2017, Huttlin et al., 2021), ein wichtiges Protein bei der Kontrolle des Immunstoffwechsels, sollte untersucht werden, ob mikrobielle Moleküle den Immunstoffwechsel über PACC1 vermitteln. Nach 18 Stunden Stimulation von WT und PACC1<sup>-/-</sup> peritonealen Makrophagen mit langkettigen Polyphosphaten oder in Kombination mit LPS konnte kein Effekt auf die Glykolyse festgestellt werden (**Abbildung 16B**). Im Gegensatz dazu erhöhten langkettige Polyphosphate die maximale Respiration und damit die respiratorische Reserve in PACC1<sup>-/-</sup> Zellen um ca. 30% im Vergleich zu WT Zellen. Auch in Kombination war die maximale Respiration in PACC1<sup>-/-</sup> Makrophagen um ca. 40% erhöht (**Abbildung 16C**), was darauf schließen lässt, dass PACC1 an der Vermittlung von langkettigen Polyphosphaten auf die OXHOS beteiligt ist.

In einer pharmakologischen Studie zur Modulation der PACC1 Aktivität konnte gezeigt werden, dass PIP<sub>2</sub> die PACC1 Aktivität hemmt und dass PIP<sub>2</sub> Derivate mit

zusätzlichen Phosphatgruppen und einer längeren Acylkette diese hemmenden Eigenschaften verstärken (Mihaljević et al., 2023), was darauf hindeutet, dass auch Polyphosphate an PACC1 binden und dessen Aktivität hemmen können. In HEK293T und Hefezellen wurde zudem beobachtet, dass eine intrazelluläre Überexpression von Polyphosphaten zu einer Polyphosphorylierung von Lysinresten führt. Diese Proteinmodifikationen führen zu einer Veränderung der Transkription und des Proteoms (Bentley-DeSousa et al., 2018, Bondy-Chorney et al., 2020). In PACC1 weist die C-terminale Domäne ebenfalls positive Aminosäurereste auf, darunter sechs Lysinreste bei Maus und Mensch (Lysin<sup>319,225,229,333,336,340</sup>), und wäre eine mögliche Bindungsstelle für stark negativ geladene Polyphosphate. Da die C-terminale Seite von PACC1 jedoch im Zytosol lokalisiert ist, müssten die Polyphosphate zuvor über die Zellmembran transportiert werden. Aufgrund der negativen Ladung und der Molekülgröße ist eine passive Diffusion über die Biomembran sehr unwahrscheinlich. In früheren Studien der Arbeitsgruppe von [REDACTED] [REDACTED] konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass langkettige Polyphosphate von BMDM internalisiert werden (Roewe et al., 2020).

## 9.5 Generierung zusätzlicher gentechnisch veränderter PACC1-Mausstämme zur weiteren Erforschung von PACC1

Zur Untersuchung der Rolle von PACC1 in der infektionsassoziierten Immunantwort wurde eine genetisch veränderte Maus mit einem globalen *Pacc1* Defekt verwendet. Die Maus wurde zuvor in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] mittels CRISPR/Cas9 erzeugt. Die Defizienz des *Pacc1* Gens wurde auf DNA- und RNA-Ebene verifiziert. Die Sanger-Sequenzierung zeigte eine Deletion in Exon 2, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon in Exon 4 führte (Strüve, 2019). In der PCR zeigte sich die Deletion auch dadurch, dass das amplifizierte DNA-Produkt um die Deletion kürzer war und daher elektrophoretisch schneller lief und außerdem keine Amplifikation mit einem Primerpaar stattfand, das an die deletierte Sequenz bindet (Abbildung 11C). Auf RNA-Ebene wurde die Defizienz des *Pacc1* Gens durch qPCR nachgewiesen, indem signifikant reduzierte Mengen an *Pacc1* Transkripten in der Zelle detektiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass das vorzeitige Stoppcodon in der *Pacc1* mRNA erkannt und durch Nonsense-vermittelten mRNA-Zerfall abgebaut wurde (Abbildung 11D). Dabei handelt es sich um einen Kontrollmechanismus, der die mRNA auf verfrühte Stoppcodons überprüft und diese eliminiert, um die Translation von möglicherweise dysfunktionalen Proteinen zu verhindern (Kurosaki et al., 2019). Beim Menschen gibt es zwei Isoformen der *Pacc1* mRNA, die durch alternatives Spleißen entstehen. Bei Mäusen ist nur eine Isoform bekannt (<https://www.uniprot.org/>, Consortium, 2020). Die Bestätigung des PACC1 Defektes auf Proteinebene steht noch aus, erweist sich aber als ungleich schwieriger. Hierfür wäre ein spezifischer Anti-Maus PACC1 Antikörper erforderlich, der die Defizienz z.B. mittels Durchflusszytometrie oder Western Blotting nachweisen könnte. Darüber hinaus wäre auch eine Genomsequenzierung zur Validierung von CRISPR/Cas9-induzierten Deletionen außerhalb des anvisierten *Pacc1* Locus von Vorteil. Trotz der ubiquitären Expression von *Pacc1* sind PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse gesund und fruchtbar mit erwartbaren Wurfgrößen und Geschlechterverhältnissen (Abbildung 11D). Die hohe Expression von *Pacc1* in Spermatozyten und Spermatogonien (Abbildung 12A) scheint die für eine normale Fortpflanzung erforderliche männliche Fertilität in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zu beeinträchtigen.

Die Generierung zusätzlicher gentechnisch veränderter Mäuse zur weiteren Untersuchung von PACC1 wäre vorteilhaft, um z. B. das Interaktionsnetzwerk von PACC1 zu präzisieren und zu erweitern. Eine vielversprechende Methode zur

Untersuchung von murinen Bindungspartnern *in vivo* ist die näherungsabhängige Biotin-Identifizierung (BioID). Bei dieser Technik wird das zu untersuchende Protein mit einer mutierten Biotinligase fusioniert. Diese Ligase biotinyliert dann unspezifisch Lysinreste in der räumlichen Nähe des fusionierten Proteins. Durch anschließende Affinitätsaufreinigung mit Streptavidin und Massenspektrometrie können Interaktionspartner und proximale Proteine *in vivo* identifiziert werden (Branon et al., 2018, Go et al., 2021). Durch die Präzisierung des PACC1 Interaktoms könnte die Rolle von PACC1 in verschiedenen zellulären Prozessen noch besser beschrieben werden, um daraus Rückschlüsse auf die Funktion und Bedeutung von PACC1 im Immunsystem zu ziehen.

Darüber hinaus würde die Generierung von Mäusen mit einem gewebe- oder zellspezifischen Defekt des *Pacc1* Gens helfen, die in den Infektionsmodellen beobachteten Phänotypen besser zu beschreiben und die Effekte einem Zelltyp zuzuordnen. Bei diesem Ansatz werden vor und hinter dem Zielgen palindromische DNA-Sequenzen eingefügt, die als Locus von X über P1 (LoxP) bezeichnet werden. Diese von loxP-Stellen flankierten *Pacc1* Mäuse könnten dann mit Mäusen verpaart werden, die ein Zyklisierungsrekombinationsenzym (CRE) unter einem zell- oder gewebespezifischen Promotor exprimieren. Mit diesen Mäusen könnte beispielsweise *Pacc1* in geweberesidenten Makrophagen der Lunge oder des Peritoneums deletiert werden, da diese Zelltypen in den verwendeten Infektionsmodellen der Pneumonie und Sepsis als erste mit den Erregern in Kontakt kommen, diese phagozytieren und die initiale Immunantwort einleiten. Interessant wäre auch eine zellspezifische Deletion von *Pacc1* in dendritischen Zellen, da dieser Zelltyp die Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem bildet, um die Beteiligung von PACC1 an der Antigenpräsentation weiter zu untersuchen.

Schließlich wäre auch ein Mausmodell mit Überexpression von *Pacc1* von Interesse. In bisherigen Infektionsexperimenten mit *S. pneumoniae* und *E. coli* wurde in PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen eine stärkere Entzündung beobachtet, die positiv mit einer erhöhten mikrobiellen Belastung und einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit korrelierte (**Abbildung 19-21**). Vor diesem Hintergrund wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Überexpression von PACC1 die antimikrobielle Resistenz erhöht und das Überleben verbessert. Dazu müsste rekombinantes *Pacc1* unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors in das Mausgenom integriert werden. In kleinerem Maßstab könnte dies auch in Zellen erfolgen, die mit einem

Konstrukt transfiziert sind, das *Pacc1* überexprimiert.

## 9.6 PACC1 ist ein potenzielles Ziel für therapeutische Anwendungen

### Die Modulation der PACC1 Aktivität könnte für die Behandlung von Infektionskrankheiten genutzt werden

PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit während einer bakteriellen Lungeninfektion mit *S. pneumoniae* (**Abbildung 20**). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine Erhöhung der PACC1 Aktivität das Überleben während einer bakteriellen Infektion verbessern würde. Neben der therapeutischen Anwendung zur Erhöhung der PACC1 Aktivität, um die Immunantwort gegen eine bakterielle Infektion zu steigern, wäre es auch interessant zu untersuchen, ob eine erhöhte PACC1 Aktivität prophylaktisch eingesetzt werden könnte, um die Wirksamkeit von Impfungen zu verbessern. Adjuvantien werden Impfstoffen zugesetzt, um das Immunsystem zu aktivieren und so eine erfolgreiche Immunisierung zu ermöglichen (Pulendran et al., 2021). Während in der Vergangenheit klassischerweise Adjuvantien zur Aktivierung von PRR eingesetzt wurden, werden heute auch Adjuvantien zur Modulation des Stoffwechsels, der Epigenetik oder des Zelltods erforscht, um die Impfeffizienz zu erhöhen (Pulendran et al., 2021). Ob die Modulation der PACC1 Aktivität in Zukunft auf diese Weise genutzt werden kann, hängt von weiteren Ergebnissen auf diesem Gebiet ab, insbesondere von der Bedeutung von PACC1 für die Antigenpräsentation und die T- bzw. B-Zellaktivierung. Am Beispiel der Herausforderungen, die sich aus der zunehmenden Resistenz von *S. pneumoniae* gegenüber Antibiotika und Impfstoffen ergeben, wird die Notwendigkeit der Erforschung und Entwicklung neuer Ansätze deutlich (Pichichero, 2017).

Die Modulation der PACC1 Aktivität könnte auch über die Regulation der vorhandenen PACC1 Menge erfolgen. WT und PACC1<sup>-/-</sup> BMDM wurden mit verschiedenen mikrobiellen Substanzen behandelt, um festzustellen, ob diese einen Effekt auf die *Pacc1* mRNA-Level haben (**Abbildung 13**). Die TLR2-Liganden Zymosan und PGN, der TLR3-Ligand Poly(I:C), der auch die zytosolischen RNA-Sensoren Retinsäure-induzierbares Gen I (RIG-I) und Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5) aktiviert, und der TLR9-Ligand CpG ODN führten zu einer Reduktion der relativen *Pacc1* mRNA von ca. -70%. Eine Stimulation mit IFN $\gamma$  reduzierte die *Pacc1* mRNA ebenfalls um ca. -65%. Die stärkste Herunterregulation

wurde mit dem TLR4-Liganden LPS mit ca. -80% beobachtet. Im Gegensatz dazu induzierten IFN $\beta$  und dsDNA, die TLR9 und verschiedene zytosolische DNA-Sensoren aktiviert, die relative Expression der *Pacc1* mRNA um ca. 75%. GpC ODN führte zu einem Anstieg von etwa 50%. Langkettige Polyphosphate und cGAMP, das den zyklischen GMP-AMP-Synthase (cGAS) Stimulator von Interferongen (STING) Signalweg aktiviert, hatten keinen Einfluss auf das Expressionsniveau. Interessanterweise hatten nicht alle inflammatorischen Stimuli den gleichen Effekt, was darauf hindeuten könnte, dass *Pacc1* je nach immunologischem Kontext unterschiedlich reguliert wird. Wie sich die veränderte *Pacc1* mRNA-Level auf die Translation, also die Menge des in der Zelle vorhandenen PACC1 Proteins, und damit auf die PACC1 Aktivität auswirkt, bleibt aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten unbekannt. Mit einem spezifischen Anti-PACC1 Antikörper wäre eine Quantifizierung der Proteinmenge z. B. im Western Blot oder ELISA möglich. Eine Herunterregulation der *Pacc1* mRNA als Reaktion auf entzündliche Stimuli könnte ein möglicher Schutzmechanismus sein, da es bei einer Infektion zu einer lokalen Ansäuerung des Gewebes kommt (Manosalva et al., 2022). Da PACC1 am säureinduzierten Zelltod beteiligt ist (Ullrich et al., 2019, Yang et al., 2019, Osei-Owusu et al., 2020), könnte eine geringere Menge an PACC1 die Resistenz gegen säureinduzierten Zelltod erhöhen. Andererseits könnte dadurch auch die Immunantwort abgeschwächt werden.

Bei der Immuntherapie ist der Zeitpunkt der Behandlung wichtig. In einem frühen Stadium der Infektion kann eine Verstärkung der Immunantwort hilfreich sein, um die Mikroben einzudämmen und zu eliminieren. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion könnte eine zu starke Immunantwort jedoch zu immuninduzierten Schäden führen (Wallis et al., 2023). PACC1 ist ein interessanter Kandidat für beide Szenarien der Immuntherapie, wenn es gelingt, die Aktivität von PACC1 je nach Infektionsverlauf zu erhöhen oder zu senken, um die Immunantwort entweder zu verstärken oder zu dämpfen.

### **Bisher existieren keine PACC1 spezifischen niedermolekularen Inhibitoren**

Eine Reihe von Molekülen mit hemmenden Eigenschaften auf die PACC1 Aktivität im mikro- bis nanomolaren Bereich wurden bereits identifiziert, sind aber nicht spezifisch

für PACC1 (**Tabelle 4**). Die meisten pharmakologischen Studien wurden an Zelllinien durchgeführt. Zu den getesteten Verbindungen gehören: 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS) (Auzanneau et al., 2003, Nobles et al., 2004, Lambert & Oberwinkler, 2005, Yamamoto & Ehara, 2006, Wang et al., 2007, Shi et al., 2009, Sato-Numata et al., 2014, Capurro et al., 2015, Valinsky et al., 2017, Kittl et al., 2019, Ko et al., 2024), Niflumsäure (Nobles et al., 2004, Yamamoto & Ehara, 2006, Wang et al., 2007, Capurro et al., 2015, Sato-Numata et al., 2016), 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure (NPPB) (Capurro et al., 2015, Valinsky et al., 2017), Phloretin (Wang et al., 2007, Sato-Numata et al., 2014), Flufenaminsäure (Lambert & Oberwinkler, 2005, Wang et al., 2007, Valinsky et al., 2017), Diphenylamin-2-carbonsäure (DPC) (Auzanneau et al., 2003, Capurro et al., 2015), Suramin (Sato-Numata et al., 2016), Arachidonsäure (Sato-Numata et al., 2016), R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]-essigsäure (DIOA) (Sato-Numata et al., 2016), Simvastatin (Shi et al., 2009), Pregnenolonsulfat (Drews et al., 2014), Dehydroepiandrosteronsulfat (Drews et al., 2014), 4-(2-Butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentyl-1-oxo-2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxy)-butansäure (DCPIB) (Kittl et al., 2019, Kittl et al., 2020), 1,9-Dideoxyforskolin (DDFSK) (Nobles et al., 2004), Glibenclamid (Yamamoto & Ehara, 2006) und PIP<sub>2</sub> (Mihaljević et al., 2023). DIDS ist der am häufigsten getestete Inhibitor der PACC1 Aktivität. PIP<sub>2</sub> ist bisher der einzige Inhibitor, für den ein Mechanismus beschrieben wurde. PIP<sub>2</sub> bindet an die extrazelluläre Seite der TMD und stabilisiert die desensibilisierte Konformation von PACC1 (Mihaljević et al., 2023). Neben fehlenden PACC1-spezifischen niedermolekularen Inhibitoren gibt es auch keine blockierenden Anti-PACC1 Antikörper. Für humanes PACC1 wurden bioinformatisch zwei nicht-kodierende microRNAs (miRNAs), hsa-miR-325 und hsa-miR-510-5p, identifiziert (Zhang et al., 2020b). miRNA regulieren über RNA-Interferenz die Menge an mRNA in der Zelle (Pasquinelli, 2012). Die Modulation der *Pacc1* mRNA und damit des in der Zelle translatierten Proteins durch gezielte Interferenz mittels miRNA könnte auch therapeutisch genutzt werden (Rupaimoole & Slack, 2017).

Tabelle 4 | Niedermolekulare Inhibitoren der PACC1 Aktivität

Inhibitor	IC <sub>50</sub> [µM]	Zelle	Quelle
<b>DIDS</b>	0,5	SK-N-MC, HEK293, HBE, CFBE41o	Capurro et al., 2015
	2,9	HEK293	Lambert & Oberwinkler, 2005
	-	HEK293	Nobles et al., 2004

Inhibitor	IC <sub>50</sub> [µM]	Zelle	Quelle
	-	HEK293	Ko et al., 2024
	-	Murine kardiale Myozyten	Yamamoto and Ehara, 2006
	0,12	HeLa	Wang et al., 2007
	4,7	Murine kortikale Neuronen	Sato-Numata et al., 2014
	-	MDCT	Valinsky et al., 2017
	-	RAW264.7	Shi et al., 2009
	-	BV-2	Kittl et al., 2019
	-	HEK293, SH-SY5Y	Cai et al., 2021
		Ratte Sertoli-Zellen	Auzanneau et al, 2003
<b>Niflumsäure</b>	-	SK-N-MC, HEK293, HBE, CFBE41o	Capurro et al., 2015
	-	HEK293	Nobles et al., 2004
	-	Murine kardiale Myozyten	Yamamoto and Ehara, 2006
	-	HeLa	Wang et al., 2007
	11,0	HeLa	Sato-Numata et al., 2016
<b>NPPB</b>	-	SK-N-MC, HEK293, HBE, CFBE41o	Capurro et al., 2015
	-	MDCT	Valinsky et al., 2017
<b>DPC</b>	-	SK-N-MC, HEK293, HBE, CFBE41o	Capurro et al., 2015
		Ratte Sertoli-Zellen	Auzanneau et al, 2003
<b>Phloretin</b>	17,5	HeLa	Wang et al., 2007
	22,0	Murine kortikale Neuronen	Sato-Numata et al., 2014
<b>Flufenaminsäure</b>	-	HEK293	Lambert & Oberwinkler, 2005
	-	HeLa	Wang et al., 2007
	-	MDCT	Valinsky et al., 2017
<b>Suramin</b>	0,05	HeLa	Sato-Numata et al., 2016
<b>Arachidonsäure</b>	8,92	HeLa	Sato-Numata et al., 2016
<b>DIOA</b>	1,90	HeLa	Sato-Numata et al., 2016
<b>Simvastatin</b>	13,77	RAW264.7	Shi et al., 2009
	-	Humane Blutmonozyten	Shi et al., 2009
<b>Pregnenolonsulfat</b>	5,1	HEK293	Drews et al., 2014
<b>Dehydroepiandrosteronsulfat</b>	25,7	HEK293	Drews et al., 2016
<b>DCPIB</b>	-	BV-2	Kittl et al., 2019
	-	C28/I2, Humane Chondrozyten	Kittl et al., 2020
<b>DDFSK</b>	-	HEK293	Nobles et al., 2004
<b>Glibenclamid</b>	-	Murine kardiale Myozyten	Yamamoto and Ehara, 2006
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,91	HEK293	Mihaljević et al., 2023
	-	HEK293	Ko et al., 2024

Für manche Substanzen ist eine inhibierende Wirkung beschrieben, aber keine mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) ermittelt. **SK-N-MC**: Humane Neuroblastoma; **HEK293**: Humane embryonale Nierenzellen; **HBE**: Humane bronchiale Epithelzellen; **CFBE41o**: Humane bronchiale Epithelzellen; **HeLa**: Humane Epithelzellen; **MDCT**: Murine renale Epithelzellen; **RAW264.7**: Murine Makrophage; **BV-2**: Murine Mikroglia; **C28/I2** Chondrozyten.

## Therapeutische Bedeutung von PACC1 bei nicht-infektiösen Erkrankungen

*Pacc1* ist im Datensatz des Cancer Genome Atlas ein prognostischer Biomarker für Leberkarzinome, wobei eine hohe Expression mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000065600-PACC1>, Uhlén et al., 2015) (Zhang et al., 2020b). Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine transiente Reduktion der *Pacc1* mRNA durch RNA-Interferenz zu einer verminderten Proliferation, Migration und Invasion sowie Phosphorylierung von PI3K/PKB in der Leberkarzinomzelllinie HepG2 führt (Song et al., 2022). Darüber hinaus könnte *Pacc1* auch ein Marker für andere solide Tumore sein. So wird *Pacc1* z. B. in Dickdarmkrebs differenziell exprimiert (Chen et al., 2022, Wang et al., 2022b). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Phänotyp von PACC1 überexprimierenden Mäusen zu untersuchen, um herauszufinden, ob dadurch vermehrt Tumoren entstehen. Bisher wurden nur Experimente zur erhöhten PACC1 Aktivität auf zellulärer Ebene durchgeführt. Funktionsgewinnmutationen wie die Dreifachmutation Histidin<sup>98,130,131</sup>Arginin (Osei-Owusu et al., 2022) oder Tryptophan<sup>304</sup>Asparagin (Cai et al., 2021) reduzieren die pH-Sensitivität. Dies führt in den Zelllinien HEK203 und SH-SY5Y bei neutralem pH zu einem säureinduzierten Zelltod, ähnlich wie unter zu sauren Bedingungen (Cai et al., 2021).

Neben Krebserkrankungen könnte PACC1 auch bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems von Bedeutung sein. PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse sind vor säureinduziertem Zelltod geschützt (Yang et al., 2019), ebenso wie primäre kortikale Neuronen von Ratten nach transientscher Reduktion der *Pacc1* mRNA durch RNA-Interferenz (Osei-Owusu et al., 2020). Für die Behandlung des ischämischen Schlaganfalls wäre daher eine Hemmung der PACC1 Aktivität wahrscheinlich vorteilhaft, um das Absterben der Neuronen zu verhindern. Bisher wurden jedoch keine Studien mit pharmakologischen Interventionen an Mäusen durchgeführt, die spezifisch auf den PACC1-vermittelten säureinduzierten Zelltod während eines ischämischen Schlaganfalls abzielen. Da Gewebsazidose ein charakteristisches Merkmal einer Vielzahl von Erkrankungen ist, wurde spekuliert, dass PACC1 auch an der Pathogenese von Sepsis, COPD und Asthma (Sinha et al., 2022), sowie der Karzinogenese und ischämischen Reperfusionsschäden (Cai et al., 2021) beteiligt sein könnte. Die PACC1 Aktivität ist temperaturabhängig und die Sensitivität der PACC1 Aktivierung nimmt mit steigender Temperatur ab (Sato-Numata et al., 2013, Sato-Numata et al.,

2014, Yang et al., 2019). Daher wurde spekuliert, ob eine Kryotherapie zur Regulierung der PACC1 Aktivität protektiv gegen den säureinduzierten Zelltod beim ischämischen Schlaganfall sein könnte (Okada et al., 2021). Therapeutische Hypothermie ist neuroprotektiv und wird bereits bei ischämischen Hirnschädigungen eingesetzt (Yenari & Han, 2012). Umgekehrt wäre es interessant zu untersuchen, ob Fieber und lokale Erwärmung bei Entzündungen die PACC1 Aktivität und damit die PACC1 vermittelte antimikrobielle Aktivität erhöhen. Zudem wurde PACC1 als potentielle Zielstruktur für zwei Wirkstoffe vorgeschlagen, deren Effekte durch oder zumindest teilweise über PACC1 vermittelt werden. Das Anästhetikum Chloralhydrat aktiviert PACC1 pH-abhängig mit einer mittleren wirksamen Konzentration ( $EC_{50}$ ) von 22 mM, wobei Chloralhydrat wahrscheinlich die aktive Konformation von PACC1 stabilisiert. Außerdem sind PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse weniger empfindlich gegenüber der Wirkung des Anästhetikums (Xu et al., 2022). Darüber hinaus wurde in einer Exom-Sequenzierung ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im humanen *Pacc1* Gen entdeckt, der mit dem positiven Ansprechen auf das Neuroleptikum Risperidon zur Behandlung von Schizophrenie in Zusammenhang stehen könnte (Zhao et al., 2022). Im zentralen Nervensystem wurde *Pacc1* in drei unabhängigen Studien als eines der am stärksten differenziell exprimierten Gene identifiziert. In einer Studie zur therapeutischen Behandlung des ischämischen Schlaganfalls wurden Mäusen durch virale Transfektion modifizierte T-Zellen injiziert, die das entzündungshemmende Zytokin IL-10 überexprimieren. Fünf Tage nach dem Schlaganfall wurde RNA aus der gesamten ischämischen Hemisphäre isoliert und mittels Nanostring-Technologie untersucht. *Pacc1* war eines der Gene, das durch die Behandlung am stärksten herunterreguliert wurde (Benakis et al., 2022). Zweitens wurde *Pacc1* in murinen Mikroglia mittels Nanostring-Technologie als eines der am stärksten regulierten Gene identifiziert, das für Funktion, Entzündung oder Neuroprotektion nach Stimulation mit LPS oder in Kombination mit Lumateperon verantwortlich ist (Dutheil et al., 2022). Lumateperon ist als Antipsychotikum zur Behandlung von Schizophrenie und bipolarer Depression zugelassen, indem es Neurotransmitter wie Serotonin und Glutamat im Gehirn moduliert. Unter entzündlichen Bedingungen reduziert Lumateperon proinflammatorische Zytokine im Gehirn und im Serum (Dutheil et al., 2022). Drittens war *Pacc1* in einer RNA-Sequenzierung von isolierten menschlichen Mikroglia aus dem Precuneus von Alzheimer-Patienten signifikant reduziert (Sobue et al., 2021). Angesichts der hohen Expression von humanem *Pacc1* im

menschlichen Zentralnervensystem (**Abbildung 12**) ist es naheliegend, dass PACC1 an physiologischen, immunologischen und pathochemischen Prozessen im Gehirn beteiligt ist.

PACC1<sup>-/-</sup> HEK293T und HeLa Zellen zeigen eine verbesserte Transferrinaufnahme bei unveränderter Kinetik des Recycling-Endosoms (Osei-Owusu et al., 2021). Da Mutationen im *Pacc1* Genlocus mit einer Höhenanpassung assoziiert sind (Yi et al., 2010, Dong et al., 2014), wurde spekuliert, dass die gesteigerte Transferrin-Endozytose ein molekularer Mechanismus für die Anpassung an hypoxische Bedingungen und eine gesteigerte Erythropoese sein könnte (Osei-Owusu et al., 2021). Allerdings zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse keine Symptome einer Eisenspeicherkrankheit wie Osteoporose, chronische Müdigkeit, Diabetes mellitus, Melanoderma oder Leberschäden (Brissot et al., 2018). Eine labormedizinische Bestimmung der Hämoglobinkonzentration und Erythrozytenzahl wurde bisher noch nicht durchgeführt.

### **Im Vergleich zu anderen Chloridionenkanalopathien entwickeln PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse keinen prägnanten Phänotyp**

Die Dysregulation des Chloridionentransports über Biomembranen ist die Grundlage verschiedener Chloridionenkanalopathien. Um die Bedeutung von PACC1 für den Organismus zu verstehen, ist es interessant, den Phänotyp von PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen mit bereits beschriebenen Chloridionenkanalopathien zu vergleichen.

CIC-3 ist ein H<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Antiporter im späten Endosom und in synaptischen Vesikeln (Stauber & Jentsch, 2013) und ist an der luminalen Ansäuerung (Stobrawa et al., 2001, Hara-Chikuma et al., 2005) und Sekretion (Maritzen et al., 2008) beteiligt. CIC-3<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen Entwicklungsstörungen der Netzhaut und des Hippocampus sowie eine erhöhte Mortalität (Stobrawa et al., 2001, Yoshikawa et al., 2002). Bisherige Untersuchungen an PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen scheinen keine ähnlichen Einschränkungen zu zeigen, obwohl PACC1 im Zentralnervensystem stark exprimiert wird (**Abbildung 12B**), dort aber deutlich mehr in Gliazellen als in neuronalen Zellen (**Abbildung 12A**).

CIC-5 ist ein H<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Antiporter im frühen Endosom und im Recycling-Endosom (Stauber & Jentsch, 2013) und wird in den proximalen Tubuluszellen der Niere

exprimiert, wo CIC-5 an der Endozytose und somit an der renalen Resorption beteiligt ist (Piwon et al., 2000, Wang et al., 2000). Ein defekter CIC-5 wurde als molekulare Ursache des Dent-Syndroms identifiziert (Lloyd et al., 1996). Das klinische Bild des Dent-Syndroms ist gekennzeichnet durch niedermolekulare Proteinurie, Aminosäurenurie, Glykosurie, Phosphaturie, Urikosurie, Hyperkalziurie, Nephrokalzinose, Nephrolithiasis und progressive Niereninsuffizienz (Devuyst & Thakker, 2010). *Pacc1* ist ebenfalls in der Niere und insbesondere in den proximalen Tubuluszellen stark exprimiert (**Abbildung 12**). Eine Beteiligung von PACC1 an der Nierenfunktion ist daher naheliegend. Eine offensichtliche Beeinträchtigung der Nierenfunktion konnte bei den PACC1<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch nicht festgestellt werden, auch wenn eine labormedizinische Untersuchung des Urins bisher nicht durchgeführt wurde.

Der H<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Antiporter CIC-6 wird in den späten Endosomen von Neuronen exprimiert (Stauber & Jentsch, 2013). Ein genetischer Defekt von CIC-6 führt zu einer verminderten Schmerzempfindlichkeit, zu Verhaltensstörungen und zur lysosomalen Speicherkrankheit, der neuronalen Ceroid Lipofuszinose (Poët et al., 2006). Lysosomen sind spezielle Organellen, in denen Makromoleküle zerkleinert werden und Defekte können zur Anhäufung unverdauter, zelltoxischer Makromoleküle führen (Platt et al., 2018). Interessanterweise war der lysosomale pH in CIC-6<sup>-/-</sup> Mäusen nicht verändert (Poët et al., 2006). PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keine Symptome einer neuronalen Ceroid Lipofuszinose, obwohl dies nicht explizit getestet wurde.

CIC-7 ist ein H<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Antiporter im späten Endosom und Lysosom (Stauber & Jentsch, 2013) und ein Defekt führt bei Mäusen und Menschen zu Osteoporose, die auf dysfunktionale Osteoklasten und eine gestörte Knochenresorption zurückzuführen ist (Kornak et al., 2001). Darüber hinaus zeigen CIC-7<sup>-/-</sup> Mäuse einen verkümmerten Habitus und sterben nach bis zu 7 Wochen (Kornak et al., 2001). CIC-7<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen auch eine retinale und neuronale Degeneration. Diese ist auf eine lysosomale Speicherkrankheit, ähnlich einer neuronalen Ceroid Lipofuszinose, zurückzuführen (Kasper et al., 2005, Lange et al., 2006). Ähnlich wie bei CIC-6<sup>-/-</sup> Mäusen gibt es keine Unterschiede im pH-Wert von CIC-7<sup>-/-</sup> Lysosomen (Kornak et al., 2001). Daraus wurde geschlossen, dass CIC-7 nicht an der lysosomalen Ansäuerung beteiligt ist und dass der lysosomale pH-Wert nicht an der Pathogenese beteiligt ist (Kornak et al., 2001). Im Gegensatz zu CIC-7<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse keinen vergleichbaren Phänotyp. Heterozygote und homozygote PACC1<sup>-/-</sup>

Mäuse entwickelten sich normal und zeigten keine schweren retinalen oder neuronalen Schäden, obwohl dies experimentell nicht untersucht wurde.

CFTR ist ein ABC-Transporter und Chloridionenkanal, dessen Defekt zur Entwicklung von zystischer Fibrose führt. Diese Erkrankung ist durch eine Verdickung der Schleimhaut gekennzeichnet, die zu einer Beeinträchtigung der Atmung und einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen führt (Ratjen et al., 2015). Die Datenlage zur Rolle des CFTR in alveolären Makrophagen ist widersprüchlich. Ob CFTR an der Regulation des phagolysosomalen pH beteiligt ist oder nicht, ist noch nicht abschließend geklärt (Di et al., 2006, Haggie & Verkman, 2007, Deriy et al., 2009, Steinberg et al., 2010). Auch bei *PACC1*<sup>-/-</sup> in Mäusen zeigte sich analog zu *CFTR*<sup>-/-</sup> eine verschlechterte, aber nicht signifikante bakterielle Elimination und eine erhöhte Suszeptibilität (**Abbildung 20**). Ob *PACC1* ähnlich wie *CFTR* den phagolysosomalen pH-Wert steuert oder ob dies nur eine untergeordnete Rolle bei der Erklärung der verminderten Resistenz gegenüber einer bakteriellen Infektion spielt, muss noch abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend unterscheidet sich der *PACC1*<sup>-/-</sup> Phänotyp von den anderen genannten Chloridionenkanalopathien, da er unter physiologischen Bedingungen keine starke Beeinträchtigung zeigt. Dies ist besonders interessant, da *Pacc1* ubiquitär exprimiert wird (**Abbildung 12**). Ein sichtbarer Phänotyp wurde bislang nur während eines ischämischen Schlaganfalls (Yang et al., 2019) und während einer bakteriellen Infektion beobachtet (**Abbildung 19-21**).

## 9.7 Das intestinale Immunsystem wird durch bakterielle Polyphosphate beeinflusst

### Bakterielle Polyphosphate verändern das Epigenom intestinaler T-Zellen

Um die Rolle bakterieller Polyphosphate auf das intestinale Immunsystem zu untersuchen, wurden keimfreie Mäuse mit Wildtyp *E. coli* Bakterien, die Polyphosphate produzieren können, oder mit einer  $\Delta ppk$  *E. coli* Mutante, die keine Polyphosphate produzieren kann, monokolonisiert (**Abbildung 26**). Eine epigenetische ATAC-Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lamina propria des Kolons zeigte mehr als 12.000 Chromatinregionen, die zwischen den beiden Gruppen mehr oder weniger zugänglich waren (**Abbildung 27B**). Diese Studie ist der erste Nachweis, dass bakterielle Polyphosphate das Epigenom von Immunzellen verändern können. Interessanterweise reichte eine Monokolonisation von 3 Wochen aus, um epigenetische Veränderungen durch Polyphosphate zu induzieren. Eine Monokolonisation über einen längeren Zeitraum oder unter realen Bedingungen in SPF Mäusen würde wahrscheinlich zu noch größeren Veränderungen führen. Darüber hinaus war die Chromatinzugänglichkeit für die Gene *Stat1*, *Stat3* und *Il10* in der Polyphosphat-produzierenden WT *E. coli* Gruppe signifikant reduziert (**Abbildung 27C**). Diese Gene sind an immunologischen Prozessen beteiligt und Teil des IL-27 Signalwegs in T-Zellen ([Yoshida & Hunter, 2015](#)).

### Bakterielle Polyphosphate interferieren mit dem IL-27 Signalweg

IL-27 ist ein heterodimeres Zytokin, das je nach Kontext sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt ([Yoshida & Hunter, 2015](#)). Darüber hinaus gehört IL-27 zusammen mit IL-12, IL-23 und IL-35 zur IL-12 Familie, die eine wichtige Rolle in der intestinalen Immunität spielt ([Neurath, 2008](#)). Während IL-12 und IL-23 proinflammatorisch wirken und an der Entstehung von Kolitis beteiligt sind, ist die Rolle von IL-27 weniger klar ([Andrews et al., 2016](#)). Ein möglicher Zusammenhang zwischen bakteriellen Polyphosphaten und der Modulation des IL-27-Signalwegs für seine Bedeutung auf das intestinale Immunsystem sollte daher weiter untersucht werden. IL-27 bindet an den IL-27 Rezeptor, der wiederum zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 führt und die Genexpression z. B. von IL-10 induziert

(Yoshida & Hunter, 2015). Langkettige Polyphosphate, wie sie auch von Bakterien synthetisiert werden, blockierten die IL-27-induzierte Phosphorylierung von STAT1 in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (**Abbildung 28B**). Ob diese partielle Blockade des IL-27-Signalweges auch einen Einfluss auf die Effektoreigenschaften der T-Zellen hat, wurde nicht untersucht. Interessant wäre auch zu untersuchen, ob die hemmenden Effekte von Polyphosphaten auch für andere Zytokin-vermittelte STAT-Phosphorylierungen gelten, insbesondere für die strukturell verwandten Mitglieder der IL-12-Familie. Im Zusammenhang mit dem IL-27-Signalweg und der Blockade der STAT1-Phosphorylierung durch langkettige Polyphosphate wäre es interessant, auch STAT3 zu untersuchen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bakterielle Polyphosphate den IL-27-Signalweg in T-Zellen interferieren, sollte die Wirkung auf IL-27-produzierende Zellen untersucht werden. IL-27 wird hauptsächlich von Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten produziert (Yoshida & Hunter, 2015). Zu diesem Zweck wurden diesmal keine Zellen aus der Lamina propria des Kolons monokolonisierter Mäuse verwendet, da die Anzahl der IL-27-produzierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen und Monozyten) gering ist. Stattdessen wurden Zellen aus dem Peritoneum verwendet, da diese Zellen etwa ein Drittel der gesamten Zellpopulation ausmachen (Ghosn et al., 2010). Die Zellen wurden über Nacht mit langkettigen Polyphosphaten stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die bioinformatische Analyse konzentrierte sich ebenfalls auf die *Stat* Gene, insbesondere auf *Stat1*. STAT1 wird durch Typ-I und Typ-II-Interferone stimuliert und induziert die Expression von IL-27 in Makrophagen (Yoshida & Hunter, 2015). Durch Einzelkern-ATAC- und RNA-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Polyphosphaten zu einer signifikanten Reduktion der *Stat1* Expression führt. Diese Reduktion zeigte sich in allen untersuchten Zelltypen, war jedoch nur in großen Peritonealmakrophagen, Monozyten und B1- und B2-Zellen statistisch signifikant, wahrscheinlich aufgrund der kleinen Gruppengröße. Auf epigenetischer Ebene war die Chromatinzugänglichkeit des *Stat1* Gens in Polyphosphat-stimulierten Zellen reduziert, ähnlich wie in CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Polyphosphat-produzierenden WT *E. coli* monokolonisierten Mäusen. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant in stimulierten Peritonealzellen im Vergleich zu T-Zellen aus der Lamina propria monokolonisierter Mäuse. Dies könnte auf die kleinere Gruppengröße oder die kürzere Expositionszeit zurückzuführen sein. Die Peritonealzellen wurden nur über Nacht mit Polyphosphaten stimuliert, während die

T-Zellen aus der Lamina propria drei Wochen lang mit Polyphosphat-produzierenden *E. coli* monokolonisiert wurden. In BMDMs hemmen langkettige Polyphosphate die LPS-induzierte Phosphorylierung von STAT1 im Western Blot und in der Durchflusszytometrie (Roewe et al., 2020). Dies unterstreicht, dass Polyphosphate auf verschiedenen Ebenen (Epigenom, Expression, Proteinphosphorylierung) in die Funktion von STAT1 eingreifen.

### **Wie Polyphosphate die Epithelzellbarriere überwinden, um auf die Immunzellen der Lamina propria zu wirken, ist noch ungeklärt**

Bakterien siedeln im Darmlumen und sind durch eine Schicht von Epithelzellen von den Immunzellen der Lamina propria getrennt. Es stellt sich daher die Frage, wie die beobachteten Effekte bakterieller Polyphosphate auf die Darmimmunität vermittelt werden. Eine Möglichkeit könnten dendritische Zellen sein, die kleine Fortsätze ausbilden, um Antigene aus dem Darmlumen durch die Epithelzellschicht aufzunehmen (Farache et al., 2013). Die Aufnahme von Polyphosphaten könnte auch über spezialisierte Epithelzellen, Becherzellen (McDole et al., 2012, Knoop et al., 2015) oder M-Zellen (Jang et al., 2004) erfolgen. Diese Zellen können das Antigen apikal durch Endozytose aufnehmen und basal durch Exozytose abgeben. Dadurch wird das Antigen nicht prozessiert und gelangt in die Nähe der Immunzellen (Mabbott et al., 2013). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Barriereintegrität des Darmepithels lokal zusammenbricht und Bakterien und extrazelluläre Polyphosphate mit Immunzellen in der Lamina propria in Kontakt treten.

### **Langkettige Polyphosphate modulieren einen proinflammatorischen Phänotyp**

Polyphosphate haben zahlreiche biologische Funktionen, darunter eine chemotaktische Wirkung. Sowohl kurzkettige Polyphosphate, wie sie in Thrombozyten vorkommen, als auch langkettige Polyphosphate, wie sie in Bakterien vorkommen, induzieren die Chemotaxis von Neutrophilen (Hou et al., 2018, Du et al., 2019, Suess et al., 2019, Krenzlin et al., 2023). Auch die Injektion einer sterilen Lösung von langkettigen Polyphosphaten in das Peritoneum von Mäusen führte

innerhalb von 16 Stunden zur Infiltration von Neutrophilen (**Abbildung 30**). Um sicherzustellen, dass diese Effekte nicht auf Artefakte durch Mikroverletzungen infolge der Injektion zurückzuführen sind, wurde Kontrollmäusen eine sterile PBS-Lösung verabreicht. Die Injektion von PBS führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Neutrophilenzahl, was darauf hindeutet, dass die beobachtete Neutrophilenrekrutierung auf einen biologischen Effekt der langkettigen Polyphosphate zurückzuführen ist, wie in der Literatur beschrieben ([Krenzlin et al., 2023](#)). Darüber hinaus wirkten langkettige Polyphosphate auch auf Monozyten. Gleichzeitig führte die Polyphosphatinjektion zu einer Abnahme des Anteils großer peritonealer Makrophagen, ein Phänomen, das typischerweise während einer Infektion beobachtet wird ([Cassado et al., 2015](#)). Große peritoneale Makrophagen migrieren während einer Infektion ins Omentum und sind dort an der Immunantwort beteiligt ([Ghosn et al., 2010](#), [Okabe & Medzhitov, 2014](#)). Interessanterweise kann auch die Injektion einer sterilen Polyphosphatlösung ohne zusätzliche proinflammatorische Stimuli oder die Anwesenheit von Erregern einen ähnlichen Phänotyp induzieren. Die Injektion der PBS-Kontrolle zeigte zwar ebenfalls einen Effekt, dieser war jedoch weniger ausgeprägt als bei der Polyphosphatinjektion. Dies deutet darauf hin, dass die Injektion selbst einen gewissen Einfluss hat, die Polyphosphate jedoch zusätzlich die Migration großer peritonealer Makrophagen fördern. Bemerkenswert ist auch, dass die chemoaktiven Effekte nicht auf myeloide Zellen wie Neutrophile und Monozyten beschränkt waren, sondern sich auch auf lymphoide Zellen erstreckten. Während die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant anstieg, nahm die Zahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Polyphosphatinjektion ab. Die Bedeutung dieser durch langkettige Polyphosphate ausgelösten migratorischen Effekte im Kontext von Infektionen ist noch nicht ausreichend erforscht. Beispielsweise führt die intratracheale Injektion von Polyphosphaten zu einer verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen und infolgedessen zu einer Lungenschädigung ([Krenzlin et al., 2023](#)). Im Gegensatz dazu zeigt die Peritoneallavage von Mäusen, die mit WT und Polyphosphat-defizienten *Δppk E. coli* monokolonisiert wurden, bei einer durch Perforation des Caecums induzierten Sepsis eine erhöhte Anzahl von Monozyten und Makrophagen bei *Δppk E. coli* monokolonisierten Mäusen ([Roewe et al., 2020](#)). Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass die Effekte bakterieller Polyphosphate während der Infektionsdynamik komplexer sind und wahrscheinlich im Zusammenspiel mit anderen Faktoren wirken als unter isolierten Bedingungen.

## 9.8 Polyphosphate könnten ein neuer Ansatz zur Behandlung von Darmerkrankungen sein

### Bakterielle Polyphosphate und der IL-27/STAT-Signalweg in der intestinalen Immunantwort

Polyphosphate beeinflussen die Biologie von IL-27 auf unterschiedliche Weise. Einerseits hemmen sie die Signaltransduktion von IL-27 in T-Zellen, indem sie die Phosphorylierung von STAT1 hemmen (**Abbildung 28B**) und die Chromatinzugänglichkeit von IL-27 induzierten Genen (*Stat1*, *Stat3*, *I110*) reduzieren (**Abbildung 27C**). Außerdem reduzieren sie die Expression von *Stat1* in Makrophagen, das seinerseits die Produktion von IL-27 induziert (**Abbildung 29D**). Die Beeinflussung des IL-27 Signalwegs durch bakterielle Polyphosphate könnte ein Mechanismus sein, über den das Mikrobiom die Darmimmunität verändert. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diesen Mechanismus zu bestätigen und zu präzisieren. Beispielsweise ein adoptiver Transfer von T-Zellen aus der Lamina propria des Kolons von monokolonisierten WT und  $\Delta ppk$  *E. coli* Mäusen in immunsupprimierte Mäuse ohne funktionelle T-Zellen. Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob die Veränderung des Epigenoms der T-Zellen einen Einfluss auf deren Reaktivität hat. Unter anderem sollte untersucht werden, ob die durch Monokolonisierung mit Polyphosphat-produzierenden WT *E. coli* reduzierte Chromatinzugänglichkeit von *I110* funktionelle Konsequenzen wie die Entwicklung einer Kolitis in den Empfängermäusen hat. Bei einem Transfer von Lamina propria Zellen aus dem Kolon monokolonisierter WT und  $\Delta ppk$  *E. coli* Mäuse in RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten WT, nicht aber  $\Delta ppk$  *E. coli* transferierte Empfängermäuse Durchfall. Dies führte zu einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit (Arbeitsgruppe von ██████████, Daten nicht gezeigt).

Mechanistisch wirkt IL-27 vermutlich antiinflammatorisch und damit protektiv gegen Darmentzündungen, indem es durch Hemmung von ROR $\gamma$ t die Entwicklung von proinflammatorischen T<sub>H</sub>17-Zellen blockiert (Diveu et al., 2009), STAT1/3-abhängig die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 induziert (Stumhofer et al., 2007) und ebenfalls STAT1/3-abhängig T<sub>reg</sub>-ähnliche Zellen induziert (Awasthi et al., 2007, Murugaiyan et al., 2009, Wang et al., 2011a). Die Rolle von IL-27 in der intestinalen Immunität ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, da einige Publikationen widersprüchlich sind (Andrews et al., 2016).

Die Mehrzahl der Publikationen zeigt eine schützende Wirkung von IL-27 gegen Darmentzündungen. So sind T<sub>reg</sub>-Zellen mit einem Defekt in der  $\alpha$ -Untereinheit des IL-27 Rezeptors (IL-27R $\alpha$  im Gegensatz zu WT T<sub>reg</sub>-Zellen nicht in der Lage, die Entwicklung einer Zelltransferinduzierten Kolitis in der Maus zu verhindern (Do et al., 2016). Auch im chemisch induzierten murinen Kolutismodell führt ein Mangel an IL-27R $\alpha$  zu einer erhöhten Darmentzündung und einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit (Troy et al., 2009). Interessanterweise hatte die Gabe von IL-27 in keiner Studie einen negativen Effekt auf die Darmentzündung, was darauf hindeutet, dass die schützenden, antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-27 überwiegen. Dies galt sowohl für verschiedene experimentelle Modelle als auch für verschiedene Applikationswege: orale Gabe von rekombinanten IL-27 exprimierenden Bakterien im Zelltransfer-induzierten Kolutismodell (Hanson et al., 2014) und im chemisch induzierten Kolutismodell (McLean et al., 2017), subkutane Injektion von IL-27 im chemisch induzierten Kolutismodell (Sasaoka et al., 2011), die Verabreichung von rekombinatem IL-27 bei *Clostridium difficile* induzierter Kolitis (Wang et al., 2017), und die systemische Verabreichung von IL-27 über Adeno-assoziierte virale Vektoren im Zelltransferinduzierten Kolutismodell (Zhu et al., 2016).

Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien, dass IL-27 die Darmentzündung fördert. Bei chemisch induzierter Kolitis zeigen IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> eine geringere Darmentzündung (Honda et al., 2005) und auch nach dem Transfer von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> T-Zellen führt dies zu einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit der Empfängermäusen (Cox et al., 2010). Die Unterschiede zwischen den Studien könnten durch unterschiedliche Methoden in Bezug auf das Geschlecht und den genetischen Hintergrund der Spender- und Empfängertiere, das Mikrobiom sowie die Isolationstechnik, das Spenderorgan und die Anzahl und den Subtyp der übertragenen Zellen erklärt werden. Obwohl die meisten Daten auf eine schützende Rolle von IL-27 durch entzündungshemmende Eigenschaften hindeuten, sind weitere Experimente erforderlich, um dies endgültig zu klären.

## **Polyphosphate und bakterielle Polyphosphatsynthese als neue therapeutische Zielstrukturen**

Durchfallerkrankungen, die häufig auf bakterielle Darminfektionen zurückzuführen sind, gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen in Ländern mit niedrigem Einkommen (**Tabelle 1**). In Ländern mit hohem Einkommen stellen entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine erhebliche gesundheitliche Belastung dar. Allein in Europa und den USA sind 3,5 Millionen Menschen von entzündlichen Darmerkrankungen betroffen, mit steigender Inzidenz ([Jairath & Feagan, 2020](#)). Hinzu kommt, dass etwa 30% der Patienten nicht auf eine Behandlung ansprechen und bei weiteren 50% die Wirksamkeit der Behandlung nachlässt ([Chang, 2020](#)). Daher ist es notwendig, neue therapeutische Interventionen zu entwickeln. Da Polyphosphate sowohl bei Infektionen als auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen könnten, stellen sie ein attraktives Ziel für die Entwicklung dieser neuen Therapien dar.

Zur Behandlung von Thrombosen stehen seit einiger Zeit kurzkettige Polyphosphate aus Thrombozyten als neue Zielstrukturen für antithrombotische und antiinflammatorische Interventionen im Fokus ([Smith et al., 2012](#), [Travers et al., 2014](#), [Zhu et al., 2015](#), [Labberton et al., 2016](#), [Mailer et al., 2019](#), [La et al., 2023](#)). Langkettige bakterielle Polyphosphate und das bakterielle Polyphosphatproduzierende Enzym PPK könnten auch als Zielstrukturen für verschiedene bakterienassoziierte Erkrankungen dienen. Insbesondere bei Darmerkrankungen könnten bakterielle Polyphosphate eine Rolle bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen, aber auch von chronischen Entzündungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa spielen. Bisher gibt es kein zugelassenes Medikament, das extrazelluläre Polyphosphate gezielt eliminiert. Eine Möglichkeit, extrazelluläre Polyphosphate zu entfernen, ist die Gabe der Polyphosphatase PPX. In einem anderen Zusammenhang, bei der Behandlung einer monomikrobiellen *E. coli* Sepsis im Mausmodell, zeigte die Gabe von rekombinanter PPX einen 100%igen Schutz, während unbehandelte Tiere eine Überlebenschance von ca. 60% aufwiesen ([Roewe et al., 2020](#)). Dass Polyphosphate eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der Sepsis spielen, zeigt sich daran, dass in einer monomikrobiellen Sepsis polyphosphatbildende *E. coli* eine Überlebenschance von ca. 40% haben, während  $\Delta ppk$  *E. coli* eine Überlebenschance

scheinlichkeit von ca. 80% haben (Roewe et al., 2020). Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Gabe von PPX in ähnlicher Weise eine Darmentzündung, z. B. nach T-Zell-Transfer, lindern könnte. Allerdings könnte hier der Applikationsweg ein Hindernis darstellen, da aktives PPX in das Darmlumen gelangen müsste, um dort extrazelluläres Polphosphat enzymatisch zu verdauen. Eine andere Möglichkeit wäre eine probiotische Behandlung, bei der rekombinante kommensale Bakterien verabreicht werden, die PPX überexprimieren und in ihre Umgebung freisetzen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verabreichung von makromolekularen polykationischen Inhibitoren, die aufgrund ihrer positiven Ladung negativ geladene Polyphosphate binden und neutralisieren können (Travers et al., 2014, Abbina et al., 2022, La et al., 2023). Polykationische Inhibitoren zeigen antithrombotische Aktivität in einem murinen Thrombosemodell, da sie in der Lage sind, kurzkettige Polyphosphate aus Thrombozyten zu inaktivieren (La et al., 2023).

Um die Menge an extrazellulären Polyphosphaten zu reduzieren, könnte die bakterielle Polyphosphatsynthese des Schlüsselenzyms PPK blockiert werden. PPK ist für das Wirkstoffdesign besonders geeignet, da Eukaryoten kein PPK besitzen und somit das Risiko von Nebenwirkungen reduziert wird. Eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen zeigen eine Reduktion der PPK-Enzymaktivität (Bowlin & Gray, 2021). Eine besonders interessante Verbindung unter diesen Kandidaten ist Mesalamin, da es ein zugelassenes Medikament zur Behandlung von Colitis ulcerosa ist. Der Stuhl von Menschen und Mäusen, denen Mesalamin verabreicht wurde, weist signifikant geringere Mengen an Polyphosphaten auf (Dahl et al., 2017). Als möglicher Mechanismus wird vorgeschlagen, dass Mesalamin die PPK hemmt und die reduzierte Menge an Polyphosphaten die Kolonisierung und Persistenz von Bakterien in den entzündeten Bereichen der Colitis ulcerosa verringert (Dahl et al., 2017).

## 10 Zusammenfassung

Polyphosphate sind langkettige, negativ geladene Polymere aus Orthophosphaten und ein wichtiger Bestandteil des bakteriellen Stoffwechsels. Darüber hinaus interferieren bakterielle Polyphosphate während einer Infektion mit dem angeborenen Immunsystem des Wirtes. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung bakterieller Polyphosphate für die Wirt-Pathogen-Interaktion näher zu untersuchen. Durch eine Affinitätsaufreinigung wurde der kürzlich entdeckte protonenaktivierte Chloridionenkanal 1 (PACC1) als Bindungspartner für bakterielle Polyphosphate identifiziert. PACC1 ist ein evolutionär konserviertes Membranprotein, dessen Ionenkanal sich bei niedrigen pH-Werten öffnet und die passive Diffusion von Chloridionen entlang eines elektrochemischen Gradienten ermöglicht. Die niedrige Aktivierungsschwelle unter stark sauren Bedingungen, wie sie z. B. im Lysosom vorliegen, und die erhöhte Expression in Phagozyten deuten auf eine Beteiligung von PACC1 an der Phagozytose und damit verbundenen Immunprozessen hin. Es sollte untersucht werden, welche Rolle PACC1 in der angeborenen Immunantwort spielt und ob Polyphosphate die Aktivität von PACC1 zum Vorteil der Bakterien modulieren können.

Dazu wurden gentechnisch veränderten PACC1<sup>-/-</sup> und C57BL/6J (Wildtyp) Mäusen intraperitoneal inaktivierte *Escherichia coli* Bakterien injiziert, die mit einem pH-sensitiven Farbstoff gekoppelt waren. Dabei zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten und Neutrophile eine geringere Fluoreszenz des pH-sensitiven Farbstoffs, was auf eine gestörte intrazelluläre Ansäuerung hindeutet. In einem Sepsismodell mit lebenden *Escherichia coli* Bakterien zeigten PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse trotz erhöhter Neutrophilenzahl eine höhere Bakterienlast. Bei einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* wiesen PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse einen größeren Lungenschaden auf, mehr infiltrierte Immunzellen und höhere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine. Zudem verloren PACC1<sup>-/-</sup> Mäuse mehr Gewicht und hatten eine geringere Überlebenschance als Wildtyp Mäuse. Außerdem induzierten PACC1<sup>-/-</sup> dendritische Zellen den frühen T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen weniger effektiv. In einer elektrophysiologischen Untersuchung konnte allerdings kein Effekt von Polyphosphaten auf die PACC1 Aktivität festgestellt werden. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass PACC1 an der bakteriellen Elimination und an Entzündungsprozessen beteiligt ist, vermutlich durch eine

Beeinträchtigung der Phagozytose.

Zusätzlich sollte die Bedeutung bakterieller Polyphosphate im Kontext der Wirt-Pathogen-Interaktion auf die Darmimmunität untersucht werden. Bakterien und ihre Stoffwechselprodukte beeinflussen die intestinale Immunantwort und werden mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert. Die Rolle bakterieller Polyphosphate in der Darmimmunität ist bislang nur unzureichend erforscht. Hierzu wurden keimfreie Mäuse mit Wildtyp *Escherichia coli* Bakterien, die Polyphosphate produzieren können, oder mit einer Polyphosphatkinase-defizienten Mutante monokolonisiert. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lamina propria des Kolons von Mäusen mit Polyphosphat-produzierenden Bakterien zeigten in der ATAC-Sequenzierung eine signifikant reduzierte Chromatinzugänglichkeit der Gene *Il10*, *Stat1* und *Stat3*. Diese Gene sind essentiell für die Signaltransduktion von IL-27, einem regulatorischen Zytokin der Darmimmunität, das die Expression des antiinflammatorischen IL-10 in T-Zellen induziert. Darüber hinaus blockierten Polyphosphate die IL-27-induzierte Phosphorylierung von STAT1 in T-Zellen. Makrophagen sind wichtige Produzenten von IL-27 und zeigten nach Stimulation mit langkettigen Polyphosphaten eine verminderte *Stat1* Expression. STAT1 wird durch Typ-I-Interferone aktiviert und induziert seinerseits die Expression von IL-27 in Makrophagen. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass bakterielle Polyphosphate die intestinale Immunantwort modulieren (**Abbildung 31**).

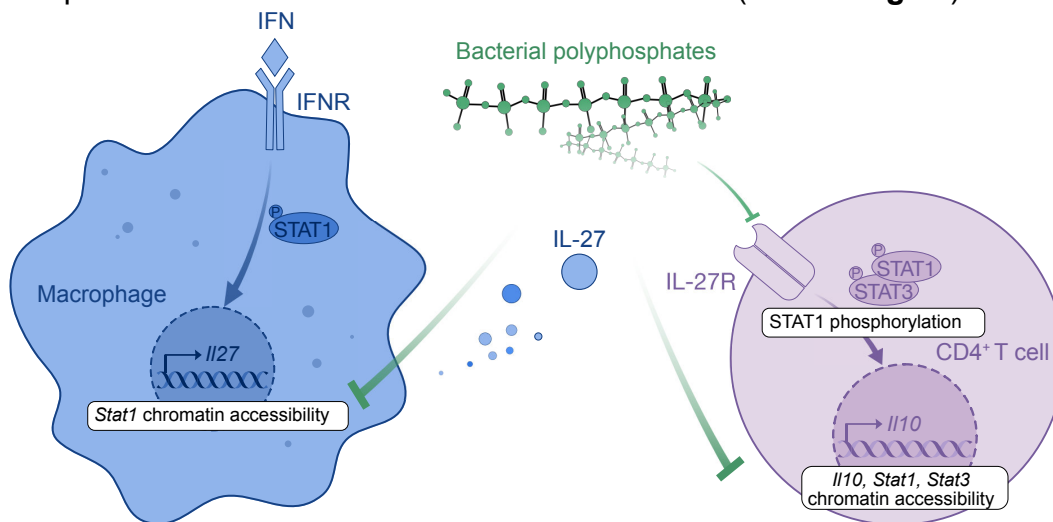


Abbildung 31 | **Bakterielle Polyphosphate modulieren IL-27/STAT1 auf mehreren Ebenen**

IL-27 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das die Darmimmunität beeinflusst. IL-27 wird hauptsächlich in aktivierten Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen gebildet, z. B. nach Stimulation mit Typ-I-Interferonen und Aktivierung von STAT1. Langkettige Polyphosphate, wie sie von Bakterien synthetisiert werden, reduzieren die Genexpression von *Stat1* in Makrophagen signifikant. IL-27 bindet an den IL-27-Rezeptor auf T-Zellen, aktiviert STAT1 und STAT3 und induziert die Expression verschiedener Gene, darunter das entzündungshemmende IL-10. Langkettige Polyphosphate blockieren die IL-27-induzierte STAT1-Phosphorylierung in T-Zellen. Darüber hinaus zeigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lamina propria des Kolons von Mäusen, die mit Polyphosphat-produzierenden Bakterien monokolonisiert wurden, eine signifikant reduzierte Chromatinzugänglichkeit für *Il10*, *Stat1* und *Stat3*.

## 11 Summary

Polyphosphates are long-chain, negatively charged polymers of orthophosphates and are an important component of bacterial metabolism. In addition, bacterial polyphosphates interact with the host innate immune system during infection. The aim of this work was to investigate the role of bacterial polyphosphates in host-pathogen interactions. Through affinity purification, the recently discovered proton-activated chloride channel 1 (PACC1) was identified as a binding partner for bacterial polyphosphates. PACC1 is an evolutionarily conserved membrane protein and ion channel that opens at low pH and allows the passive diffusion of chloride ions along an electrochemical gradient. The low activation threshold under highly acidic conditions, such as in the lysosome, and the increased expression in phagocytes suggest an involvement of PACC1 in phagocytosis and related immune processes. Here, it was investigated what role PACC1 plays in the innate immune response and whether polyphosphates can modulate the activity of PACC1 in favor of bacteria.

To this end, genetically modified PACC1<sup>-/-</sup> and C57BL/6J (wild-type) mice were injected intraperitoneally with inactivated *Escherichia coli* bacteria coupled to a pH-sensitive dye. PACC1<sup>-/-</sup> phagocytes such as macrophages, monocytes and neutrophils showed reduced fluorescence of the pH-sensitive dye, indicating impaired intracellular acidification. In a sepsis model with live *Escherichia coli* bacteria, PACC1<sup>-/-</sup> mice showed a higher bacterial load despite an increased neutrophil count. When infected with *Streptococcus pneumoniae*, PACC1<sup>-/-</sup> mice showed greater lung damage, more infiltrating immune cells and higher concentrations of proinflammatory cytokines. In addition, PACC1<sup>-/-</sup> mice lost more weight and had a lower survival rate than wild-type mice. Furthermore, PACC1<sup>-/-</sup> dendritic cells were less capable to induce the early T cell activation marker CD25 in CD4<sup>+</sup> T cells. However, in an electrophysiological study, no effect of polyphosphates on PACC1 activity was detected. In conclusion, the data suggest that PACC1 is involved in bacterial clearance and inflammatory processes, presumably by interfering with phagocytosis.

In addition, the importance of bacterial polyphosphates in the context of host-pathogen interactions on intestinal immunity was investigated. Bacteria and their metabolites influence the intestinal immune response and are associated with inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis. The role

of bacterial polyphosphates in intestinal immunity has not been sufficiently investigated. To this end, germ-free mice were monocolonized with wild-type *Escherichia coli* bacteria, which can produce polyphosphates, or with a polyphosphatekinase-deficient mutant. CD4<sup>+</sup> T cells from the lamina propria of the colon of mice with polyphosphate-producing bacteria showed significantly reduced chromatin accessibility of the *Ii10*, *Stat1* and *Stat3* genes by ATAC sequencing. These genes are essential for the signal transduction of IL-27, a regulatory cytokine of intestinal immunity, which induces the expression of antiinflammatory IL-10 in T cells. Furthermore, polyphosphates blocked IL-27-induced phosphorylation of STAT1 in T cells. Macrophages, which are major producers of IL-27, showed reduced *Stat1* expression after stimulation with long-chain polyphosphates. STAT1 is activated by type I interferons and induces the expression of IL-27 in macrophages. In conclusion, the data suggest that bacterial polyphosphates modulate the intestinal immune response (**Figure 31**).

## 12 Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

## **13 Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und alle Hilfsmittel – wie etwa Literatur, Apparaturen oder Materialien – angegeben habe. Die Arbeit wurde nicht, auch nicht Teile hiervon, bei einer anderen Fakultät oder in einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, 12. Oktober 2024

Kevin Brück

## 14 Referenzen

- Abbina S, La CC, Vappala S, Kalathottukaren MT, Abbasi U, Gill A, Smith SA, Haynes CA, Morrissey JH, Kizhakkedathu JN (2022) Influence of Steric Shield on Biocompatibility and Antithrombotic Activity of Dendritic Polyphosphate Inhibitor. *Molecular Pharmaceutics* 19: 1853-1865
- Abraham C, Cho JH (2009) Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine* 361: 2066-2078
- Ahn K, Kornberg A (1990) Polyphosphate kinase from Escherichia coli. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 265: 11734-11739
- Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, Hallenborg P, Pedersen A-K, Bekker-Jensen DB, Puglia M, Christensen SDK, Vanselow JT, Nielsen MM, Kratchmarova I, Kelstrup CD, Olsen JV, Blagoev B (2018) UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 631-640
- Aman J, van der Heijden M, van Lingen A, Girbes ARJ, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM, Groeneveld ABJ (2011) Plasma protein levels are markers of pulmonary vascular permeability and degree of lung injury in critically ill patients with or at risk for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome\*. *Critical Care Medicine* 39: 89-97
- Amin A, Weston M, Mindell JA (2016) Role of Counterions in Acidification in Mouse Liver Lysosomes. *Biophysical Journal* 110: 138a
- Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, Darrieux M (2017) Role of Streptococcus pneumoniae Proteins in Evasion of Complement-Mediated Immunity. *Frontiers in Microbiology* 8
- Andrews C, McLean MH, Durum SK (2016) Interleukin-27 as a Novel Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Critical Review of the Literature. *Inflammatory Bowel Diseases* 22: 2255-2264
- Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504: 451-455
- Aryal P, Sansom MSP, Tucker SJ (2015) Hydrophobic Gating in Ion Channels. *Journal of Molecular Biology* 427: 121-130

- Auzanneau C, Thoreau V, Kitzis A, Becq F (2003) A Novel Voltage-dependent Chloride Current Activated by Extracellular Acidic pH in Cultured Rat Sertoli Cells \*. **Journal of Biological Chemistry** 278: 19230-19236
- Awasthi A, Carrier Y, Peron JPS, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL (2007) A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10–producing anti-inflammatory T cells. **Nature Immunology** 8: 1380-1389
- Banoub MG, Gendelman HE (2017) Overview of Mononuclear Phagocytes. In *Neuroimmune Pharmacology*, Ikezu T, Gendelman HE (eds) pp 141-153. Cham: Springer International Publishing
- Barker KA, Etesami NS, Shenoy AT, Arafa EI, Lyon de Ana C, Smith NMS, Martin IMC, Goltry WN, Barron AMS, Browning JL, Kathuria H, Belkina AC, Guillon A, Zhong X, Crossland NA, Jones MR, Quinton LJ, Mizgerd JP (2021) Lung-resident memory B cells protect against bacterial pneumonia. **The Journal of Clinical Investigation** 131
- Beltrao P, Albanèse V, Kenner Lillian R, Swaney Danielle L, Burlingame A, Villén J, Lim Wendell A, Fraser James S, Frydman J, Krogan Nevan J (2012) Systematic Functional Prioritization of Protein Posttranslational Modifications. **Cell** 150: 413-425
- Benakis C, Simats A, Tritschler S, Heindl S, Besson-Girard S, Llovera G, Pinkham K, Kolz A, Ricci A, Theis FJ, Bittner S, Gökce Ö, Peters A, Liesz A (2022) T cells modulate the microglial response to brain ischemia. **eLife** 11: e82031
- Bentley-DeSousa A, Holinier C, Moteshareie H, Tseng Y-C, Kajjo S, Nwosu C, Amodeo GF, Bondy-Chorney E, Sai Y, Rudner A, Golshani A, Davey NE, Downey M (2018) A Screen for Candidate Targets of Lysine Polyphosphorylation Uncovers a Conserved Network Implicated in Ribosome Biogenesis. **Cell Reports** 22: 3427-3439
- Biering SB, Sarnik SA, Wang E, Zengel JR, Leist SR, Schäfer A, Sathyan V, Hawkins P, Okuda K, Tau C, Jangid AR, Duffy CV, Wei J, Gilmore RC, Alfajaro MM, Strine MS, Nguyenla X, Van Dis E, Catamura C, Yamashiro LH *et al.* (2022) Genome-wide bidirectional CRISPR screens identify mucins as host factors modulating SARS-CoV-2 infection. **Nature Genetics**
- Boedtkjer E, Pedersen SF (2020) The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. **Annual Review of Physiology** 82: 103-126
- Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM (2004) Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases** 4: 144-154
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology** 2: 907-916
- Bondy-Chorney E, Abramchuk I, Nasser R, Holinier C, Denoncourt A, Baijal K, McCarthy L,

- Khacho M, Lavallée-Adam M, Downey M (2020) A Broad Response to Intracellular Long-Chain Polyphosphate in Human Cells. ***Cell Reports*** 33
- Bowlin MQ, Gray MJ (2021) Inorganic polyphosphate in host and microbe biology. ***Trends in Microbiology*** 29: 1013-1023
- Braciale TJ, Sun J, Kim TS (2012) Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. ***Nature Reviews Immunology*** 12: 295-305
- Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N, Ting AY (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. ***Nature Biotechnology*** 36: 880-887
- Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loréal O (2018) Haemochromatosis. ***Nature Reviews Disease Primers*** 4: 18016
- Brown GD (2011) Innate Antifungal Immunity: The Key Role of Phagocytes. ***Annual Review of Immunology*** 29: 1-21
- Brown MRW, Kornberg A (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 101: 16085-16087
- Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S (2020) Guidelines for human gene nomenclature. ***Nature Genetics*** 52: 754-758
- Byrne SL, Chasteen ND, Steere AN, Mason AB (2010) The Unique Kinetics of Iron Release from Transferrin: The Role of Receptor, Lobe–Lobe Interactions, and Salt at Endosomal pH. ***Journal of Molecular Biology*** 396: 130-140
- Cai R, Tang J, Chen X-Z (2021) Ion permeation controlled by hydrophobic residues and proton binding in the proton-activated chloride channel. ***iScience*** 24
- Cang C, Bekele B, Ren D (2014) The voltage-gated sodium channel TPC1 confers endolysosomal excitability. ***Nature Chemical Biology*** 10: 463-469
- Capurro V, Gianotti A, Caci E, Ravazzolo R, Galletta LJV, Zegarra-Moran O (2015) Functional analysis of acid-activated Cl<sup>-</sup> channels: Properties and mechanisms of regulation. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*** 1848: 105-114
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJV (2008) TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity. ***Science*** 322: 590-594
- Cassado AdA, D'Império Lima MR, Bortoluci KR (2015) Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. ***Frontiers in Immunology*** 6

- CDC (2022) Global Pneumococcal Disease and Vaccination. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/global.html>
- Chakraborty K, Leung K, Krishnan Y (2017) High luminal chloride in the lysosome is critical for lysosome function. *eLife* 6: e28862
- Chang JT (2020) Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. *New England Journal of Medicine* 383: 2652-2664
- Chen D-L, Cai J-H, Wang CCN (2022) Identification of Key Prognostic Genes of Triple Negative Breast Cancer by LASSO-Based Machine Learning and Bioinformatics Analysis. *Genes* 13: 902
- Chen K, Kolls JK (2013) T Cell–Mediated Host Immune Defenses in the Lung. *Annual Review of Immunology* 31: 605-633
- Cheng D-s, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park G-Y, Sheller JR, Polosukhin VV, Christman JW, Yull FE, Blackwell TS (2007) Airway Epithelium Controls Lung Inflammation and Injury through the NF- $\kappa$ B Pathway. *The Journal of Immunology* 178: 6504-6513
- Cigić B, Pain RH (1999) Location of the binding site for chloride ion activation of cathepsin C. *European Journal of Biochemistry* 264: 944-951
- Consortium TU (2020) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 49: D480-D489
- Cox JH, Kljavin NM, Ramamoorthi N, Diehl L, Batten M, Ghilardi N (2010) IL-27 promotes T cell–dependent colitis through multiple mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* 208: 115-123
- Curtis JL (2005) Cell-mediated Adaptive Immune Defense of the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2: 412-416
- Dahl J-U, Gray MJ, Bazopoulou D, Beaufay F, Lempart J, Koenigsnecht MJ, Wang Y, Baker JR, Hasler WL, Young VB, Sun D, Jakob U (2017) The anti-inflammatory drug mesalamine targets bacterial polyphosphate accumulation. *Nature Microbiology* 2: 16267
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993) Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon- $\gamma$ ; Genes. *Science* 259: 1739-1742
- Deng Z, Zhao Y, Feng J, Zhang J, Zhao H, Rau MJ, Fitzpatrick JAJ, Hu H, Yuan P (2021) Cryo-EM structure of a proton-activated chloride channel TMEM206. *Science*

**Advances** 7: eabe5983

- Deriy LV, Gomez EA, Zhang G, Beacham DW, Hopson JA, Gallan AJ, Shevchenko PD, Bindokas VP, Nelson DJ (2009) Disease-causing Mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Determine the Functional Responses of Alveolar Macrophages\*. **Journal of Biological Chemistry** 284: 35926-35938
- Devuyst O, Thakker RV (2010) Dent's disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases** 5: 28
- Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, Huang P, Tong J, Naren AP, Bindokas V, Palfrey HC, Nelson DJ (2006) CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. **Nature Cell Biology** 8: 933-944
- DiCiccio JE, Steinberg BE (2011) Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. **Journal of General Physiology** 137: 385-390
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB (2014) Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. **The Lancet Respiratory Medicine** 2: 238-246
- Dinarvand P, Hassanian SM, Qureshi SH, Manithody C, Eissenberg JC, Yang L, Rezaie AR (2014) Polyphosphate amplifies proinflammatory responses of nuclear proteins through interaction with receptor for advanced glycation end products and P2Y1 purinergic receptor. **Blood** 123: 935-945
- Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA (2009) IL-27 Blocks RORc Expression to Inhibit Lineage Commitment of Th17 Cells. **The Journal of Immunology** 182: 5748-5756
- Do Js, Visperas A, Sanogo YO, Bechtel JJ, Dvorina N, Kim S, Jang E, Stohlman SA, Shen B, Fairchild RL, Baldwin Iii WM, Vignali DAA, Min B (2016) An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy. **Mucosal Immunology** 9: 137-145
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SNJ (2005) Acidocalcisomes ? conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology** 3: 251-261
- Docampo R, Moreno SNJ (2011) Acidocalcisomes. **Cell Calcium** 50: 113-119
- Dong K, Yao N, Pu Y, He X, Zhao Q, Luan Y, Guan W, Rao S, Ma Y (2014) Genomic Scan Reveals Loci under Altitude Adaptation in Tibetan and Dahe Pigs. **PLOS ONE** 9: e110520
- Drews A, Mohr F, Rizun O, Wagner TFJ, Dembla S, Rudolph S, Lambert S, Konrad M,

- Philipp SE, Behrendt M, Marchais-Oberwinkler S, Covey DF, Oberwinkler J (2014) Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. ***British Journal of Pharmacology*** 171: 1019-1032
- Du F, Wang Y, Ding Z, Laschke Matthias W, Thorlacius H (2019) Microvascular Mechanisms of Polyphosphate-Induced Neutrophil-Endothelial Cell Interactions in vivo. ***European Surgical Research*** 60: 53-62
- Duran C, Thompson CH, Xiao Q, Hartzell HC (2010) Chloride Channels: Often Enigmatic, Rarely Predictable. ***Annual Review of Physiology*** 72: 95-121
- Dutheil S, Watson LS, Davis RE, Snyder GL (2022) Lumateperone normalizes pathological levels of acute inflammation through important pathways known to be involved in mood regulation. ***The Journal of Neuroscience***: JN-RM-0984-22
- Dyke RWV (1993) Acidification of rat liver lysosomes: quantitation and comparison with endosomes. ***American Journal of Physiology-Cell Physiology*** 265: C901-C917
- Effah CY, Drokow EK, Agboyibor C, Ding L, He S, Liu S, Akorli SY, Nuamah E, Sun T, Zhou X, Liu H, Xu Z, Feng F, Wu Y, Zhang X (2021) Neutrophil-Dependent Immunity During Pulmonary Infections and Inflammations. ***Frontiers in Immunology*** 12
- Eltzschig HK, Carmeliet P (2011) Hypoxia and Inflammation. ***New England Journal of Medicine*** 364: 656-665
- Emanuele Michael J, Elia Andrew EH, Xu Q, Thoma Claudio R, Izhar L, Leng Y, Guo A, Chen Y-N, Rush J, Hsu Paul W-C, Yen H-Chi S, Elledge Stephen J (2011) Global Identification of Modular Cullin-RING Ligase Substrates. ***Cell*** 147: 459-474
- Farache J, Koren I, Milo I, Gurevich I, Kim K-W, Zigmond E, Furtado Glaucia C, Lira Sergio A, Shakhar G (2013) Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. ***Immunity*** 38: 581-595
- Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. ***Nature Reviews Microbiology*** 7: 355-366
- Freeman SA, Grinstein S, Orłowski J (2022) Determinants, Maintenance and Function of Organellar pH. ***Physiological Reviews*** 0: null
- Freeman SA, Uderhardt S, Saric A, Collins RF, Buckley CM, Mylvaganam S, Boroumand P, Plumb J, Germain RN, Ren D, Grinstein S (2020) Lipid-gated monovalent ion fluxes regulate endocytic traffic and support immune surveillance. ***Science*** 367: 301-305
- Fu Z-j, Li X-z, Wang Q-r, Shi L, Zhang L-q, Pan X-l (2013) Extracellular acidic pH-activated,

- outward rectifying chloride currents can be regulated by reactive oxygen species in human THP-1 monocytes. ***Biochemical and Biophysical Research Communications*** 432: 701-706
- Fuchs R, Mâle P, Mellman I (1989) Acidification and Ion Permeabilities of Highly Purified Rat Liver Endosomes. ***Journal of Biological Chemistry*** 264: 2212-2220
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM *et al.* (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. ***Nature*** 504: 446-450
- Gautam LK, Sharma P, Capalash N (2021) Attenuation of *Acinetobacter baumannii* virulence by inhibition of polyphosphate kinase 1 with repurposed drugs. ***Microbiological Research*** 242: 126627
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH (2015) Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. ***Clinical Microbiology Reviews*** 28: 871-899
- Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, Takvorian PM, Bleck C, Hsu VW, Fehr AR, Perlman S, Achar SR, Straus MR, Whittaker GR, de Haan CAM, Kehrl J, Altan-Bonnet G, Altan-Bonnet N (2020)  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. ***Cell*** 183: 1520-1535.e14
- Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 107: 2568-2573
- Glickman J, Croen K, Kelly S, Al-Awqati Q (1983) Golgi membranes contain an electrogenic H<sup>+</sup> pump in parallel to a chloride conductance. ***Journal of Cell Biology*** 97: 1303-1308
- Go CD, Knight JDR, Rajasekharan A, Rathod B, Hesketh GG, Abe KT, Youn J-Y, Samavarchi-Tehrani P, Zhang H, Zhu LY, Popiel E, Lambert J-P, Coyaud É, Cheung SWT, Rajendran D, Wong CJ, Antonicka H, Pelletier L, Palazzo AF, Shoubridge EA *et al.* (2021) A proximity-dependent biotinylation map of a human cell. ***Nature*** 595: 120-124
- Grandi FC, Modi H, Kampman L, Corces MR (2022) Chromatin accessibility profiling by ATAC-seq. ***Nature Protocols*** 17: 1518-1552
- Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA (2008) The Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. ***Nature*** 453: 788-792

- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. ***Nature Reviews Immunology*** 14: 571-578
- Haggie PM, Verkman AS (2007) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-independent Phagosomal Acidification in Macrophages \*. ***Journal of Biological Chemistry*** 282: 31422-31428
- Haggie PM, Verkman AS (2009) Unimpaired Lysosomal Acidification in Respiratory Epithelial Cells in Cystic Fibrosis \*. ***Journal of Biological Chemistry*** 284: 7681-7686
- Han S, Mallampalli RK (2015) The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. ***Annals of the American Thoracic Society*** 12: 765-774
- Hanson ML, Hixon JA, Li W, Felber BK, Anver MR, Stewart CA, Janelins BM, Datta SK, Shen W, McLean MH, Durum SK (2014) Oral Delivery of IL-27 Recombinant Bacteria Attenuates Immune Colitis in Mice. ***Gastroenterology*** 146: 210-221.e13
- Hara-Chikuma M, Yang B, Sonawane ND, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS (2005) ClC-3 Chloride Channels Facilitate Endosomal Acidification and Chloride Accumulation\*. ***Journal of Biological Chemistry*** 280: 1241-1247
- Harada K, Shiba T, Doi K, Morita K, Kubo T, Makihara Y, Piattelli A, Akagawa Y (2013) Inorganic Polyphosphate Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in Macrophages. ***PLOS ONE*** 8: e74650
- Hassanian SM, Ardeshiryajimi A, Dinarvand P, Rezaie AR (2016) Inorganic polyphosphate promotes cyclin D1 synthesis through activation of mTOR/Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in endothelial cells. ***Journal of Thrombosis and Haemostasis*** 14: 2261-2273
- Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP (2005) Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. ***The Lancet Infectious Diseases*** 5: 83-93
- Heap RE, Marín-Rubio JL, Peltier J, Heunis T, Dannoura A, Moore A, Trost M (2021) Proteomics characterisation of the L929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation. ***Life Science Alliance*** 4: e202000957
- Holmström KM, Marina N, Baev AY, Wood NW, Gourine AV, Abramov AY (2013) Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain. ***Nature Communications*** 4: 1362
- Honda K, Littman DR (2016) The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. ***Nature*** 535: 75-84

- Honda K, Nakamura K, Matsui N, Takahashi M, Kitamura Y, Mizutani T, Harada N, Nawata H, Hamano S, Yoshida H (2005) T Helper 1-Inducing Property of IL-27/WSX-1 Signaling Is Required for the Induction of Experimental Colitis. ***Inflammatory Bowel Diseases*** 11: 1044-1052
- Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L (2016) Sepsis and septic shock. ***Nature Reviews Disease Primers*** 2: 16045
- Hou Q, Liu F, Chakraborty A, Jia Y, Prasad A, Yu H, Zhao L, Ye K, Snyder SH, Xu Y, Luo HR (2018) Inhibition of IP6K1 suppresses neutrophil-mediated pulmonary damage in bacterial pneumonia. ***Science Translational Medicine*** 10: eaal4045
- Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W (2021) The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. ***Signal Transduction and Targeted Therapy*** 6: 402
- Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW (2017) The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. ***Mucosal Immunology*** 10: 299-306
- Hume DA, Irvine KM, Pridans C (2019) The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. ***Trends in Immunology*** 40: 98-112
- Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, Szpyt J, Gassaway BM, Panov A, Parzen H, Fu S, Golbazi A, Maenpaa E, Stricker K, Guha Thakurta S, Zhang T *et al.* (2021) Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. ***Cell*** 184: 3022-3040.e28
- Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, Colby G, Gebreab F, Gygi MP, Parzen H, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Pontano-Vaites L, Swarup S, White AE, Schweppe DK, Rad R, Erickson BK, Obar RA *et al.* (2017) Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. ***Nature*** 545: 505-509
- Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G, Baltier K, Dong R, Guarani V, Vaites LP, Ordureau A, Rad R, Erickson BK, Wühr M, Chick J, Zhai B, Kolippakkam D *et al.* (2015) The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. ***Cell*** 162: 425-440
- Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, Gray AP, Davis Weaver N, Wool EE, Han C, Gershberg Hayoon A, Aali A, Abate SM, Abbasi-Kangevari M, Abbasi-Kangevari Z, Abd-Elsalam S, Abebe G, Abedi A, Abhari AP, Abidi H, Aboagye RG *et al.* (2022) Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. ***The Lancet*** 400: 2221-2248

- Ishige K, Zhang H, Kornberg A (2002) Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 99: 16684-16688
- Jairath V, Feagan BG (2020) Global burden of inflammatory bowel disease. ***The Lancet Gastroenterology & Hepatology*** 5: 2-3
- Jang MH, Kweon M-N, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, Suzuki T, Nochi T, Yokota Y, Rennert PD, Hiroi T, Tamagawa H, Iijima H, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H (2004) Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 101: 6110-6115
- Jentsch TJ, Pusch M (2018) CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. ***Physiological Reviews*** 98: 1493-1590
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA (2002) Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. ***Physiological Reviews*** 82: 503-568
- Jung J, Zeng H, Horng T (2019) Metabolism as a guiding force for immunity. ***Nature Cell Biology*** 21: 85-93
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. ***Nature Reviews Microbiology*** 6: 288-301
- Kajiya H, Okamoto F, Ohgi K, Nakao A, Fukushima H, Okabe K (2009) Characteristics of ClC7 Cl<sup>-</sup> channels and their inhibition in mutant (G215R) associated with autosomal dominant osteopetrosis type II in native osteoclasts and hClcn7 gene-expressing cells. ***Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*** 458: 1049
- Kashima Y, Sakamoto Y, Kaneko K, Seki M, Suzuki Y, Suzuki A (2020) Single-cell sequencing techniques from individual to multiomics analyses. ***Experimental & Molecular Medicine*** 52: 1419-1427
- Kasper D, Planells-Cases R, Fuhrmann JC, Scheel O, Zeitz O, Ruether K, Schmitt A, Poët M, Steinfeld R, Schweizer M, Kornak U, Jentsch TJ (2005) Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. ***The EMBO Journal*** 24: 1079-1091
- Kaye P, Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. ***Nature Reviews Microbiology*** 9: 604-615
- Kim HJ, Lee PC-W, Hong JH (2022) Chloride Channels and Transporters: Roles beyond Classical Cellular Homeostatic pH or Ion Balance in Cancers. ***Cancers*** 14: 856

- Kirby AC, Coles MC, Kaye PM (2009) Alveolar Macrophages Transport Pathogens to Lung Draining Lymph Nodes. *The Journal of Immunology* 183: 1983-1989
- Kittl M, Helm K, Beyreis M, Mayr C, Gaisberger M, Winklmayr M, Ritter M, Jakab M (2019) Acid- and Volume-Sensitive Chloride Currents in Microglial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 3475
- Kittl M, Winklmayr M, Helm K, Lettner J, Gaisberger M, Ritter M, Jakab M (2020) Acid- and Volume-Sensitive Chloride Currents in Human Chondrocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8
- Knoop KA, McDonald KG, McCrate S, McDole JR, Newberry RD (2015) Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunology* 8: 198-210
- Ko W, Lee E, Kim J-E, Lim H-H, Suh B-C (2024) The plasma membrane inner leaflet PI(4,5)P2 is essential for the activation of proton-activated chloride channels. *Nature Communications* 15: 7008
- Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ (2001) Loss of the ClC-7 Chloride Channel Leads to Osteopetrosis in Mice and Man. *Cell* 104: 205-215
- Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D (1999) Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. *Annual Review of Biochemistry* 68: 89-125
- Krenzlin V, Schöche J, Walachowski S, Reinhardt C, Radsak MP, Bosmann M (2023) Immunomodulation of neutrophil granulocyte functions by bacterial polyphosphates. *European Journal of Immunology* 53: 2250339
- Krone CL, van de Groep K, Trzciński K, Sanders EAM, Bogaert D (2014) Immunosenescence and pneumococcal disease: an imbalance in host-pathogen interactions. *The Lancet Respiratory Medicine* 2: 141-153
- Kulaev I, Kulakovskaya T (2000) Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Review of Microbiology* 54: 709-734
- Kumble KD, Kornberg A (1995) Inorganic Polyphosphate in Mammalian Cells and Tissues (Review). *Journal of Biological Chemistry* 270: 5818-5822
- Kurosaki T, Popp MW, Maquat LE (2019) Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20: 406-420
- La CC, Smith SA, Vappala S, Adili R, Luke CE, Abbina S, Luo HD, Chafeeva I, Drayton M,

- Creagh LA, de Guadalupe Jaraquemada-Peláez M, Rhoads N, Kalathottukaren MT, Henke PK, Straus SK, Du C, Conway EM, Holinstat M, Haynes CA, Morrissey JH *et al.* (2023) Smart thrombosis inhibitors without bleeding side effects via charge tunable ligand design. ***Nature Communications*** 14: 2177
- Labberton L, Kenne E, Long AT, Nickel KF, Di Gennaro A, Rigg RA, Hernandez JS, Butler L, Maas C, Stavrou EX, Renné T (2016) Neutralizing blood-borne polyphosphate in vivo provides safe thromboprotection. ***Nature Communications*** 7: 12616
- Lambert S, Oberwinkler J (2005) Characterization of a proton-activated, outwardly rectifying anion channel. ***The Journal of Physiology*** 567: 191-213
- Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. ***Nature Reviews Immunology*** 4: 181-189
- Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbelt JO, Huber W, Steinmetz LM (2013) The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. ***G3 Genes|Genomes|Genetics*** 3: 1213-1224
- Lange PF, Wartosch L, Jentsch TJ, Fuhrmann JC (2006) CIC-7 requires Ostm1 as a  $\beta$ -subunit to support bone resorption and lysosomal function. ***Nature*** 440: 220-223
- Lardner A (2001) The effects of extracellular pH on immune function. ***Journal of Leukocyte Biology*** 69: 522-530
- Li F, Yang M, Wang L, Williamson I, Tian F, Qin M, Shah PK, Sharifi BG (2012) Autofluorescence contributes to false-positive intracellular Foxp3 staining in macrophages: A lesson learned from flow cytometry. ***Journal of Immunological Methods*** 386: 101-107
- Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. ***Nature Communications*** 5: 4767
- Liu GY, Sabatini DM (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. ***Nature Reviews Molecular Cell Biology*** 21: 183-203
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. ***Methods*** 25: 402-408
- Lloyd SE, Pearce SHS, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SPA, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker

- RV (1996) A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. **Nature** 379: 445-449
- Ma Z-y, Zhang W, Chen L, Wang R, Kan X-h, Sun G-z, Liu C-x, Li L, Zhang Y (2008) A proton-activated, outwardly rectifying chloride channel in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 371: 437-440
- Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A (2013) Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology** 6: 666-677
- Mailer RKW, Hänel L, Allende M, Renné T (2019) Polyphosphate as a Target for Interference With Inflammation and Thrombosis. **Frontiers in Medicine** 6
- Manca B, Buffi G, Magri G, Del Vecchio M, Taddei AR, Pezzicoli A, Giuliani M (2023) Functional characterization of the gonococcal polyphosphate pseudo-capsule. **PLOS Pathogens** 19: e1011400
- Manosalva C, Quiroga J, Hidalgo AI, Alarcón P, Anseoleaga N, Hidalgo MA, Burgos RA (2022) Role of Lactate in Inflammatory Processes: Friend or Foe. **Frontiers in Immunology** 12
- Maritzen T, Keating DJ, Neagoe I, Zdebik AA, Jentsch TJ (2008) Role of the Vesicular Chloride Transporter CIC-3 in Neuroendocrine Tissue. **The Journal of Neuroscience** 28: 10587-10598
- McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ (2012) Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. **Nature** 483: 345-349
- McLean MH, Andrews C, Hanson ML, Baseler WA, Anver MR, Senkevitch E, Staniszewska AK, Smith C, Davies LC, Hixon J, Li W, Shen W, Steidler L, Durum SK (2017) Interleukin-27 Is a Potential Rescue Therapy for Acute Severe Colitis Through Interleukin-10–Dependent, T-Cell–Independent Attenuation of Colonic Mucosal Innate Immune Responses. **Inflammatory Bowel Diseases** 23: 1983-1995
- Menegazzi R, Busetto S, Dri P, Cramer R, Patriarca P (1996) Chloride ion efflux regulates adherence, spreading, and respiratory burst of neutrophils stimulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF) on biologic surfaces. **Journal of Cell Biology** 135: 511-522
- Middleton EA, Weyrich AS, Zimmerman GA (2016) Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. **Physiological Reviews** 96: 1211-1259

- Mihaljević L, Ruan Z, Osei-Owusu J, Lü W, Qiu Z (2023) Inhibition of the proton-activated chloride channel PAC by PIP2. *eLife* 12: e83935
- Mindell JA (2012) Lysosomal Acidification Mechanisms. *Annual Review of Physiology* 74: 69-86
- Moran AE, Holzapfel KL, Xing Y, Cunningham NR, Maltzman JS, Punt J, Hogquist KA (2011) T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *Journal of Experimental Medicine* 208: 1279-1289
- Moreland JG, Davis AP, Bailey G, Nauseef WM, Lamb FS (2006) Anion Channels, Including CIC-3, Are Required for Normal Neutrophil Oxidative Function, Phagocytosis, and Transendothelial Migration\*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 12277-12288
- Moreno SNJ, Docampo R (2013) Polyphosphate and Its Diverse Functions in Host Cells and Pathogens. *PLOS Pathogens* 9: e1003230
- Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, Ruiz FA, Docampo R (2012) Polyphosphate Is a Novel Pro-inflammatory Regulator of Mast Cells and Is Located in Acidocalcisomes\*. *Journal of Biological Chemistry* 287: 28435-28444
- Mücksch F, Citir M, Lüchtenborg C, Glass B, Traynor-Kaplan A, Schultz C, Brügger B, Kräusslich H-G (2019) Quantification of phosphoinositides reveals strong enrichment of PIP2 in HIV-1 compared to producer cell membranes. *Scientific Reports* 9: 17661
- Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renné T (2009) Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo. *Cell* 139: 1143-1156
- Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL (2009) IL-27 Is a Key Regulator of IL-10 and IL-17 Production by Human CD4+ T Cells<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* 183: 2435-2443
- Musher DM (2003) How Contagious Are Common Respiratory Tract Infections? *New England Journal of Medicine* 348: 1256-1266
- Mutch NJ, Engel R, Uitte de Willige S, Philippou H, Ariëns RAS (2010) Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood* 115: 3980-3988
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* 11: 823-836
- Neurath MF (2008) IL-12 family members in experimental colitis. *Mucosal Immunology* 1:

S28-S30

- Neville N, Roberge N, Ji X, Stephen P, Lu JL, Jia Z (2021) A Dual-Specificity Inhibitor Targets Polyphosphate Kinase 1 and 2 Enzymes To Attenuate Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 12: e00592-21
- Neville N, Roberge N, Jia Z (2022) Polyphosphate Kinase 2 (PPK2) Enzymes: Structure, Function, and Roles in Bacterial Physiology and Virulence. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 670
- Nobles M, Higgins CF, Sardini A (2004) Extracellular acidification elicits a chloride current that shares characteristics with ICl(swell). *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287: C1426-C1435
- Nocek B, Kochinyan S, Proudfoot M, Brown G, Evdokimova E, Osipiuk J, Edwards AM, Savchenko A, Joachimiak A, Yakunin AF (2008) Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 17730-17735
- Noegel A, Gotschlich EC (1983) Isolation of a high molecular weight polyphosphate from *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Experimental Medicine* 157: 2049-2060
- Norbury CC (2006) Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117: 443-451
- Nordenfelt P, Tapper H (2011) Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 90: 271-284
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ (2010) Endosomal Chloride-Proton Exchange Rather Than Chloride Conductance Is Crucial for Renal Endocytosis. *Science* 328: 1398-1401
- Numminen E, Chewapreecha C, Turner C, Goldblatt D, Nosten F, Bentley SD, Turner P, Corander J (2015) Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Scientific Reports* 5: 11344
- O'Brien KL, Millar EV, Zell ER, Bronsdon M, Weatherholtz R, Reid R, Becenti J, Kvamme S, Whitney CG, Santosham M (2007) Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Nasopharyngeal Colonization among Immunized and Unimmunized Children in a Community-Randomized Trial. *The Journal of Infectious Diseases* 196: 1211-1220
- O'Shea John J, Plenge R (2012) JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. *Immunity* 36: 542-550
- Ogawa N, Tzeng C-M, Fraley CD, Kornberg A (2000) Inorganic Polyphosphate in *Vibrio cholerae*: Genetic, Biochemical, and Physiologic Features. *Journal of*

***Bacteriology*** 182: 6687-6693

Okabe Y, Medzhitov R (2014) Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. ***Cell*** 157: 832-844

Okada Y, Sato-Numata K, Sabirov RZ, Numata T (2021) Cell Death Induction and Protection by Activation of Ubiquitously Expressed Anion/Cation Channels. Part 2: Functional and Molecular Properties of ASOR/PAC Channels and Their Roles in Cell Volume Dysregulation and Acidotoxic Cell Death. ***Frontiers in Cell and Developmental Biology*** 9

Ordureau A, Paulo JA, Zhang J, An H, Swatek KN, Cannon JR, Wan Q, Komander D, Harper JW (2020) Global Landscape and Dynamics of Parkin and USP30-Dependent Ubiquitylomes in iNeurons during Mitophagic Signaling. ***Molecular Cell*** 77: 1124-1142.e10

Osei-Owusu J, Kots E, Ruan Z, Mihaljević L, Chen KH, Tamhaney A, Ye X, Lü W, Weinstein H, Qiu Z (2022) Molecular determinants of pH sensing in the proton-activated chloride channel. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 119: e2200727119

Osei-Owusu J, Yang J, Del Carmen Vitery M, Tian M, Qiu Z (2020) PAC proton-activated chloride channel contributes to acid-induced cell death in primary rat cortical neurons. ***Channels*** 14: 53-58

Osei-Owusu J, Yang J, Leung KH, Ruan Z, Lü W, Krishnan Y, Qiu Z (2021) Proton-activated chloride channel PAC regulates endosomal acidification and transferrin receptor-mediated endocytosis. ***Cell Reports*** 34: 108683

Panda SK, Colonna M (2019) Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. ***Frontiers in Immunology*** 10

Papic N, Maxwell CI, Delker DA, Liu S, Heale BSE, Hagedorn CH (2012) RNA-Sequencing Analysis of 5' Capped RNAs Identifies Many New Differentially Expressed Genes in Acute Hepatitis C Virus Infection. ***Viruses*** 4: 581-612

Pasquinelli AE (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. ***Nature Reviews Genetics*** 13: 271-282

Peng L, Zeng L, Jin H, Yang L, Xiao Y, Lan Z, Yu Z, Ouyang S, Zhang L, Sun N (2020) Discovery and antibacterial study of potential PPK1 inhibitors against uropathogenic *E. coli*. ***Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*** 35: 1224-1232

Pichichero ME (2017) Pneumococcal whole-cell and protein-based vaccines: changing the paradigm. ***Expert Review of Vaccines*** 16: 1181-1190

- Pirttiniemi A, Adeshara K, Happonen N, Einarsdottir E, Katayama S, Salmenkari H, Hörkkö S, Kere J, Groop P-H, Lehto M (2023) Long-chain polyphosphates inhibit type I interferon signaling and augment LPS-induced cytokine secretion in human leukocytes. ***Journal of Leukocyte Biology***
- Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ (2000) CIC-5 Cl<sup>-</sup>-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. ***Nature*** 408: 369-373
- Planells-Cases R, Jentsch TJ (2009) Chloride channelopathies. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*** 1792: 173-189
- Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tiffet CJ (2018) Lysosomal storage diseases. ***Nature Reviews Disease Primers*** 4: 27
- Poët M, Kornak U, Schweizer M, Zdebik AA, Scheel O, Hoelter S, Wurst W, Schmitt A, Fuhrmann JC, Planells-Cases R, Mole SE, Hübner CA, Jentsch TJ (2006) Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 103: 13854-13859
- Pollard AJ, Bijker EM (2021) A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. ***Nature Reviews Immunology*** 21: 83-100
- Pollizzi KN, Powell JD (2014) Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. ***Nature Reviews Immunology*** 14: 435
- Pulendran B, S. Arunachalam P, O'Hagan DT (2021) Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. ***Nature Reviews Drug Discovery*** 20: 454-475
- Qiu Z, Dubin Adrienne E, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia Loren J, Reinhardt J, Orth Anthony P, Patapoutian A (2014) SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel. ***Cell*** 157: 447-458
- Quinton LJ, Mizgerd JP (2015) Dynamics of Lung Defense in Pneumonia: Resistance, Resilience, and Remodeling. ***Annual Review of Physiology*** 77: 407-430
- Rashid MH, Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 97: 4885-4890
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, Kornberg A (2000) Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 97: 9636-9641
- Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A (2015) Cystic fibrosis. ***Nature***

**Reviews Disease Primers** 1: 15010

- Rijal R, Cadena LA, Smith MR, Carr JF, Gomer RH (2020) Polyphosphate is an extracellular signal that can facilitate bacterial survival in eukaryotic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 117: 31923-31934
- Roberge N, Neville N, Douchant K, Noordhof C, Boev N, Sjaarda C, Sheth PM, Jia Z (2021) Broad-Spectrum Inhibitor of Bacterial Polyphosphate Homeostasis Attenuates Virulence Factors and Helps Reveal Novel Physiology of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology** 12
- Roewe J, Stavrides G, Strueve M, Sharma A, Marini F, Mann A, Smith SA, Kaya Z, Strobl B, Mueller M, Reinhardt C, Morrissey JH, Bosmann M (2020) Bacterial polyphosphates interfere with the innate host defense to infection. **Nature Communications** 11: 4035
- Roewe J, Walachowski S, Sharma A, Berthiaume KA, Reinhardt C, Bosmann M (2022) Bacterial polyphosphates induce CXCL4 and synergize with complement anaphylatoxin C5a in lung injury. **Frontiers in Immunology** 13
- Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM *et al.* (2014) Muc5b is required for airway defence. **Nature** 505: 412-416
- Ruan Z, Osei-Owusu J, Du J, Qiu Z, Lü W (2020) Structures and pH-sensing mechanism of the proton-activated chloride channel. **Nature** 588: 350-354
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R *et al.* (2020) Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet** 395: 200-211
- Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R (2004) Human Platelet Dense Granules Contain Polyphosphate and Are Similar to Acidocalcisomes of Bacteria and Unicellular Eukaryotes \*. **Journal of Biological Chemistry** 279: 44250-44257
- Rungta Ravi L, Choi Hyun B, Tyson John R, Malik A, Dissing-Olesen L, Lin Paulo JC, Cain Stuart M, Cullis Pieter R, Snutch Terrance P, MacVicar Brian A (2015) The Cellular Mechanisms of Neuronal Swelling Underlying Cytotoxic Edema. **Cell** 161: 610-621
- Rupaimoole R, Slack FJ (2017) MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery** 16: 203-222

- Saito M, Hanson PI, Schlesinger P (2007) Luminal Chloride-dependent Activation of Endosome Calcium Channels: PATCH CLAMP STUDY OF ENLARGED ENDOSOMES\*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 27327-27333
- Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* 141: 290-303
- Sasaoka T, Ito M, Yamashita J, Nakajima K, Tanaka I, Narita M, Hara Y, Hada K, Takahashi M, Ohno Y, Matsuo T, Kaneshiro Y, Tanaka H, Kaneko K (2011) Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300: G568-G576
- Sato-Numata K, Numata T, Inoue R, Okada Y (2016) Distinct pharmacological and molecular properties of the acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channel from those of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 468: 795-803
- Sato-Numata K, Numata T, Okada T, Okada Y (2013) Acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in human epithelial cells are highly sensitive to temperature and independent of ClC-3. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465: 1535-1543
- Sato-Numata K, Numata T, Okada Y (2014) Temperature sensitivity of acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis. *Channels* 8: 278-283
- Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y (2011) Probiotic-Derived Polyphosphate Enhances the Epithelial Barrier Function and Maintains Intestinal Homeostasis through Integrin-p38 MAPK Pathway. *PLOS ONE* 6: e23278
- Seufferheld M, Vieira MCF, Ruiz FA, Rodrigues CO, Moreno SNJ, Docampo R (2003) Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes \*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 29971-29978
- Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews* 79: S23-S45
- Shi C-y, Wang R, Liu C-x, Jiang H, Ma Z-y, Li L, Zhang W (2009) Simvastatin inhibits acidic extracellular pH-activated, outward rectifying chloride currents in RAW264.7 monocytic-macrophage and human peripheral monocytes. *International Immunopharmacology* 9: 247-252

- Shoar S, Musher DM (2020) Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review. *Pneumonia* 12: 11
- Shrum B, Anantha RV, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SMM, McCormick JK, Mele T (2014) A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes* 7: 233
- Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21: 363-383
- Silva MT (2010) When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology* 87: 93-106
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801-810
- Sinha M, Zabini D, Guntur D, Nagaraj C, Enyedi P, Olschewski H, Kuebler WM, Olschewski A (2022) Chloride channels in the lung: Challenges and perspectives for viral infections, pulmonary arterial hypertension, and cystic fibrosis. *Pharmacology & Therapeutics* 237: 108249
- Smith NM, Wasserman GA, Coleman FT, Hilliard KL, Yamamoto K, Lipsitz E, Malley R, Doms H, Jones MR, Quinton LJ, Mizgerd JP (2018) Regionally compartmentalized resident memory T cells mediate naturally acquired protection against pneumococcal pneumonia. *Mucosal Immunology* 11: 220-235
- Smith SA, Choi SH, Collins JNR, Travers RJ, Cooley BC, Morrissey JH (2012) Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation. *Blood* 120: 5103-5110
- Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Rienstra CM, Morrissey JH (2010) Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood* 116: 4353-4359
- Smith SA, Morrissey JH (2008) Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood* 112: 2810-2816
- Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 903-908

- Sobue A, Komine O, Hara Y, Endo F, Mizoguchi H, Watanabe S, Murayama S, Saito T, Saido TC, Sahara N, Higuchi M, Ogi T, Yamanaka K (2021) Microglial gene signature reveals loss of homeostatic microglia associated with neurodegeneration of Alzheimer's disease. ***Acta Neuropathologica Communications*** 9: 1
- Sonawane ND, Thiagarajah JR, Verkman AS (2002) Chloride Concentration in Endosomes Measured Using a Ratioable Fluorescent Cl<sup>+</sup> Indicator: EVIDENCE FOR CHLORIDE ACCUMULATION DURING ACIDIFICATION \*. ***Journal of Biological Chemistry*** 277: 5506-5513
- Sonawane ND, Verkman AS (2003) Determinants of [Cl<sup>-</sup>] in recycling and late endosomes and Golgi complex measured using fluorescent ligands. ***Journal of Cell Biology*** 160: 1129-1138
- Song L, Feng D, Tan J, Zhang H (2022) Effects of TMEM206 on the malignant behavior of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. ***European Journal of Inflammation*** 20: 1721727X221122724
- Stark C, Breitkreutz B-J, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M (2006) BioGRID: a general repository for interaction datasets. ***Nucleic Acids Research*** 34: D535-D539
- Stauber T, Jentsch TJ (2013) Chloride in Vesicular Trafficking and Function. ***Annual Review of Physiology*** 75: 453-477
- Steinberg BE, Huynh KK, Brodovitch A, Jabs S, Stauber T, Jentsch TJ, Grinstein S (2010) A cation counterflux supports lysosomal acidification. ***Journal of Cell Biology*** 189: 1171-1186
- Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bösl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, Jentsch TJ (2001) Disruption of ClC-3, a Chloride Channel Expressed on Synaptic Vesicles, Leads to a Loss of the Hippocampus. ***Neuron*** 29: 185-196
- Strüve M (2019) Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Polyphosphat-bindenden Proteinen bei der Immunantwort.
- Stukalov A, Girault V, Grass V, Karayel O, Bergant V, Urban C, Haas DA, Huang Y, Oubraham L, Wang A, Hamad MS, Piras A, Hansen FM, Tanzer MC, Paron I, Zinzula L, Engleitner T, Reinecke M, Lavacca TM, Ehmann R *et al.* (2021) Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. ***Nature*** 594: 246-252
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJM, O'Shea JJ, Hunter CA (2007) Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. ***Nature Immunology*** 8: 1363-1371

- Suess PM, Chinea LE, Pilling D, Gomer RH (2019) Extracellular Polyphosphate Promotes Macrophage and Fibrocyte Differentiation, Inhibits Leukocyte Proliferation, and Acts as a Chemotactic Agent for Neutrophils. **The Journal of Immunology** 203: 493-499
- Suess PM, Watson J, Chen W, Gomer RH (2017) Extracellular polyphosphate signals through Ras and Akt to prime Dictyostelium discoideum cells for development. **Journal of Cell Science** 130: 2394-2404
- Teichgräber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmüller J, Wilker B, De Oliveira–Munding CC, van Heeckeren AM, Barr ML, von Kürthy G, Schmid KW, Weller M, Tümmler B, Lang F, Grassme H, Döring G, Gulbins E (2008) Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. **Nature Medicine** 14: 382-391
- Thompson AAR, Dickinson RS, Murphy F, Thomson JP, Marriott HM, Tavares A, Willson J, Williams L, Lewis A, Mirchandani A, Dos Santos Coelho P, Doherty C, Ryan E, Watts E, Morton NM, Forbes S, Stimson RH, Hameed AG, Arnold N, Preston JA *et al.* (2017) Hypoxia determines survival outcomes of bacterial infection through HIF-1 $\alpha$ -dependent reprogramming of leukocyte metabolism. **Science Immunology** 2: eaal2861
- Tinsley CR, Manjula BN, Gotschlich EC (1993) Purification and characterization of polyphosphate kinase from Neisseria meningitidis. **Infection and Immunity** 61: 3703-3710
- Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, van der Poll T (2021) Pneumonia. **Nature Reviews Disease Primers** 7: 25
- Toubal A, Nel I, Lotersztajn S, Lehuen A (2019) Mucosal-associated invariant T cells and disease. **Nature Reviews Immunology** 19: 643-657
- Travers RJ, Shenoi RA, Kalathottukaren MT, Kizhakkedathu JN, Morrissey JH (2014) Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. **Blood** 124: 3183-3190
- Troy AE, Zaph C, Du Y, Taylor BC, Guild KJ, Hunter CA, Saris CJM, Artis D (2009) IL-27 Regulates Homeostasis of the Intestinal CD4<sup>+</sup> Effector T Cell Pool and Limits Intestinal Inflammation in a Murine Model of Colitis. **The Journal of Immunology** 183: 2037-2044
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T *et al.* (2015) Tissue-based map of the human proteome. **Science** 347: 1260419

- Ullrich F, Blin S, Lazarow K, Daubitz T, von Kries JP, Jentsch TJ (2019) Identification of TMEM206 proteins as pore of PAORAC/ASOR acid-sensitive chloride channels. **eLife** 8: e49187
- Valinsky WC, Touyz RM, Shrier A (2017) Characterization of constitutive and acid-induced outwardly rectifying chloride currents in immortalized mouse distal tubular cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** 1861: 2007-2019
- Vanderbilt JN, Mager EM, Allen L, Sawa T, Wiener-Kronish J, Gonzalez R, Dobbs LG (2003) CXC Chemokines and Their Receptors Are Expressed in Type II Cells and Upregulated following Lung Injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 29: 661-668
- Varon E, Cohen R (2019) Novel insights into pneumococcal lineages in the vaccine era. **The Lancet Infectious Diseases** 19: 679-681
- Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. **Nature** 433: 876-880
- Voss FK, Ullrich F, Münch J, Lazarow K, Lutter D, Mah N, Andrade-Navarro MA, Kries JPV, Stauber T, Jentsch TJ (2014) Identification of LRRC8 Heteromers as an Essential Component of the Volume-Regulated Anion Channel VRAC. **Science** 344: 634-638
- Waffarn EE, Hastey CJ, Dixit N, Soo Choi Y, Cherry S, Kalinke U, Simon SI, Baumgarth N (2015) Infection-induced type I interferons activate CD11b on B-1 cells for subsequent lymph node accumulation. **Nature Communications** 6: 8991
- Wallis RS, O'Garra A, Sher A, Wack A (2023) Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future. **Nature Reviews Immunology** 23: 121-133
- Wang C, Polovitskaya MM, Delgado BD, Jentsch TJ, Long SB (2022a) Gating choreography and mechanism of the human proton-activated chloride channel ASOR. **Science Advances** 8: eabm3942
- Wang H, Meng R, Li Z, Yang B, Liu Y, Huang F, Zhang J, Chen H, Wu C (2011a) IL-27 induces the differentiation of Tr1-like cells from human naive CD4+ T cells via the phosphorylation of STAT1 and STAT3. **Immunology Letters** 136: 21-28
- Wang H-Y, Shimizu T, Numata T, Okada Y (2007) Role of acid-sensitive outwardly rectifying anion channels in acidosis-induced cell death in human epithelial cells. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology** 454: 223-233
- Wang L, Cao J, Li C, Zhang L (2017) IL-27/IL-27 Receptor Signaling Provides Protection in Clostridium difficile-Induced Colitis. **The Journal of Infectious Diseases** 217: 198-207

- Wang L, Fraley CD, Faridi J, Kornberg A, Roth RA (2003) Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11249-11254
- Wang L, Yan J, Wise MJ, Liu Q, Asenso J, Huang Y, Dai S, Liu Z, Du Y, Tang D (2018) Distribution Patterns of Polyphosphate Metabolism Pathway and Its Relationships With Bacterial Durability and Virulence. *Frontiers in Microbiology* 9
- Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, Wang X-T, Wang H, Wang Y, Thakker RV, Guggino S, Guggino WB (2000) Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Human Molecular Genetics* 9: 2937-2945
- Wang W-B, Levy DE, Lee C-K (2011b) STAT3 Negatively Regulates Type I IFN-Mediated Antiviral Response. *The Journal of Immunology* 187: 2578-2585
- Wang Y, Gao X, Ru X, Sun P, Wang J (2022b) Identification of gene signatures for COAD using feature selection and Bayesian network approaches. *Scientific Reports* 12: 8761
- Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M (2015) Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nature Reviews Immunology* 15: 599-614
- Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J, Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ (2010) Lysosomal Pathology and Osteopetrosis upon Loss of H<sup>+</sup>-Driven Lysosomal Cl<sup>-</sup> Accumulation. *Science* 328: 1401-1403
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC (2018) Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology* 16: 355-367
- Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ (2013) Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14: 461-471
- Werth N, Beerlage C, Rosenberger C, Yazdi AS, Edelmann M, Amr A, Bernhardt W, von Eiff C, Becker K, Schäfer A, Peschel A, Kempf VAJ (2010) Activation of Hypoxia Inducible Factor 1 Is a General Phenomenon in Infections with Human Pathogens. *PLOS ONE* 5: e11576
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgensen JH, Schuchat A (2003) Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein–Polysaccharide Conjugate Vaccine. *New England Journal of Medicine* 348: 1737-1746
- Whitsett JA, Alenghat T (2015) Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate

immunity. *Nature Immunology* 16: 27-35

WHO (2017) Antibiotic-resistant "priority pathogens" – a catalogue of 12 families of bacteria that pose the greatest threat to human health. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

WHO (2018) The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

WHO (2019a) Position papers on Pneumococcus. <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/policies/position-papers/pneumococcus>

WHO (2019b) Ten threats to global health in 2019. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019>

WHO (2021) Pneumonia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>

Wilson R, Cohen JM, Reglinski M, Jose RJ, Chan WY, Marshall H, de Vogel C, Gordon S, Goldblatt D, Petersen FC, Baxendale H, Brown JS (2017) Naturally Acquired Human Immunity to Pneumococcus Is Dependent on Antibody to Protein Antigens. *PLOS Pathogens* 13: e1006137

Xie L, Jakob U (2019) Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic protein scaffold. *Journal of Biological Chemistry* 294: 2180-2190

Xiong H, Keith James W, Samilo Dane W, Carter Rebecca A, Leiner Ingrid M, Pamer Eric G (2016) Innate Lymphocyte/Ly6Chi Monocyte Crosstalk Promotes Klebsiella Pneumoniae Clearance. *Cell* 165: 679-689

Xiong Z-G, Zhu X-M, Chu X-P, Minami M, Hey J, Wei W-L, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP (2004) Neuroprotection in Ischemia: Blocking Calcium-Permeable Acid-Sensing Ion Channels. *Cell* 118: 687-698

Xu X-Y, Zhang F-F, Gan J, Shen Z-S, Guo Q, Teng Y, Ji J-W, Cao J-L, Tang Q-Y, Zhang Z (2022) Identification of the Acid-Sensitive Site Critical for Chloral Hydrate (CH) Activation of the Proton-Activated Chloride Channel. *The Journal of Neuroscience*: JN-RM-0482-22

Yamamoto H, Zhang S, Mizushima N (2023) Autophagy genes in biology and disease. *Nature Reviews Genetics*

Yamamoto S, Ehara T (2006) Acidic extracellular pH-activated outwardly rectifying chloride current in mammalian cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290: H1905-H1914

- Yang J, Chen J, del Carmen Vitery M, Osei-Owusu J, Chu J, Yu H, Sun S, Qiu Z (2019) PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. **Science** 364: 395-399
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim W-S, Park SP, Lee J, Lee B, Kim B-M, Raouf R, Shin YK, Oh U (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. **Nature** 455: 1210-1215
- Yenari MA, Han HS (2012) Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. **Nature Reviews Neuroscience** 13: 267-278
- Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, Jin X, Cuo ZXP, Pool JE, Xu X, Jiang H, Vinckenbosch N, Korneliussen TS, Zheng H, Liu T, He W, Li K, Luo R, Nie X, Wu H, Zhao M, Cao H, Zou J *et al.* (2010) Sequencing of 50 Human Exomes Reveals Adaptation to High Altitude. **Science** 329: 75-78
- Yoshida H, Hunter CA (2015) The Immunobiology of Interleukin-27. **Annual Review of Immunology** 33: 417-443
- Yoshikawa M, Uchida S, Ezaki J, Rai T, Hayama A, Kobayashi K, Kida Y, Noda M, Koike M, Uchiyama Y, Marumo F, Kominami E, Sasaki S (2002) CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. **Genes to Cells** 7: 597-605
- Zeziulia M, Blin S, Schmitt FW, Lehmann M, Jentsch TJ (2022) Proton-gated anion transport governs macropinosome shrinkage. **Nature Cell Biology**
- Zhang H, Ishige K, Kornberg A (2002) A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99: 16678-16683
- Zhang L, Liu S-Y, Yang X, Wang Y-Q, Cheng Y-X, Zhang L, Liu S-Y, Yang X, Wang Y-Q, Cheng Y-X (2020a) TMEM206 is a potential prognostic marker of hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett** 20: 174
- Zhang L, Liu S-Y, Yang X, Wang Y-Q, Cheng Y-X, Zhang L, Liu S-Y, Yang X, Wang Y-Q, Cheng Y-X (2020b) TMEM206 is a potential prognostic marker of hepatocellular carcinoma. **Oncology Letter** 20: 174
- Zhao M, Ma J, Li M, Zhu W, Zhou W, Shen L, Wu H, Zhang N, Wu S, Fu C, Li X, Yang K, Tang T, Shen R, He L, Huai C, Qin S (2022) Different responses to risperidone treatment in Schizophrenia: a multicenter genome-wide association and whole exome sequencing joint study. **Translational Psychiatry** 12: 173
- Zhu S, Travers RJ, Morrissey JH, Diamond SL (2015) FXIa and platelet polyphosphate as therapeutic targets during human blood clotting on collagen/tissue factor surfaces

under flow. **Blood** 126: 1494-1502

Zhu X, Liu Z, Liu J-Q, Zhu J, Zhang J, Davis JP, Chu J, Yu J, Zhou J, Li M-S, Bai X-F (2016) Systemic delivery of IL-27 by an adeno-associated viral vector inhibits T cell-mediated colitis and induces multiple inhibitory pathways in T cells. **Journal of Leukocyte Biology** 100: 403-411



