

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Influenza A-Viren auf die Inflammasom-abhängige  
Zytokinproduktion in der nachfolgenden Pneumokokkeninfektion**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Phillip Brenya Sasu**  
geboren in Lemgo

Datum der Promotion: 4. September 2015

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	2
Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	7
Abkürzungen .....	8
1 Einleitung .....	13
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	13
1.1.1 Biologie .....	13
1.1.2 Epidemiologie .....	15
1.1.3 Prophylaxe und Therapie .....	16
1.2 Influenza A Virus .....	17
1.2.1 Biologie .....	17
1.2.2 Epidemiologie und Therapie .....	18
1.3 Epidemiologie und klinische Relevanz der Superinfektion mit <i>S. pneumoniae</i> nach stattgehabter Influenzainfektion .....	19
1.4 Das Immunsystem .....	21
1.4.1 Das angeborene Immunsystem .....	21
1.4.2 Pattern Recognition Receptors .....	23
1.4.2.1 Toll-like Receptors .....	23
1.4.2.2 NOD-like Receptors .....	24
1.4.2.3 RIG-I-like Receptors .....	26
1.4.3 Die angeborene Immunantwort auf <i>S. pneumoniae</i> .....	27
1.4.4 Die angeborene Immunantwort auf das Influenza A-Virus .....	30
1.5 Ziel der Arbeit .....	33
2 Material und Methoden .....	34
2.1 Erreger .....	34

2.1.1	Kultur von <i>S. pneumoniae</i> .....	34
2.1.2	Influenza A-Virus .....	34
2.2	Mäuse .....	35
2.3	Kultur von murinen Zellen .....	35
2.3.1	Kultur von murinen Fibroblasten .....	35
2.3.2	Isolation und Kultur von murinen aus Knochenmarkszellen differenzierten Makrophagen .....	35
2.4	Molekularbiologie .....	36
2.4.1	RNA-Aufreinigung .....	36
2.4.2	Transkription von aufgereinigter RNA zu cDNA .....	37
2.4.3	Quantitative <i>real time</i> -PCR .....	37
2.4.4	ELISA .....	39
2.5	Zellbiologie .....	39
2.5.1	Inhibitoren/Stimulatoren .....	39
2.5.2	Infektionen .....	40
2.5.2.1	Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> .....	40
2.5.2.2	Infektion mit Influenza A-Virus .....	40
2.6	Statistische Analyse .....	40
2.7	Reagenzien und Geräte .....	41
3	Ergebnisse .....	43
3.1	Vorherige Infektion mit Influenza A-Virus inhibiert die Sekretion von IL-1 $\beta$ nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion .....	43
3.2	Vorherige Stimulation von BMMs mit poly I:C oder IFN $\beta$ inhibiert die Sekretion von IL-1 $\beta$ und IL-18 nach Infektion mit <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> in Abhängigkeit von IFNAR .....	46
3.3	Einfluss von IFN $\beta$ auf die Genexpression von IL-1 $\beta$ , IL-18, Caspase-1, ASC, NLRP3 und AIM2 in <i>S. pneumoniae</i> -infizierten Makrophagen .....	48

3.4	Die inhibitorische Wirkung von poly I:C und IFN $\beta$ auf die Inflammasom-Antwort auf die Pneumokokkeninfektion ist unabhängig von iNOS.....	50
3.5	Die Inhibition der durch <i>S. pneumoniae</i> stimulierten IL-1 $\beta$ -Sekretion durch IFN $\beta$ hängt nicht von gesteigerter Autophagie ab .....	52
3.6	Einfluss von IFN $\beta$ auf die Genexpression verschiedener Regulatoren des NLRP3-Inflammasoms.....	54
4	Diskussion.....	56
4.1	Infektion mit Influenzavirus A inhibiert die Inflammasom-abhängige Zytokinproduktion .....	57
4.2	Analoge viraler RNA inhibieren die durch <i>S. pneumoniae</i> stimulierte Produktion Inflammasom-abhängiger Zytokine in Abhängigkeit von IFNAR.....	60
4.3	Hemmung der Inflammasom-abhängigen Zytokinproduktion durch IFN $\beta$ in <i>S. pneumoniae</i> -infizierten Makrophagen .....	61
4.4	IFN $\beta$ reguliert die Inflammasomaktivität in <i>S. pneumoniae</i> -infizierten Makrophagen unabhängig von iNOS .....	64
4.5	IFN $\beta$ inhibiert die IL-1 $\beta$ -Sekretion nicht durch Steigerung der Autophagie .....	66
4.6	IFN $\beta$ beeinflusst nicht die Transkription bekannter Regulatoren des Inflammasoms .....	67
4.7	Weitere vermutete Mechanismen der erhöhten Anfälligkeit gegenüber sekundären Infektionen nach Influenza-Infektion ....	69
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	73
5	Literaturverzeichnis .....	75
6	Anhang .....	91
	Eidesstattliche Versicherung.....	91
	Lebenslauf.....	92
	Danksagung .....	93

## Zusammenfassung

Allein in Industrieländern erkranken jährlich während der Grippeepidemien 3 – 5 Millionen Menschen schwer an einer Infektion mit Influenzaviren. Bakterielle Superinfektionen im Verlauf oder in der Folge einer Grippeerkrankung sind gefürchtete Komplikationen und stellen die Hauptursache schwerer und potentiell letal endender Krankheitsverläufe dar. Einer der häufigsten Erreger dieser Superinfektionen, die vor allem bei sehr jungen und alten Menschen auftreten, ist das Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Essentiell bei der Erkennung von *S. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem sind Inflammasome, welche als Caspase-1-enthaltende Multiproteinkomplexe die Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 vermitteln. Es wird angenommen, dass eine Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems durch die Virusinfektion zur erhöhten Empfänglichkeit gegenüber der nachfolgenden Pneumokokkeninfektion beiträgt. In dieser Arbeit sollte die Hypothese getestet werden, dass eine Influenzavirus-Infektion die Inflammasomantwort auf Pneumokokken negativ beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit Influenzavirus A die Produktion der Inflammasom-abhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 nach Superinfektion mit *S. pneumoniae* in murinen Makrophagen hemmt. Diese Hemmung ist abhängig von der Erkennung von Virus-RNA durch die Wirtszelle sowie der hierdurch induzierten Typ I IFN-Produktion. Die Inhibition von IL-1 $\beta$  und IL-18 durch IFN $\beta$  wird nicht durch Repression der Genexpression von Inflammasombestandteilen und überwiegend nicht durch Repression der Transkription von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 bedingt, sondern ist aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine direkte Hemmung der Inflammasome vermittelt.

Der Mechanismus dieser von IFN $\beta$  ausgeübten Hemmung ist unabhängig von iNOS. Darüber hinaus scheinen Autophagie und die Inflammasomregulatoren PSTPIP1, POP1, Serpina1a, MFGE8 und *Birc3/cIAP2* hierbei keine Rolle zu spielen. Möglich erscheint, dass *Birc2/cIAP1* oder andere Moleküle an der Hemmung der Inflammasome durch IFN $\beta$  beteiligt sind.

Zusammengenommen geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass die Hemmung der Inflammasom-abhängigen antibakteriellen Immunantwort durch eine

Virus-RNA-vermittelte Typ I IFN-Produktion zu einer erhöhten Suszeptibilität Influenzavirus-infizierter Personen gegenüber Pneumokokken und anderen Bakterien beiträgt.

## Abstract

3 – 5 million people worldwide suffer from severe illness due to infections with influenza virus during the influenza pandemics every year in industrialized countries alone. Detrimental bacterial superinfections on basis of the already existing infections with influenza virus are the main reason for the high morbidity and mortality. One of the most frequent pathogens that lead to such superinfections, especially in very young and older individuals, is *Streptococcus pneumoniae*. Essential for the recognition of the pathogen by the innate immune system are caspase-1-containing multiprotein complexes called inflammasomes which mediate the production of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. It is assumed that a compromised innate immunity by the viral infection contributes to the development of the postinfluenza pneumococcal disease. In this work the hypothesis that an infection with influenza virus negatively affects the activity of the inflammasomes after infection with *S. pneumoniae* was tested.

We could show that the infection with influenza virus A inhibits the production of the inflammasome-derived cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 after superinfection with *S. pneumoniae* in murine macrophages. This inhibition seems to depend on the recognition of viral RNA and the subsequent induction of type I IFNs by the host cell. The inhibition of IL-1 $\beta$  and IL-18 by IFN $\beta$  does not occur through the repression of the gene expression of inflammasome components and mostly not through the repression of the transcription of the zymogen forms of IL-1 $\beta$  and IL-18 but rather through direct inhibition of the inflammasomes.

The mechanism responsible for this IFN $\beta$ -dependent inhibition does not involve iNOS activity as stated before. Moreover, autophagy and the regulation of the known inflammasome regulating proteins PSTPIP1, POP1, Serpina1a, MFGE8 and *Birc3/cIAP2* do not seem to play a role. However, it seems possible that *Birc2/cIAP1* or other molecules could be involved in the inhibitory effect of IFN $\beta$  on the inflammasomes.

Altogether the results of this work indicate that the inhibition of the inflammasome-dependent antibacterial immune response by the virus-RNA-mediated type I IFN production leads to an increased susceptibility of influenza-infected people towards pneumococci and other bacteria.

## Abkürzungen

**Tabelle 1: Liste der Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
Alum	Aluminiumhydroxid
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BIR	<i>baculovirus inhibitor repeat</i>
Birc	<i>baculoviral IAP repeat-containing protein</i>
BMMs	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CAP	<i>community-acquired pneumonia</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	kodierende DNA
ciAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DED	<i>death effector-domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNS1	ohne NS1-Protein
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige DNA

dsRNA	Doppelsträngige RNA
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	<i>et alia</i> (und andere)
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>IFN-gamma-activated-sites</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HA	Hämagglutinin
hBD	humanes Beta-Defensin
HIN200	<i>hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- $\alpha/\beta$ Rezeptor
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
JAK	Janus-Kinase
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
K63	Lysin an 63. Stelle des Ubiquitin-Proteins
KBE	Kolonie-bildende Einheit
KC	CXCL1 Chemokin
LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LeTx	Milzbrandtoxin
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
L-NMMA	L-N <sup>G</sup> -Monomethylarginin
LP	Lipoprotein

LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
LTS	Lipoteichonsäure
M2	Influenza M2-Membranprotein
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated proteinkinase</i>
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MFGE8	<i>milk fat globule-EGF factor 8</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein 2</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
n.s.	statistisch nicht signifikant
NA	Neuraminidase
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NK	Natürliche Killerzelle
NKp	<i>natural killer cell related protein</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungs-Domäne
Nos2	<i>nitric oxide synthase 2</i>
NS1	<i>non-structural protein 1</i>
NS1-125	trunkiertes NS1-Protein mit den Aminosäuren 1-125
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
p. i.	<i>post infectionem</i>

PAFr	<i>platelet-activating factor rezeptor</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBS <sup>+/+</sup>	<i>phosphate-buffered saline</i> mit Calcium und Magnesium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PG	Peptidoglykan
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLSCR1	<i>phospholipid scramblase 1</i>
PLY	Pneumolysin
poly I:C	poly(Inosin:Cytosin)-Säure
POP1	<i>pyrin-only protein 1</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSTPIP1	<i>proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1</i>
PYD	Pyrin-Domäne
PYHIN	Pyrin and HIN Domäne-enthaltende Proteinfamilie
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP3	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RQ	Relative Quantität
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SOCS1	<i>supressor of cytokine signalling-1</i>
ssRNA	einzelstängige RNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STIKO	Ständigen Impfkommision des Robert Koch-Instituts
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>

THY	Todd-Hewitt Bouillon mit Hefeextrakt
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	<i>toll-like rezeptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TRIM25	<i>tripartite motif-containing protein 25</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

### 1.1.1 Biologie

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, Pneumokokkus) ist ein lanzettförmiges grampositives,  $\alpha$ -hämolisierendes Bakterium, welches typischerweise in Form von Diplokokken vorkommt und regelmäßig die Schleimhäute der oberen Atemwege des Menschen kolonisiert. Es kann jedoch auch invasive Infektionen verursachen, zu denen neben der Pneumonie auch die Meningitis und die Sepsis zählen (Lynch und Zhanel, 2009).

Das ringförmige Genom des Bakteriums besteht je nach Serotyp und dessen Virulenz aus 2 – 2,1 Millionen Basenpaaren, welche wiederum 1553 für die Viabilität des Bakteriums essentielle Gene kodieren. Des Weiteren kodieren 154 Gene die einzelnen Virulenzfaktoren der Pneumokokken (van der Poll und Opal, 2009).

Die 200 – 400 nm dicke Polysaccharidkapsel bildet die äußerste Schicht des Bakteriums und ist kovalent an die äußeren Peptidoglykane der Zellwand gebunden (Kadioglu et al., 2008).

Als erstes entdecktes nicht-Protein-Antigen, welches dazu in der Lage ist, eine Antikörperantwort hervorzurufen, determiniert die Kapsel die bisher über 90 bekannten Serotypen des *S. pneumoniae* und stellt einen der Hauptvirulenzfaktoren dar (Lee et al., 1991; Kadioglu et al., 2008; Ricci et al., 2013). Die Unabdingbarkeit der Kapsel in Bezug auf die Virulenz des Erregers lässt sich unter anderem daran erkennen, dass alle klinischen Isolate von invasiven Pneumokokkeninfektionen bekapselt sind und der Verlust der Kapsel durch Mutation oder enzymatische Degradation zu einer dramatischen Reduktion der Invasivität des Erregers im Tiermodell führt (Hyams et al., 2010).

Die meisten Kapseltypen besitzen anionische Polysaccharide und sind bei physiologischem pH-Wert stark negativ geladen (Kadioglu et al., 2008). Diese negative Ladung führt zu dem, dass der ebenfalls anionische Sialinsäuren enthaltende

Schleim des Wirtes durch elektrostatische Abstoßung nicht am Bakterium haftet und dieses dadurch vor dem mukoziliären Abtransport geschützt ist. Zum anderen beeinträchtigt die starke negative Ladung der Polysaccharide auch die Interaktionen mit phagozytierenden Zellen und bewirkt somit einen relativen Schutz der Bakterien vor diesen Abwehrzellen (Nelson et al., 2007; Kadioglu et al., 2008).

Außerdem verhindert die Kapsel effektiv die Opsonisierung durch Komplementbestandteile, das C-reaktive Protein und Immunglobuline, wobei sie zusätzlich sterisch die Interaktion bereits gebundener Immunglobuline oder Komplement-Bestandteile mit den für die Phagozytose bzw. Aktivierung nötigen Rezeptoren und Strukturen verhindert (Kadioglu et al., 2008; Hyams et al., 2010).

Die Kapsel schützt die Pneumokokken außerdem vor dem Festsetzen (*trapping*) durch *neutrophil extracellular traps* (NETs), wobei eine auf der Pneumokokkenoberfläche exprimierte DNase eine zentrale Rolle einnimmt, indem sie das DNA-Gerüst der NETs zerstört (Wartha et al., 2007).

Ein weiterer wichtiger und potenter Virulenzfaktor ist das 52 kDa große Zytotoxin Pneumolysin (PLY), das zur Familie der von grampositiven Bakterien synthetisierten Cholesterin-abhängigen Zytolysine gehört und in 16 bekannten Proteinvarianten vorkommt (Lock et al., 1996; Kadioglu et al., 2008). Das PLY der meisten Pneumokokkenarten formt Oligomere mit bis zu 44 Untereinheiten, welche sich wiederum als bis zu 260 Å (26 nm) große Poren in die Cholesterin-enthaltenden Zellmembranen des Wirtes integrieren und so ihren hämolytischen bzw. zytotoxischen Effekt entfalten. PLY wird von beinahe allen klinischen Isolaten des *S. pneumoniae* produziert (Tilley et al., 2005; Kadioglu et al., 2008). Interessanterweise existieren jedoch auch klinische Isolate, die PLY-Varianten mit reduzierter oder gar fehlender zytotoxischer Aktivität produzieren (Jefferies et al., 2007).

PLY besitzt zudem auch unterhalb von zytolytischen Konzentrationen Wirkungen, zu denen die Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems, die Inhibition des *respiratory burst* von Phagozyten, die Induktion von Zytokinsekretion und Apoptose und die Verminderung der Motilität der Zilien des respiratorischen Epithels gehören (Hirst et al., 2004; Kadioglu et al., 2008; Mitchell und Mitchell, 2010).

PLY scheint sowohl für das Überleben der Pneumokokken im oberen und unteren Respirationstrakt als auch für die Invasion der Pneumokokken in das Gefäßsystem des Wirtes eine wichtige Rolle zu spielen (Kadioglu et al., 2002; Hirst et al., 2004).

Neben der Polysaccharidkapsel und PLY besitzt *S. pneumoniae* eine Reihe weiterer Virulenzfaktoren wie Neuraminidasen, Hyaluronidase, Autolysin A, IgA1-Protease und das Pneumokokken-Oberflächenantigen A, die zur Pathogenität des Erregers beitragen (Kadioglu et al., 2008).

### 1.1.2 Epidemiologie

*S. pneumoniae* ist weltweit der Hauptverursacher der ambulant erworbenen Lungenentzündung (*community-acquired pneumonia*, CAP), kann jedoch darüber hinaus auch andere Erkrankungen wie Meningitis, Sepsis, Mittelohrentzündung und Nasennebenhöhlenentzündung hervorrufen. Dabei ist die vorherige Etablierung eines Trägerstatus zwingende Voraussetzung für die Ausbildung einer invasiven Pneumokokkeninfektion (Bogaert et al., 2004; Weinberger et al., 2008; van der Poll und Opal, 2009).

Etwa 10% der gesunden erwachsenen Bevölkerung und 20 – 40% der gesunden Kinder sind Träger von *S. pneumoniae*. In Kindertagesbetreuungs-Einrichtungen können sogar über 60% der Kinder Träger des Erregers sein, was Kinder mit zum Hauptreservoir des Erregers macht (Kadioglu et al., 2008; van der Poll und Opal, 2009). Aus dieser (asymptomatischen) Trägerschaft von *S. pneumoniae* können durch verschiedene prädisponierende Faktoren die genannten invasiven Infektionen resultieren, nachdem der Erreger in normalerweise sterile Teile des Körpers wie die Nasennebenhöhlen oder das Mittelohr gelangt, in die Lunge aspiriert wird oder den Blutstrom erreicht (Kadioglu et al., 2008; Lynch und Zhanel, 2009).

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) im Jahr 2005 ergaben, dass jährlich etwa 1,6 Millionen Menschen an den Folgen von Pneumokokkeninfektionen sterben, zu denen alleine 0,7 – 1,0 Millionen Kinder im Alter von unter 5 Jahren gehören (World Health Organization, 2007). In etwa 20% der Pneumokokkenpneumonien bei Erwachsenen kann eine Bakteriämie diagnostisch nachgewiesen werden. In diesen Fällen beträgt die Letalität zwischen 10 und 30% (Lynch und Zhanel, 2009).

Die Inzidenz der invasiven Pneumokokkeninfektion ist bei sehr jungen (unter 2 Jahren) und sehr alten (ab 65 Jahren) Menschen, sowie bei Menschen mit Komorbiditäten (z. B.

Influenza-Infektion, Diabetes mellitus), Immunschwächen (z. B. Asplenie, HIV-Infektion, humorale Immundefekte) oder Alkohol- oder Nikotinabusus besonders hoch (Kadioglu et al., 2008; Lynch und Zhanel, 2009).

### **1.1.3 Prophylaxe und Therapie**

Die Ständige Impfkommission (STIKO) des Robert Koch-Institutes empfiehlt die Impfung aller Kinder im Alter von unter 24 Monaten mit einem Pneumokokken-Konjugatimpfstoff. Außerdem soll standardmäßig die einmalige Impfung von Erwachsenen im Alter von über 60 Jahren sowie von Jugendlichen und Erwachsenen mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge bestimmter Grundkrankheiten mit einem Pneumokokken-Polysaccharidimpfstoff stattfinden (Robert Koch-Institut, 2013).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Impfung zwar die Besiedelung durch und die Erkrankung an den in den Impfstoffen enthaltenen Serotypen vermindert, diese Lücke aber teilweise von anderen, nicht im Impfstoff enthaltenen Serotypen von *S. pneumoniae* eingenommen werden kann. Diese nicht durch die Impfung erfassten Serotypen sind potentiell ebenfalls dazu in der Lage, invasive Erkrankungen zu verursachen (Kadioglu et al., 2008; Frazão et al., 2010).

Die Standardtherapie einer Pneumokokkeninfektion besteht in erster Linie aus der Gabe von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Alternativ können auch Antibiotika aus den Gruppen der Makrolide, Tetracycline, Fluorchinolone, Nukleosid-Analoga oder Glykopeptide eingesetzt werden. Es ist jedoch zu beobachten, dass die Resistenzlage der Pneumokokken hinsichtlich vieler eingesetzter Antibiotika zunimmt. Diese Tatsache macht ein Verständnis der tatsächlich zur Erkrankung mit Pneumokokken führenden Mechanismen umso wichtiger, um die Entstehung der Erkrankung verhindern oder neuartige Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können (Högberg et al., 2007; Kadioglu et al., 2008; van der Poll und Opal, 2009; Höffken et al., 2009).

## 1.2 Influenza A Virus

### 1.2.1 Biologie

Derzeit sind drei verschiedene Influenzavirus-Gattungen bekannt, die alle zur Familie der Orthomyxoviridae gehören. Von den drei Gattungen verursachen die Influenzaviren A und B regelmäßig epidemische Krankheitsausbrüche, während das Influenzavirus C nur sporadisch zu Erkrankungen führt (McCullers, 2006).

Das klinisch bedeutsamste Influenzavirus A besitzt ein aus acht Segmenten bestehendes Genom aus *negative-sense* Einzelstrang-RNA (ssRNA), das bis zu 16 virale Proteine codiert (Hayashida et al., 1985; Schrauwen et al., 2013).

Auf seiner Oberfläche befinden sich die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), die eine weitere Einteilung in Subtypen zulassen. Es existieren 18 bekannte Hämagglutinin- (H1-18) und 11 bekannte Neuraminidase-Subtypen (N1-11), nach welchen eine Einteilung nach dem Schema HxNx erfolgt (McCullers, 2006; Zhu et al., 2012; Tong et al., 2013).

Das Influenzavirus bindet über sein Hämagglutinin Sialinsäure-haltige Rezeptoren an der Oberfläche von Wirtszellen und wird daraufhin durch Endozytose von der Zelle aufgenommen. Nachfolgend kann die virale Membran mit der Membran des Endosoms fusionieren und die virale ssRNA wird zusammen mit viralen Proteinen ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Nach dem Transport der ssRNA in den Zellkern der Wirtszelle finden hier die Amplifikation der RNA und Transkription in mRNA statt. Die amplifizierte RNA wird zusammen mit den über die mRNA synthetisierten viralen Proteinen verpackt und Neuraminidase-abhängig in Form von Virionen freigesetzt. Der gesamte Replikationszyklus dauert je nach Virus- und Zelltyp zwischen 6 und 16 Stunden (Ludwig et al., 2003; Ballinger und Standiford, 2010).

Während des Replikationszyklus des Influenzavirus entsteht als Nebenprodukt doppelsträngige RNA (dsRNA) (Guillot et al., 2005; Zinzula und Tramontano, 2013). Die relativ ungenaue virale RNA-Polymerase ohne *Proofreading*-Fähigkeit bedingt eine hohe genetische Variabilität des Virus, wobei dieser Mechanismus als Antigendrift bezeichnet wird (Guillot et al., 2005; McCullers, 2006).

Aufgrund der Tatsache, dass das Genom des Influenzavirus segmentiert ist, kann es zudem zum Phänomen des *Reassortment* kommen. Dieses Phänomen bezeichnet den Austausch einzelner Gensegmente zwischen den Virus-Subtypen bei gleichzeitiger

Infektion einer Wirtszelle durch verschiedene Influenzavirus-Subtypen. Dieser Prozess wird im evolutionären Kontext auch Antigen shift genannt. Durch diese Mechanismen können sich die Influenzaviren sehr rasch gravierenden Änderungen unterziehen (McCullers, 2006; Schrauwen et al., 2013).

Humanpathogene Stämme des Influenzavirus A befallen in der menschlichen Lunge vornehmlich Typ II Pneumozyten, in denen sie dann replizieren. Sie infizieren jedoch auch Alveolarmakrophagen (Weinheimer et al., 2012).

### **1.2.2 Epidemiologie und Therapie**

Das Influenzavirus A zirkuliert hauptsächlich in Menschen, Schweinen und Vögeln, wobei das primäre Reservoir in Wasservögeln liegt (Vahlenkamp und Harder, 2006; Weinheimer et al., 2012). Jährlich kommt es zu Epidemien, die durch Grippeviren verursacht werden (McCuller, 2006).

Die zur Zeit klinisch bedeutsamsten Subtypen des Influenzavirus A sind H1 und H3, obwohl auch H2, H5, H6, H7 und H9 eine Bedrohung hinsichtlich einer pandemischen Ausbreitung darstellen (Schrauwen et al., 2013). Speziell der Subtyp H3N2 hat in den vergangenen Jahren einen Großteil der saisonalen Grippeepidemien verursacht und stellt somit zurzeit die Hauptursache der Grippemorbidity und –mortality dar (Russell et al., 2008).

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation gehen davon aus, dass allein in Industrieländern jährlich 3 – 5 Millionen Menschen während der Grippeepidemien unter einem schweren Krankheitsverlauf leiden und dies in 250.000 – 500.000 Fällen zum Tode führt (Stöhr, 2003; McCullers, 2006).

In den Vereinigten Staaten erkranken jährlich 5 – 20% der Bevölkerung an Grippe, was alleine hier etwa 30.000 Todesfälle verursacht (Robinson et al., 2013).

Es wird davon ausgegangen, dass in Ost- und Südostasien eine kontinuierliche Zirkulation an Grippeviren existiert, von wo aus es in der Folge regelmäßig weltweit zu einer Ausbreitung der Erreger kommt. Aufgrund der engen Reise- und Handelsbeziehungen dieser Region mit Ozeanien, Nordamerika und Europa kann sich das Virus zügig in diese Gegenden ausbreiten, wobei es nur zu geringfügigen genetischen Veränderungen im Vergleich zu den ursprünglichen Viren kommt. Erst spät

im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbreitung nach Südamerika, wo die Erkrankungswelle schließlich verebbt (Russell et al., 2008).

Prinzipiell existieren drei verschiedene mögliche Ursachen, an einer Influenza-Infektion zu versterben. Ist die primäre Infektion mit dem Influenzavirus virulent genug, so kann diese allein zum Tode des infizierten Individuums führen. Liegen bereits chronische Vorerkrankungen von Herz, Lunge oder Stoffwechsel vor, so kann es durch die Grippeerkrankung zur Exazerbation der bereits bestehenden Erkrankung kommen, was wiederum ebenfalls zum Tode führen kann. Eine weitere und mit Sicherheit nicht zu vernachlässigende Möglichkeit ist eine sekundäre bakterielle Infektion, die durch die vorangegangene Virusinfektion begünstigt wird und nicht selten letal endet (McCullers, 2006).

Die ständige Impfkommission des Robert Koch-Institutes empfiehlt die jährliche Impfung im Herbst aller Personen ab 60 Jahren sowie zusätzlich bestimmter Personengruppen wie Schwangeren, chronisch Kranken, Immundefizienten und Personen mit erhöhter Gefährdung durch besondere Exposition mit einem attenuierten Influenza-Lebendimpfstoff (Robert Koch-Institut, 2013).

Zur Therapie der Influenzainfektion stehen verschiedene Virustatika zur Auswahl, welche aber aufgrund der teilweise recht schlechten Verträglichkeiten nur bei schweren Verläufen und bei Risikopersonen empfohlen werden. Der M2-Inhibitor Amantadin ist lediglich gegen Influenza-A-Viren wirksam und es wird eine rasche Resistenzentwicklung beobachtet. Die Neuraminidase-Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivir wirken gegen Influenza A und B, jedoch werden auch bei Oseltamivir zunehmend Resistenzen beobachtet: das durchschnittliche Niveau lag bereits im Jahr 2008 bei etwa 15% (Höffken et al., 2009).

### **1.3 Epidemiologie und klinische Relevanz der Superinfektion mit *S. pneumoniae* nach stattgehabter Influenzainfektion**

In den Jahren 1918 bis 1920 zog eine Influenza A/H1N1-Pandemie, die als „Spanische Grippe“ betitelt wird, Schätzungen zufolge mindestens 40 – 50 Millionen Tode nach sich. Ursächlich für die meisten Todesfälle war damals allerdings nicht die Influenzainfektion allein, sondern sekundäre bakterielle Infektionen, die im Zeitalter vor

der Entdeckung und dem dadurch möglichen Einsatz von Antibiotika noch gravierendere Folgen hatten als heutzutage (Johnson und Mueller, 2002; McCullers, 2006; Morens et al., 2008).

Die „Schweinegrippe“-Pandemie im Jahr 2009 wurde ebenfalls durch ein Influenza-A-Virus des Subtyps H1N1 hervorgerufen und verursachte etwa 300.000 Todesfälle, wobei überraschend viele jüngere Patienten betroffen waren. Über die Hälfte der Todesfälle war auch hier durch sekundäre bakterielle Infektionen bedingt (Ballinger und Standiford, 2010; Chertow und Memoli, 2013).

Bakterielle Superinfektionen verkomplizieren etwa 0,5% der Influenzainfektionen bei jungen und ansonsten gesunden Individuen und mindestens 2,5% der Fälle bei älteren oder prädisponierten Menschen, was sie bei ihrer hohen Erkrankungsinzidenz zur Hauptursache von schweren Krankheitsverläufen und letalen Ausgängen bei epidemischen und pandemischen Grippewellen macht (Chertow und Memoli, 2013; Robinson et al., 2013; Smith et al., 2013). Zu den häufigsten Erregern dieser sekundären Bakterieninfektionen zählen *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* (Metzger und Sun, 2013; Smith et al., 2013).

Von den Koinfektionen betroffen sind in der Regel sehr junge und alte Patienten, Schwangere und Patienten mit bestimmten Vorerkrankungen. Jedoch muss auch bereits die Kolonisierung des Nasopharynx mit *Streptococcus pneumoniae* als Risikofaktor für einen schweren Krankheitsverlauf im Rahmen einer Influenzainfektion angesehen werden, der möglicherweise den Tod zur Folge hat (Chertow und Memoli, 2013).

Die Virustiter im Verlauf einer Influenzainfektion erreichen in der Regel nach 3 – 5 Tagen ihr Maximum, wonach die Titer wieder sinken und die Infektion nach etwa 10 – 12 Tagen überstanden sein sollte. Die größte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Superinfektionen hingegen wird um den 7. Tag nach der Primärinfektion herum beobachtet. Sie liegt somit in der Zeit, in der es bereits zum Abfallen der Virustiter kommt, und hält etwa eine Woche lang an (Chertow und Memoli, 2013; Metzger und Sun, 2013).

Die Mechanismen, die im Rahmen einer viralen Infektion zu dieser erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Superinfektionen führen, sind bisher nur unzureichend aufgeklärt (siehe unten).

## 1.4 Das Immunsystem

### 1.4.1 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem wird klassischerweise in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt. Der adaptive Teil des Immunsystems ist zwar spezifischer, benötigt allerdings einige Zeit, um suffizient auf eindringende Pathogene reagieren zu können. Das angeborene Immunsystem hingegen kann sehr schnell auf eindringende Erreger reagieren und stellt somit die erste Barriere des Wirtes gegenüber Krankheitserregern dar. Die beiden aus didaktischen Gründen künstlich voneinander unterschiedenen Teile des Immunsystems agieren dabei jedoch nicht unabhängig voneinander, sondern interagieren miteinander. Formen des phylogenetisch sehr alten angeborenen Immunsystems existieren wahrscheinlich in den allermeisten multizellulären Organismen (Medzhitov und Janeway, 2000a, b).

Im Grunde gibt es zwei verschiedene Verteidigungsmechanismen eines Wirtes gegenüber von außen eindringenden Pathogenen – konstitutiv vorhandene und induzierbare:

Zu den konstitutiven Mechanismen zählen die Barrierefunktionen der Körperoberflächen und Schleimhäute sowie verschiedene antimikrobielle Peptide und das Enzym Lysozym, welche permanent durch Oberflächenepithelzellen oder Immunzellen produziert werden (Medzhitov und Janeway, 2000a, b; Benincasa et al., 2009).

Die Aktivierung des induzierbaren Teils des angeborenen Immunsystems führt über verschiedene Signalwege rasch zur Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine und der Invasion von Phagozyten und somit zur Induktion einer Entzündungsreaktion, die zur Eradikation des auslösenden Erregers führen kann. Zudem führt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems auch zur Initiierung der adaptiven Immunantwort (Medzhitov und Janeway, 2000b; Kumar et al., 2011).

Die Erkennung von mikrobiellen Pathogenen geschieht hierbei über eine Reihe Keimbahn-kodierter Rezeptoren, welche als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) bezeichnet werden (Medzhitov und Janeway, 2000a; Kumar et al., 2011; Franchi et al., 2012).

Die Anzahl der bekannten, an der angeborenen Immunantwort beteiligten Rezeptoren und ihrer Liganden wächst ständig an (Kumagai und Akira, 2010). Sie werden in verschiedene Proteinfamilien eingeteilt: Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*,

TLRs), C-Typ Lektinrezeptoren (*c-type lectin receptors*, CLRs), Retinsäure-induzierbares Gen-I-ähnliche Rezeptoren (*retinoic acid-inducible gene I-like receptors*, RLRs) und NOD-ähnliche Rezeptoren (*NOD-like receptors*, NLRs) (Takeuchi und Akira, 2010). Darüber hinaus spielen zytosolische DNA-Sensoren wie das der PYHIN-Familie angehörende HIN200-Protein AIM2 (*absent in melanoma 2*) oder die cGMP-AMP Synthase (cGAS) eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort auf DNA-Viren sowie Bakterien (Fang et al., 2011; Bhat und Fitzgerald, 2013).

Viele PRRs werden nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf nicht-professionellen Zellen der Abwehr wie Epithelien, Endothelien und Fibroblasten exprimiert und sind entweder an den Plasmamembranen der Zelloberflächen, in Endosomen oder im Zytoplasma lokalisiert. Somit können sie sowohl extrazellulär als auch intrazellulär als Wächter für Zeichen einer Infektion fungieren (Medzhitov, 2007; Takeuchi und Akira, 2010; Rathinam et al., 2012).

PRRs erkennen konservierte mikrobielle Moleküle, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Diese PAMPs haben gemeinsam, dass sie in vielen Fällen nur von Mikroorganismen produziert werden oder in der entsprechenden Lokalisation nur im Rahmen einer Infektion vorkommen. Dieses Prinzip lässt eine Unterscheidung zwischen fremd und selbst zu. Zudem sind PAMPs in der Regel Moleküle, die für das Überleben der Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung sind, und es handelt sich bei PAMPs häufig um Moleküle mit invarianten konservierten Strukturen, die jeweils bei ganzen Erregerklassen vorzufinden sind. Beispiele solcher PAMPs sind bakterielle Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäuren, Peptidoglykane, bakterielle DNA und virale dsRNA (Medzhitov und Janeway, 2000b).

Neben den mikrobiellen (exogenen) PAMPs erkennen PRRs jedoch auch endogene Moleküle, die durch Zellschäden freigesetzt werden. Diese Moleküle werden dann als Schaden-assoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) bezeichnet (Takeuchi und Akira, 2010).

Bei der Stimulation des angeborenen Immunsystems über PRRs kommt es rasch zur Ausschüttung diverser Zytokine und Chemokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Interferon (IFN)- $\alpha/\beta$ , KC und MCP-1, welche benachbarte Immun- und nicht-Immunzellen stimulieren, Zellen der Immunabwehr rekrutieren und das adaptive Immunsystem regulieren (Opitz et al., 2010; Koppe et al., 2012b). Rekrutierte und aktivierte Zellen wie neutrophile Granulozyten oder Makrophagen bekämpfen gemeinsam mit aktivierten

Epithelzellen die auslösenden Erreger z. B. mittels Phagozytose, der Sekretion antimikrobieller Peptide wie humanem  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) und -3 (hBD-3), der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Errichtung von NETs (Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009; Scharf et al., 2012).

Ebenfalls zum angeborenen Immunsystem zählt das Komplementsystem, welches durch das Binden von löslichen, im Serum befindlichen Antikörpern oder Lektinen (z. B. Mannan-bindendes Lektin) an Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen aktiviert wird und zur Lyse und Phagozytose derselben führt (Ali et al., 2012).

## **1.4.2 Pattern Recognition Receptors**

### **1.4.2.1 Toll-like Receptors**

Die TLRs gehören zu den am besten erforschten PRRs und sind für das Erkennen von Pathogenen außerhalb von Zellen und in Endolysosomen zuständig. Sie bestehen aus einer (extrazellulären) N-terminalen Region mit Leucin-reichen Wiederholungen (*leucin-rich repeats*, LRRs), welche für die Erkennung der jeweiligen PAMPs notwendig ist, einer Transmembrandomäne und der für die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege bedeutsamen intrazellulären Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne (Takeuchi und Akira, 2010).

Im Menschen sind 10 verschiedene TLRs bekannt, in der Maus dagegen 12, wobei sich die TLRs 1 bis 9 in beiden Spezies funktionell ähneln. Ein zum Menschen analoger TLR10 existiert in der Maus nicht. Diese besitzt jedoch im Gegenzug die TLRs 11, 12 und 13 (Kumar et al., 2011).

Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11 sind an der Plasmamembran der Zelloberfläche lokalisiert und detektieren extrazelluläre PAMPs, wohingegen sich die TLRs 3, 7, 8, 9 und 10 an den Membranen von Endolysosomen befinden (Takeuchi und Akira, 2010; Kumar et al., 2011).

TLRs erkennen sowohl bakterielle, virale, fungale und protozoale als auch körpereigene Strukturen (Kumar et al., 2011). Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 7 und 9 dienen der Erkennung von Bakterien, wobei TLR2 die Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien erkennt (Schwandner et al., 1999; Kumar et al., 2011).

Die TLRs 3, 7, 8 und 9 erkennen verschiedene Nukleinsäuren z. B. viralen Ursprungs, wobei TLR3 dsRNA, TLR7 ssRNA und TLR9 unmethylierte CpG-haltige Strukturen registriert. Nach dem Binden eines geeigneten Liganden formieren sich die TLRs zu Homo- oder Heterodimeren und aktivieren daraufhin ihre nachgeschalteten Signalwege (Takeuchi und Akira, 2010; Kumar et al., 2011).

Es werden TIR-Domänen enthaltende Adaptermoleküle wie MyD88, TRIF, TIRAP oder TRAM zum Rezeptor rekrutiert, welche wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) oder IFN-regulatorischer Faktor (*IFN regulatory factor*, IRF) 3/7 oder nachgeschaltete Kinasen wie die mitogenaktivierten Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) aktivieren, um die Produktion proinflammatorischer Zytokine oder Typ I IFNs zu induzieren (Medzhitov und Janeway, 2000a, b; Kumar et al., 2011).

#### **1.4.2.2 NOD-like Receptors**

Es existieren zurzeit 23 bekannte NLRs im Menschen und etwa 34 in der Maus, die eine Vielzahl an Liganden erkennen können (Kumar et al., 2011). NLRs sind im Zytoplasma lokalisiert und werden von vielen Zelltypen, einschließlich Immun- und Epithelzellen, exprimiert (Franchi et al., 2009).

NLRs bestehen aus mehreren Domänen. Die C-terminale Domäne enthält mehrere LRRs und dient in vielen Fällen der (indirekten) Erkennung von PAMPs oder DAMPs. Zentral gelegen befindet sich die Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungs-Domäne (NOD), welche der durch die jeweiligen Liganden induzierten ATP-abhängigen Oligomerisierung und Bildung des aktivierten Rezeptorkomplexes für die Initiierung der nachgeschalteten Signalwege dient. N-terminal liegen entweder eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), eine Pyrin-Domäne (PYD), Baculovirus inhibitorische Wiederholungen (*baculovirus inhibitor repeats*, BIRs), eine säurehaltige Domäne oder eine Todes-Effektor-Domäne (*death effector-domain*, DED), welche jeweils die nachgeschalteten Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Franchi et al., 2009; Kumar et al., 2011; Franchi et al., 2012).

Die strukturellen Unterschiede betreffend den N-Terminus bedingen grundlegend unterschiedliche Funktionen der NLRs. Einige NLRs wie NOD1 und NOD2 induzieren über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und über MAPK die Produktion von

proinflammatorischen Zytokinen. Viele PYD- und BIR-enhaltende NLRs scheinen hingegen diese Funktion nicht inne zu haben, sondern bilden stattdessen zusammen mit anderen Molekülen sogenannte Inflammasome (Schroder und Tschopp, 2010; Takeuchi und Akira, 2010; Kumar et al., 2011).

Inflammasome sind Multiproteinkomplexe, die nach ihrer Aktivierung die proteolytische Spaltung des Zymogens pro-Caspase-1 in die enzymatisch aktive Form der Caspase-1, einem Tetramer bestehend aus je zwei 10- und 20 kDa-Ketten, vermitteln (Schroder und Tschopp, 2010). Die aktive Form der Caspase-1 wiederum spaltet die Zymogene pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in die proinflammatorisch aktiven Formen IL-1 $\beta$  und IL-18 und ermöglicht deren Sekretion durch einen bislang noch unbekanntem Mechanismus (Franchi et al., 2009; Schroder und Tschopp, 2010; dos Santos et al., 2012). Hierbei fungieren die NLR- und nicht-NLR-haltigen Inflammasomkomponenten durch Oligomerisierung als Plattform, welche die räumliche Nähe verschiedener pro-Caspase-1-Moleküle herstellt, sodass es zur autoproteolytischen Spaltung und somit zu einer Selbstaktivierung der Cysteinproteasen kommen kann (Franchi et al., 2009; Schroder und Tschopp, 2010; Kumar et al., 2011).

Neben der Funktion als Regulator der Zytokinproduktion steuern Inflammasome über Caspase-1 auch eine Pyroptose genannte proinflammatorische Form des programmierten Zelltodes (Franchi et al., 2012).

Inflammasome bestehen in der Regel aus einem Mitglied der NLR- oder der PYHIN-Familie, dem Adaptermolekül *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) und pro-Caspase-1 (Schroder und Tschopp, 2010; Rathinam et al., 2012). Das NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)-Inflammasom setzt sich aus dem NLRP3-Protein, dem Adapterprotein ASC und der pro-Caspase-1 zusammen und wird neben PAMPs und DAMPs auch durch Fremdkörper oder verschiedene Kristalle aktiviert. Zu den Aktivatoren zählen neben PLY, Nigericin und ATP somit auch Asbest, Harnsäurekristalle und Aluminiumhydroxid. Der genaue Mechanismus, durch den das NLRP3-Inflammasom seine Aktivatoren erkennt, ist nach wie vor unklar, zumal es keine Beweise dafür gibt, dass NLRP3 seine Aktivatoren direkt bindet (Kumar et al., 2011; Wizenrath et al., 2011; Rathinam et al., 2012).

Bekannt ist, dass K<sup>+</sup>-Efflux, mitochondriale ROS und die Destabilisierung von Phagolysosomen durch die Aufnahme großer Partikel oder Kristalle zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen, wobei der K<sup>+</sup>-Efflux für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch alle bekannten Agonisten grundlegend erscheint (Rathinam et al.,

2012; Muñoz-Planillo et al., 2013). Neben seiner proinflammatorischen Rolle scheint das NLRP3-Inflammasom auch eine wichtige Rolle bei der Antikörperproduktion durch B-Zellen und der Aufrechterhaltung der epithelialen und endothelialen Barrieren der Lunge zu spielen (Kumar et al., 2011; Witzentrath et al., 2011).

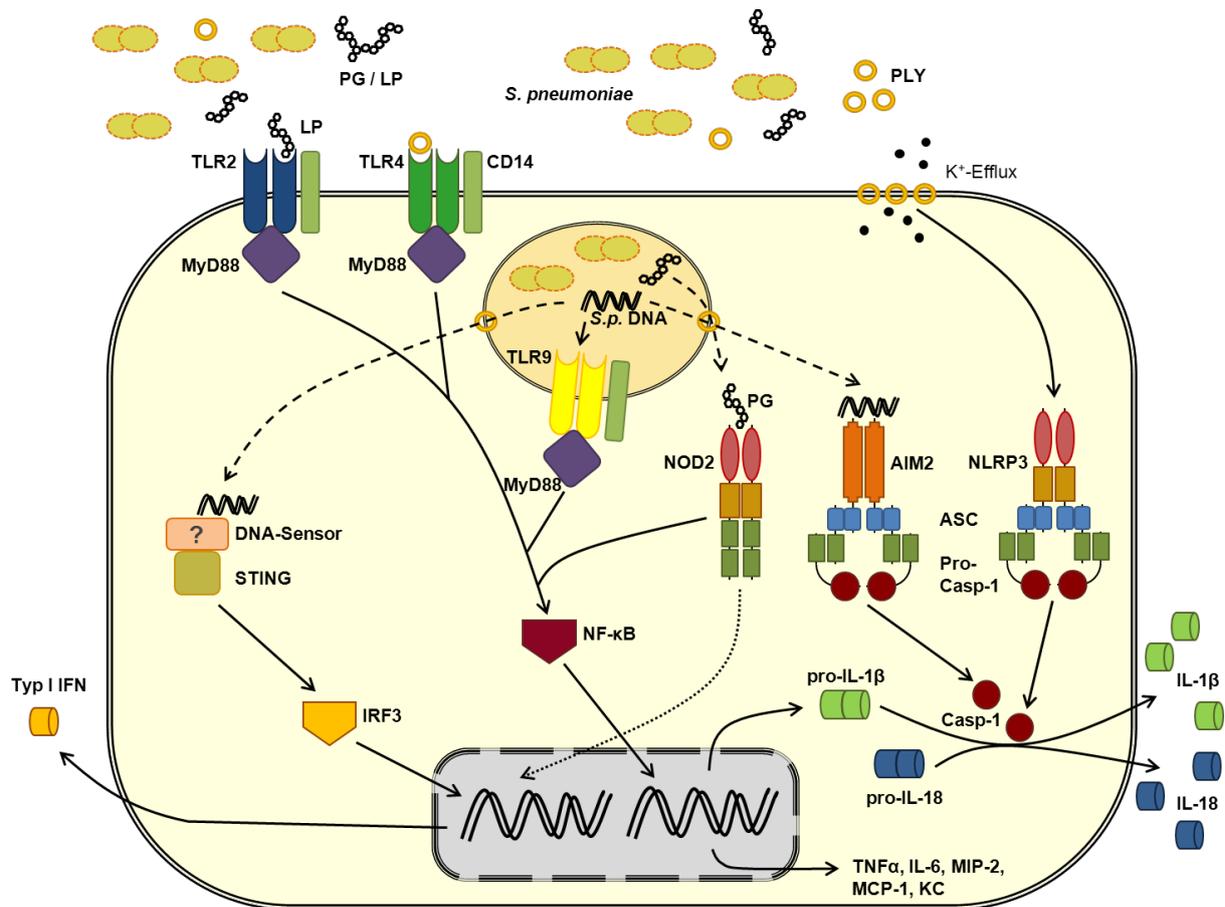
#### **1.4.2.3 RIG-I-like Receptors**

Die Familie der RLRs besteht aus den drei Mitgliedern RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) und dient der Erkennung viraler RNA (Takeuchi und Akira, 2010).

Die zytoplasmatisch lokalisierten RLRs bestehen aus N-terminalen CARDs für das nachgeschaltete Aktivieren von Signalwegen, welche jedoch bei LGP2 nicht vorhanden sind, einer DEAD box Helikase Domäne für die Ligandenbindung und –erkennung und einer C-terminalen regulatorischen Domäne (Takeuchi und Akira, 2010; Kumar et al., 2011).

Aktivierung der RLRs RIG-I, z. B. durch Influenzaviren, und MDA5 führt über das Adapterprotein MAVS zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- $\kappa$ B, die wiederum Typ I IFNs, proinflammatorische Zytokine sowie nachgeschaltet IFN-stimulierte Gene (ISGs) induzieren (Takeuchi und Akira, 2010; Kumar et al., 2011).

### 1.4.3 Die angeborene Immunantwort auf *S. pneumoniae*



**Abbildung 1:** Überblick über die verschiedenen PRRs, welche die Erkennung von *S. pneumoniae* vermitteln. Extrazelluläre Zellwandkomponenten wie z. B. Lipopeptide (LP), sowie möglicherweise PLY werden durch TLR2 bzw. TLR4 erkannt. Nach Phagozytose der Pneumokokken werden diese verdaut und wahrscheinlich bakterielle DNA und Peptidoglykan (PG) freigesetzt. Die freigesetzte DNA wird durch den endolysosomalen TLR9 erkannt oder gelangt PLY-abhängig ins Zytosol, wo sie das AIM2-Inflammasom und weitere DNA-Sensoren aktiviert. PGs gelangen ebenfalls PLY-abhängig ins Zytosol und aktivieren hier NOD2. Die TLRs und NOD2 führen MyD88-vermittelt zur Aktivierung von NF-κB, was die Induktion verschiedener Zytokine und Chemokine wie TNFα, IL-6, MIP-2, MCP-1, KC und pro-IL-1β auslöst. Die Freisetzung von IL-1β ist zusätzlich abhängig von der Aktivierung des AIM2- und NLRP3-Inflammasoms durch bakterielle DNA oder PLY-abhängigen K<sup>+</sup>-Efflux, woraufhin die so aktivierte Caspase-1 die Spaltung der Zymogene pro-IL-1β und pro-IL-18 in die reifen Zytokine IL-1β und IL-18 durchführt. Die Aktivierung eines noch unbekanntes zytosolischen DNA-Sensors führt über das Adapterprotein STING und die Aktivierung von IRF3 zur Freisetzung von Typ I IFN.

Das angeborene Immunsystem erkennt *S. pneumoniae* mittels verschiedener PRRs, zu denen TLRs, NLRs und zytosolische DNA-Sensoren zählen.

Lipoproteine (LP) der Zellwand der Pneumokokken werden durch TLR2, unmethylierte CpG-Motive enthaltende Pneumokokken-DNA durch endolysosomalen TLR9 und PLY

möglicherweise durch TLR4 erkannt. Diese TLRs veranlassen, zum Teil zusammen mit ihrem Korezeptor CD14, MyD88- und NF- $\kappa$ B-abhängig die Produktion von u. a. TNF $\alpha$ , pro-IL-1 $\beta$ , IL-6, KC und MIP-2. KC und MIP-2 stimulieren nachfolgend die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Lee et al., 2007; Dessing et al., 2008; Koppe et al., 2012b).

Nach Phagozytose der Bakterien durch Makrophagen, dem Verdau der Bakterien in Lysosomen und einer möglicherweise PLY-abhängigen Translokation von Peptidoglykanfragmenten in das Wirtszytosol wird zudem der NLR NOD2 aktiviert. NOD2 initiiert ebenfalls eine NF- $\kappa$ B-abhängige Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Opitz et al., 2004; Davis et al., 2011; Koppe et al., 2012b).

Der NLR NLRP3 und das PYHIN-Protein AIM2 sind ebenfalls an der Erkennung von *S. pneumoniae* beteiligt. PLY ist hierbei essentiell für die Caspase-1-abhängige Sekretion der aktiven Formen von IL-1 $\beta$  und IL-18 (McNeela et al., 2010; Fang et al., 2011; Witzenrath et al., 2011; Koppe et al., 2012b). Die PLY-abhängige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen und dendritischen Zellen ist wahrscheinlich abhängig von einem K<sup>+</sup>-Efflux aus der Zelle (Witzenrath et al., 2011). Der ebenfalls zytosolische Rezeptor AIM2 erkennt hingegen DNA der Pneumokokken, welche wahrscheinlich nach Phagozytose und lysosomalem Verdau der Bakterien sowie PLY-abhängigen Poren der Phagolysosomen ins Wirtszellzytosol gelangt (Fang et al., 2011).

Zusätzlich zur AIM2-abhängigen Detektion scheint Pneumokokken-DNA noch durch einen weiteren Erkennungsmechanismus detektiert zu werden. Dieser Mechanismus ist abhängig von einem noch unbekanntem zytosolischen PRR und dem Adaptermolekül STING (*stimulator of interferon genes*) und aktiviert über den Transkriptionsfaktor IRF3 die Produktion von Typ I IFNs. Auch diese zytosolische DNA-Erkennung ist abhängig von PLY und reguliert die Produktion verschiedener weiterer Entzündungsmediatoren (Fang et al., 2011; Koppe et al., 2012a, b).

*S. pneumoniae* aktiviert jedoch nicht nur PRRs, sondern führt auch zur antikörperabhängigen und –unabhängigen Aktivierung des Komplementsystems, was nachfolgend zur Lyse der Bakterien, zur Chemotaxis von Immunzellen, zur Phagozytose des Erregers und zur Differenzierung von B-Zellen des adaptiven Immunsystems führt (Ali et al., 2012).

Die Aktivierung der diversen PRRs und die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, TNF $\alpha$ , KC, MIP-2 oder MCP-1 sowie die Aktivierung des Komplementsystems bedingen die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie ortsansässiger Zellen wie Epithelien, regulieren das adaptive Immunsystem und führen so zur Abwehr der Pneumokokken. Die zur IL-1-Familie gehörigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 besitzen hierbei eine Schlüsselfunktion und spielen eine essentielle Rolle bei der Abwehr der Pneumokokkeninfektion (Opitz et al., 2010; Ali et al., 2012; Koppe et al., 2012b).



Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- $\kappa$ B bewirkt (Pichlmair et al., 2006; Mibayashi et al., 2007; Opitz et al., 2007).

Nach der Freisetzung viraler RNA in späten Endosomen wird diese hier auch durch PRRs der Familie der TLRs erkannt. Eine Rolle spielen hierbei TLR3 und TLR7/8, welche TRIF- bzw. MyD88-abhängige Signalkaskaden anstoßen, was letztendlich ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3 beiträgt (McGill et al., 2009; Kumar et al., 2011). NF- $\kappa$ B und IRF3 wiederum induzieren als Transkriptionsfaktoren im Zellkern die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie pro-IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha/\beta$  oder CCL2 bzw. der Typ I Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  (Stasakova et al., 2005; White et al., 2008; McGill et al., 2009). Die Aktivierung der verschiedenen TLRs scheint hierbei zellspezifisch zu sein. Konkret ist für TLR7 bekannt, dass er vor allem in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) nach Erkennung von ssRNA Typ I IFNs induziert. TLR3 hingegen agiert vor allem in respiratorischen Epithelzellen und trägt so zur Verteidigung gegen die Influenzaviren bei (White et al., 2008).

Durch Aktivierung des RIG-I/MAVS-Signalweges werden auch Typ III IFNs (IFN $\lambda$ ) induziert, welche über ihre Rezeptoren ähnlich Typ I IFNs ebenfalls zur Aktivierung von ISGs führen und vor allem in Lungenepithelzellen eine wichtige Rolle einzunehmen scheinen (Crotta et al., 2013).

Während die Zytokine und Chemokine weitere Immunzellen wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten aktivieren bzw. rekrutieren, welche u. a. apoptotische virusinfizierte Zellen phagozytieren können, führt die Sekretion der potenten antiviralen Typ I IFNs zum Erlangen eines antiviralen Status in angrenzenden Wirtszellen (White et al., 2008; McGill et al., 2009). Die Typ I Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  agieren mittels des IFN- $\alpha/\beta$  Rezeptors (IFNAR) und führen nach Bindung an ihren Rezeptor Janus-Kinasen (JAK)-abhängig zur Bildung von STAT1/STAT1-Homodimeren, die wiederum als Transkriptionsfaktoren im Zellkern an IFN-gamma-aktivierte Stellen (*IFN-gamma-activated-sites*, GAS) in Promoterregionen von IFN-stimulierten Genen (ISG) binden, oder zur Bildung von STAT1/STAT2-Heterodimeren, welche gemeinsam mit IRF9 an IFN-stimulierten Antwortelementen (*IFN-stimulated response elements*, ISRE) in Promoterregionen von ISGs binden (Decker et al., 2005). Die Aktivierung diverser ISGs führt zur Expression verschiedenster Genprodukte, die sich wiederum auf die Immunabwehr diverser Bakterien und Viren auswirken. Hierzu zählen z. B. Viperin, RANTES, IFN $\alpha$ , IRF9 und ISG15 (Fitzgerald, 2011; Koppe et al., 2012a; Durbin et al., 2013).

Die Inflenzaviren besitzen als wichtigen Virulenzfaktor und Mechanismus zur Immunevasion das nicht-strukturelle Protein 1 (*non-structural protein 1*, NS1), welches als potenter Antagonist der Typ I IFN-Produktion fungiert, indem der intrazelluläre Signalweg zur Induktion der IFNs inhibiert wird. So wurde lange geglaubt, dass dieser Antagonismus hauptsächlich von einer Interaktion des NS1-Proteins mit viraler dsRNA herrührt, jedoch scheint dies auch maßgeblich in einer Interaktion von NS1 mit TRIM25 (*tripartite motif-containing protein 25*) begründet. Die Interaktion von NS1 mit TRIM25 führt zu einer Inhibition der Ubiquitylierung von RIG-I und verhindert so unter anderem über die verminderte Bindung von MAVS die Aktivierung der RIG-I-abhängigen antiviralen Signalwege. Zusätzlich besitzt das NS1-Protein die Fähigkeit, die Expression und Reifung zellulärer mRNAs über verschiedene Mechanismen zu behindern (Wolff und Ludwig, 2009). Zudem wird die virusinduzierte Apoptose der infizierten Zelle verzögert (Stasakova et al., 2005).

Diese Inhibition von Typ I IFN durch das NS1-Protein wurde vor allem *in vitro* nachgewiesen. *In vivo* kommt es durch die Zelltyp-abhängige Antwort auf die Inflenzaviren z. B. durch pDCs auch durch Wildtyp-Viren zu einer IFN-Induktion, da diese hier durch TLR7 bedingt ist und somit die NS1-vermittelte Inhibition von RIG-I und der nachfolgenden IFN-Induktion nicht wie oben genannt greift (Jewell et al., 2007).

Die Erkennung von Inflenzaviren durch das Immunsystem aktiviert zudem Inflammasome, was zur Sekretion der für die Abwehr der Virusinfektion wichtigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 führt. Es konnte gezeigt werden, dass für die erfolgreiche Abwehr einer Inflenzainfektion zwar ASC, Caspase-1 und der Interleukin-Rezeptor IL-1R von Nöten sind, NLRP3 jedoch entbehrlich ist (Stasakova et al., 2005; Ichinohe et al., 2009). Dennoch ist bekannt, dass auch das NLRP3-Inflammasom durch die Inflenzainfektion aktiviert wird, wobei der protonenselektive M2-Ionenkanal des Virus diese Aktivierung zu verursachen scheint (Ichinohe et al., 2010). Neben NLRP3 scheint es somit möglicherweise ein weiteres ASC-abhängiges Inflammasom zu geben, welches die virusabhängige Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 steuert (Ichinohe et al., 2009).

Letztlich spielen auch natürliche Killerzellen (NK) als Lymphozyten des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Abwehr einer Inflenzainfektion. Sie

erkennen über ihre natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR) NKp44 und NKp46 die viralen Hämagglutinine auf infizierten Zellen wie dendritischen Zellen und werden hierdurch aktiviert, sodass sie ihr zytotoxisches Potential entfalten und inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  und IFN $\gamma$  produzieren können (White et al., 2008; McGill et al., 2009).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Bakterielle Superinfektionen kommen in einer relevanten Anzahl der (pandemischen) Influenzainfektionen vor. Dies betrifft vor allem Kinder und ältere Menschen, wobei die Superinfektionen als Hauptursache schwerer (evtl. hospitalisierungs- oder sogar intensivpflichtiger) Krankheitsverläufe gelten, die nicht selten letal enden. Einer der häufigsten Erreger dieser Superinfektion im Verlauf oder als Folge einer bereits weitestgehend überstandenen Grippeerkrankung ist das grampositive Bakterium *S. pneumoniae* (Chertow und Memoli, 2013; Smith et al., 2013).

Die Mechanismen, welche die erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Superinfektionen bedingen, sind bislang noch unvollständig verstanden und umfassen wahrscheinlich verschiedene Einflüsse des Virus auf den Wirtsorganismus sowie das antibakterielle Abwehrsystem (Tian et al., 2012). Arbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie anderer Forschungsgruppen konnten zeigen, dass Inflammasome eine wichtige Rolle in der Abwehr der Pneumokokkeninfektion spielen (McNeela et al., 2010; Fang et al., 2011; Witznath et al., 2011; Koppe et al., 2012b).

Aufbauend auf diesen Überlegungen sollte die Hypothese getestet werden, dass eine Influenza A-Virusinfektion die Inflammasomantwort auf eine Pneumokokkeninfektion inhibiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, ein besseres Verständnis über die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung der postinfluenza-Pneumokokkeninfektion zu erhalten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Erreger**

#### **2.1.1 Kultur von *S. pneumoniae***

Die Zellen in den hier gezeigten *in vitro*-Experimenten wurden mit *S. pneumoniae* Serotyp 2 Stamm D39 infiziert. Die Bakterien wurden bei -80°C in THY-Nährbouillon (30 g/l Todd-Hewitt Bouillon mit 5 g/l Hefeextrakt) mit 10% Glycerin gelagert.

Vor den Infektionsversuchen wurden die Pneumokokken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut kultiviert. Nach der veranschlagten Zeit von 12 – 15 h nach dem Ausstreichen der Bakterien auf den Agarplatten wurden Einzelkolonien bis zu einer OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge) von 0,03 – 0,06 in THY-Bouillon überführt. Eine OD<sub>600</sub> von 1,0 entspricht dabei 10<sup>9</sup> KBE/ml. Die Flüssigkultur wurde sodann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 2,5 – 3,5 h inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,4 erreichte, was der Phase des logarithmischen Wachstums entspricht. Die Bakterien wurden nach Erreichen dieser Phase bei 2700 g zentrifugiert, um sie zu pelletieren. Nachdem das Pellet in blankem RPMI 1640 Medium resuspendiert wurde, konnten die jeweilig vorgesehenen Verdünnungen vorbereitet und die Zellen mit den Bakterien infiziert werden. Für mRNA-Expressionsanalysen und Messungen der Proteinkonzentrationen im Zellkulturüberstand wurden die Zellen für 7 – 16 h infiziert.

#### **2.1.2 Influenza A-Virus**

In den hier gezeigten Superinfektionsversuchen wurden Virusmutanten des Influenza A-Virus (Stamm A/Puerto Rico/8/1934 H1N1) mit fehlendem (dNS1) bzw. trunkiertem NS1-Protein (NS1-125) eingesetzt. Diese Viren wurden uns freundlicherweise von Dr. Thorsten Wolff (Robert-Koch-Institut, Berlin) bereitgestellt. Die in Hühnereiern kultivierten Viren wurden bei -80°C gelagert.

## **2.2 Mäuse**

Die verwendeten murinen Wildtyp-, IFN A-Rezeptor-Knockout (IFNAR<sup>-/-</sup>)- und NO-Synthase-Knockout (iNOS<sup>-/-</sup>)-Mauslinien waren allesamt auf C57BL/6-Hintergrund. Die Mäuse für die Isolation von Knochenmarkszellen der IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden von Dr. Uwe Klemm (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) bereitgestellt. Die Knochen zur Isolation von iNOS<sup>-/-</sup>-Zellen stammen von Dr. Stephen Reece und Alexis Vogelzang (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin).

## **2.3 Kultur von murinen Zellen**

### **2.3.1 Kultur von murinen Fibroblasten**

Murine L929-Fibroblasten wurden zur Produktion von Monozytenkolonien-stimulierendem Faktor (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 + 10% FCS + 4,5 mM L-Glutamin in T175-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen zehn Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das nun M-CSF-haltige Medium steril-filtriert und bis zur Verwendung in 50 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

### **2.3.2 Isolation und Kultur von murinen aus Knochenmarkszellen differenzierten Makrophagen**

Humerus, Femur und Tibia getöteter Wildtyp- bzw. Knockout-Mäuse wurden herauspräpariert und je einmal in 70% Ethanol und RPMI 1640 Medium gewaschen. Nach dem Überführen in 20 ml frisches RPMI 1640 wurden die Knochen in einem sterilen Mörser aufgebrochen. Die entstandene Zellsuspension mit Knochenstücken wurde durch einen 70 µm-Zellfilter gelassen und anschließend 10 min bei 150 g zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde sodann in FCS mit 10% DMSO resuspendiert, zu  $10^7$  Zellen/ml aliquotiert und in einem Einfrierbehälter schrittweise bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Um die aus Knochenmarkzellen differenzierten Makrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMMs) zu kultivieren, wurden einzelne Aliquots aufgetaut und in „*BMM Growth Medium*“ (RPMI 1640 + 20% FCS + 30% L929 Fibroblasten-Überstand (siehe 2.3.1) + 4,5 mM L-Glutamin + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) überführt. Nach dem Zentrifugieren und Pelletieren der Zellen bei 230 g für 10 min wurden die Zellen in 20 ml frischem *BMM Growth Medium* resuspendiert und auf zwei Optilux-Petrischalen aufgeteilt. Nach vier Tagen wurden jeweils 10 ml frisches *BMM Growth Medium* hinzugefügt. Konfluenz erreichten die Zellen nach 7 – 10 Tagen.

Um die Zellen auf Zellkulturplatten auszusäen, wurden sie in kaltem PBS mit 2 mM EDTA von der Petrischale abgeschabt, in „*BMM Replating Medium*“ (RPMI 1640 + 10% FCS + 15% L929 Fibroblasten-Überstand + 4,5 mM L-Glutamin) gewaschen und nach erneutem Resuspendieren in *BMM Replating Medium* bei einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in die Vertiefungen von Zellkulturplatten ausgesät. Nach Inkubation von mindestens 1 h oder über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  konnten die Zellen für die Experimente verwendet werden.

## **2.4 Molekularbiologie**

### **2.4.1 RNA-Aufreinigung**

Die RNA-Aufreinigung erfolgte mittels des „PerfectPure™ RNA Cultured Cell Kit“ (5Prime) nach dem Protokoll des Anbieters einschließlich des Verdauens der genomischen DNA. Zur Isolation der RNA wurden die Zellkulturüberstände entfernt und 400 µl Lysepuffer (*Lysis solution*) zu den Zellen hinzugegeben. Bis zur Aufreinigung der RNA wurden die Zelllysate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zu Beginn der Aufreinigung wurden die Lysate auf- und abpipettiert, um alle Zellen vom Boden zu lösen und vollständig zu lysieren, bevor die Aufreinigungssäulchen mit den Lysaten beladen wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16000 g und Raumtemperatur für 1 min, nach welchem die Säulchen mit 400 µl Waschlösung 1 (*Wash 1 solution*) beladen und bei 16000 g

gewaschen wurden. Die Aufreinigungssäulchen wurden nun in ein neues Sammelröhrchen überführt. In der Zwischenzeit wurde die lyophilisierte DNase mit 2,6 ml DNase-Puffer (*DNase buffer solution*) angesetzt und auf Eis gelagert. Pro Säulchen wurden 50 µl DNase hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurden 200 µl DNase-Waschlösung (*DNase wash solution*) hinzugegeben und 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Mit weiteren 200 µl DNase-Waschlösung wurde nochmals für 2 min zentrifugiert. Nach dem Überführen der Aufreinigungssäulchen in neue Sammelröhrchen wurde zum Waschen mit 200 µl Waschlösung 2 (*Wash 2 solution*) erst 1 min und mit weiteren 200 µl Waschlösung 2 nochmals 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Nachdem die Säulchen ein letztes Mal in neue Sammelröhrchen überführt wurden, wurde mit 50 µl Elutionslösung (*Elution solution*) wiederum 1 min bei 16000 g zentrifugiert. 10 µl RNA wurden für die Transkription zu cDNA verwendet, die restliche RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### **2.4.2 Transkription von aufgereinigter RNA zu cDNA**

Das Umschreiben von RNA zu cDNA erfolgte mittels des „High Capacity Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems). Ein Mastermix aus 4,2 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl „Reverse Transcription buffer“, 2 µl „Random Primers“, 0,8 µl dNTPs und 1 µl „Reverse Transcriptase“ pro Reaktion wurde vorbereitet und 10 µl Mastermix wurden mit 10 µl der einzelnen Proben auf dem Schüttelmixer vermischt und anschließend auf den Boden des Reaktionsgefäßes herunterzentrifugiert.

Die Röhrchen wurden für die Reaktion für 10 min bei 25°C, dann für 2 h bei 37°C und abschließend für 5 s bei 85°C im Thermocycler inkubiert. Nach dem Umschreiben wurden die einzelnen Proben jeweils 1:5 mit 80 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die cDNA bei -20°C gelagert.

#### **2.4.3 Quantitative *real time*-PCR**

Die relative mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative real time-PCR*, qRT-PCR) ermittelt. Die gewonnene cDNA (siehe 2.4.2) wurde auf Eis aufgetaut. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix aus pro Ansatz 12,5 µl „Gene

Expression Master Mix“ (10-fach konzentriert), 1,25 µl „Taqman Assay“ (selbst designed oder über Applied Biosystems bezogen, 20-fach konzentriert) und 6,25 µl ddH<sub>2</sub>O hergestellt, von welchem jeweils 20 µl mit 5 µl der jeweiligen Proben-cDNA pro Vertiefung der Platte vermischt wurden. Zur Normalisierung der Daten wurde GAPDH als interne Referenz mitgeführt. Die Konzentration der Oligonukleotide in den *Taqman* Assays betrug 18 nmol/ml für die *Forward*- und *Reverse*-Primer und 5 nmol/ml für die Sonden. Die *Annealing*-Temperatur aller Assays lag bei 60°C.

**Tabelle 2: Primer für die qRT-PCR**

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Sonde (5'-Fam-TAMRA-3')</b>
<i>GAPDH</i>	TGTGTCCGTCGTG GATCTGA	CCTGCTTCACCAC CTTCTTGA	CCGCCTGGAGAAACCTG CCAAGTATG
<i>IFN<math>\beta</math></i>	AGAAAGGACGAAC ATTCGGAAA	TCCGTCATCTCCA TAGGGATCTT	ATGGAAAGATCAACCTCA CCTACAGGGCG
<i>Caspase-1</i>	GGGACCTATGTGA TCATGTCTCTAAA	GCTGATGGAGCTG ATTGAAGCT	AAGGGCCCCAGGCAAGC CAA
<i>ASC</i>	TGACAGTGCAACT GCGAGAAG	TGAGATCTATGGC GTCCATCTG	CTATGGGCGCATCCCAC GCG
<b>Applied Biosystems Assay-ID</b>			
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Mm00434228_m1		
<i>IL-18</i>	Mm00434225_m1		
<i>Nlrp3</i>	Mm00840904_m1		
<i>Aim2</i>	Mm01295719_m1		
<i>Pstpip1</i>	Mm00803222_m1		
<i>Pop1</i>	Mm01137543_m1		
<i>Serpina1a</i>	Mm02748447_g1		
<i>Mfge8</i>	Mm00500549_m1		
<i>Birc2</i>	Mm00431811_m1		
<i>Birc3</i>	Mm01168413_m1		

#### 2.4.4 ELISA

Die Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-18 und TNF $\alpha$  im Zellkulturüberstand wurden mittels Sandwich-ELISA bestimmt. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  wurden mit den von eBioscience kommerziell erhältlichen „Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!“<sup>®</sup> und „Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!“<sup>®</sup> den Anleitungen des Herstellers folgend bestimmt.

Für den IL-18 ELISA wurden 96-well-ELISA-Platten über Nacht bei 4°C mit 0,5  $\mu$ g/ml „Anti-IL-18 (Mouse) mAb“ (MBL International) beschichtet und nachfolgend mit PBS mit 0,5% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde mit 3% BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und im Anschluss wiederum gewaschen. In der Zwischenzeit wurde eine Standardkurve von 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml mit „Recombinant Mouse IL-18“ (MBL International) in 1% BSA in PBS vorbereitet und zusammen mit den Proben aufgetragen. Nach 2 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut gewaschen und der Detektionsantikörper „Anti-IL-18 (Mouse) mAb-Biotin“ 1:4000 in 1% BSA in PBS verdünnt aufgetragen. Nach weiteren 2 h Inkubation mit anschließendem Waschschrift wurde für 20 min mit 1:250 in 1% BSA in PBS verdünnter „Avidin HRP“ (eBioscience) inkubiert und erneut gründlich gewaschen. Nach Inkubation mit „TMB Substrate Reagent“ (BD Biosciences) wurde die Farbreaktion mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm Wellenlänge (mit Korrektur bei 540 nm) bestimmt.

## 2.5 Zellbiologie

### 2.5.1 Inhibitoren/Stimulatoren

Die BMMs wurden entsprechend der Indikation 12 oder 20 h vor der Infektion mit IFN $\beta$  (5, 50, 100 oder 500 U/ml), IFN $\gamma$  (100 U/ml), poly I:C (0,0025, 0,025, 0,1 oder 0,25  $\mu$ g/ml), Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (50 ng/ml) oder L-N<sup>G</sup>-Monomethylarginin (L-NMMA; 1 mM) behandelt. LY294002 (25  $\mu$ M) wurde bei Gebrauch sowohl 30 min vor der Infektion als auch während der Infektion eingesetzt. Die Stimulation mit Nigericin (5  $\mu$ M) erfolgte für 60 min.

## 2.5.2 Infektionen

### 2.5.2.1 Infektion mit *S. pneumoniae*

Es wurden verschiedene MOI bei der Infektion mit Pneumokokken eingesetzt (0,025 und 2,5). Nach der bereits beschriebenen Vorbereitung (siehe 2.1.1) der kultivierten Pneumokokken wurden diese in RPMI 1640 entsprechend verdünnt und die Zellen mit ihnen entweder in RPMI 1640 oder bei Vorinfektion mit Influenza A-Virus in „*Flu Medium*“ (RPMI + 0,2% BSA + 1% L-Glutamin) infiziert und daraufhin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 h (RNA-Expression) oder 16 h (ELISA und RNA-Expression) inkubiert.

### 2.5.2.2 Infektion mit Influenza A-Virus

Für die Infektion mit Influenza A-Virus wurden die bei -80°C gelagerten Viren auf Eis aufgetaut und die am Vorabend ausgesäten Zellen mit PBS gewaschen. Die Viren wurden in PBS<sup>+/+</sup> + 0,2% BSA verdünnt und die Zellen wurden mit 1 und 8 MOI Viren bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45 min wurden die Zellen mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen, *Flu Medium* zu den Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 h bis zur Superinfektion mit *S. pneumoniae* inkubiert.

## 2.6 Statistische Analyse

Die Daten wurden mittels der Statistiksoftware GraphPad Prism, Version 4.02, ausgewertet. Die Normalverteilung der Proben wurde mit dem „*D’Agostino and Pearson Omnibus Normality*“-Test getestet. Normal verteilte Proben wurden mittels ANOVA mit nachfolgendem „*Bonferroni post-hoc*“-Test analysiert. Die Analyse nicht normal verteilter Proben erfolgte mit dem „*Kruskal-Wallis*“-Test mit nachfolgendem „*Dunn’s post-hoc*“-Test. Statistische Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach Grubbs ermittelt und aus der statistischen Analyse ausgeschlossen.

In den Grafiken dargestellt sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler. Statistische Signifikanzen sind folgendermaßen dargestellt: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## 2.7 Reagenzien und Geräte

**Tabelle 3: Reagenzien (alphabetisch)**

Anti-IL-18 (Mouse) mAb	MBL International
Anti-IL-18 (Mouse) mAb-Biotin	MBL International
Avidin HRP	eBioscience
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences
BSA (Albumin, from bovine serum)	Sigma Aldrich
Columbia Agar + 5% Schafblut	BD Biosciences
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich
EDTA	Fluka (Sigma Aldrich)
Ethanol	J.T. Baker
FCS (Fetal Bovine Serum Gold)	PAA
Glycerin	Merck
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 96%	Roth
L-Glutamin (GlutaMAX)	gibco (Life Technologies)
L-NMMA	Cayman Chemical
LY294002	InvivoGen
mIFN $\beta$	PBL interferon source
mIFN $\gamma$	ImmunoTools
Nigericin (Sodium Salt)	Calbiochem (Merck)
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	EML microcollections GmbH
PBS (Dulbecco's PBS, steril)	PAA
PBS (PBS Dulbecco, unsteril)	Biochrom AG
PBS <sup>+/+</sup> (Dulbecco's PBS +Ca +Mg, steril)	gibco (Life Technologies)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Poly I:C	Invitrogen
qPCR Primer/Sonden (selbst designed)	metabion
Recombinant Mouse IL-18	MBL International
RPMI 1640	gibco (Life Technologies)
TMB Substrate Reagent	BD Biosciences
Todd Hewitt Broth	Sigma Aldrich

Tween 20

Sigma Aldrich

**Tabelle 4: Kits**

Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Ready-SET-Go!®

eBioscience

Mouse TNF $\alpha$  ELISA Ready-SET-Go!®

eBioscience

Gene Expression Master Mix

Applied Biosystems

High Capacity Reverse Transcription Kit

Applied Biosystems

PerfectPure RNA Cultured Cell Kit

5Prime

Taqman gene expression assays

Applied Biosystems

**Tabelle 5: Geräte und Sonstiges (alphabetisch)**

7300 Real Time PCR System

Applied Biosystems

BioPhotometer

Eppendorf

ELISA-Platten (Maxisorp)

Nunc (Thermo Scientific)

ELISA-Plattenleser MR5000

Dynatech

Küvetten (Polystyrol)

Sarstedt

Mikroskop IMT-2

Olympus

non-tissue culture treated dishes Optilux

BD Biosciences

Sprout Minizentrifuge

Biozym

Sterilfilter (Rapid-Flow Filter Unit 0,2 $\mu$ m)

Nalgene (Thermo Scientific)

T175 Zellkulturflaschen

BD Biosciences

Thermocycler PTC-200

MJ Research

Vortexmischer VV3

VWR

Zellfilter (Cell Strainer, 70 $\mu$ m)

BD Biosciences

Zellkulturplatten (Tissue culture plates)

BD Biosciences

Zellschaber (Cell Scraper, 25 cm)

Sarstedt

Zentrifuge 5417R

Eppendorf

Zentrifuge ROTANTA 460R

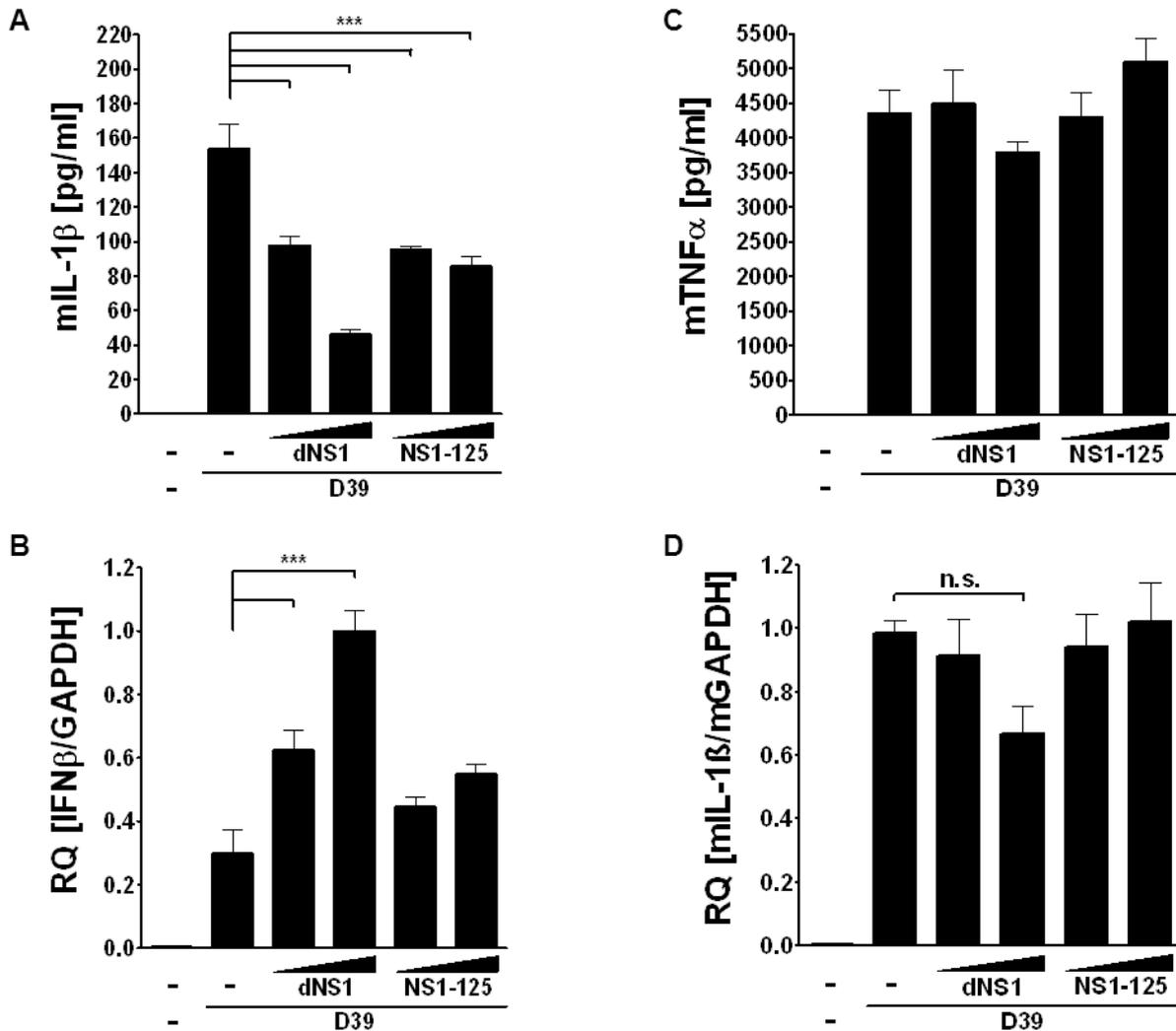
Hettich (Thermo Scientific)

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Vorherige Infektion mit Influenza A-Virus inhibiert die Sekretion von IL-1 $\beta$ nach *S. pneumoniae*-Infektion**

Aufbauend auf den oben aufgeführten Überlegungen, dass eine (abklingende) Influenza-Infektion einen wichtigen Risikofaktor für eine schwere Pneumokokken-Pneumonie darstellt (Chertow und Memoli, 2013), dass die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind und dass Inflammasome zentral an der antibakteriellen Abwehr gegen die Pneumokokken beteiligt sind (Koppe et al., 2012b; Tian et al., 2012), wurde im Folgenden im Zellkulturmodell untersucht, ob Influenza A-Viren die Inflammasom-Antwort auf Pneumokokken beeinflussen.

BMMs wurden mit *S. pneumoniae* (D39) koinfiziert, nachdem sie 7 h zuvor mit den Influenza A-Virusmutanten  $\Delta$ NS1 und NS1-125 in verschiedenen Dosen vorinfiziert worden waren. Die hierbei verwendeten Virusmutanten mit fehlendem bzw. verkürztem NS1-Protein fanden aus der Hypothese heraus ihre Verwendung, dass Typ I IFNs bei der Interaktion zwischen der Influenzainfektion und der verminderten Abwehrfähigkeit gegen Pneumokokken eine zentrale Rolle spielen. Das NS1-Protein führt jedoch bekannterweise *in vitro* zu einer starken Restriktion der Induktion von Typ I IFN (Geiss et al., 2002), was vor allem in den ersten 48 h der Infektion eine Rolle spielt (Li et al., 2012), sodass für eine suffiziente IFN-Antwort Mutanten ohne ein funktionelles inhibitorisches NS1-Protein eingesetzt wurden.



**Abbildung 3:** Influenza A-Infektion reduziert die Sekretion von IL-1 $\beta$  als Antwort auf eine nachfolgende Infektion mit *S. pneumoniae*. Wildtyp-BMMs wurden 7 h nach Infektion mit Influenza A-Virusmutanten (dNS1, NS1-125; MOI 1 und 8) mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 2,5) koinfiziert. Nach 16 h wurden mittels ELISA die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Zellkulturüberstand (A, C) und per qRT-PCR die mRNA-Level von IFN $\beta$  und pro-IL-1 $\beta$  in den Zelllysaten (B, D) bestimmt. Die gezeigten Daten wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen in Triplikaten erhoben und wie beschrieben statistisch analysiert.

Die Infektion mit *S. pneumoniae* allein führte zur Sekretion von IL-1 $\beta$  durch die BMMs. War jedoch zuvor mit Influenza A-Virus infiziert worden, so zeigte sich eine Reduktion des sekretierten IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand (Abb. 3A). Dieser inhibitorische Effekt auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion nach *S. pneumoniae*-Infektion durch Influenza A wies vor allem bei Infektion mit der Virusmutante dNS1 eine Dosisabhängigkeit auf, wobei sich nach höherer Influenza-Infektionsdosis weniger IL-1 $\beta$  im Überstand messen ließ (Abb. 3A). Die Untersuchung der Genexpression von IFN $\beta$  auf mRNA-Ebene ergab, dass die Infektion mit *S. pneumoniae* eine Induktion von IFN $\beta$  stimulierte und dass die vorherige

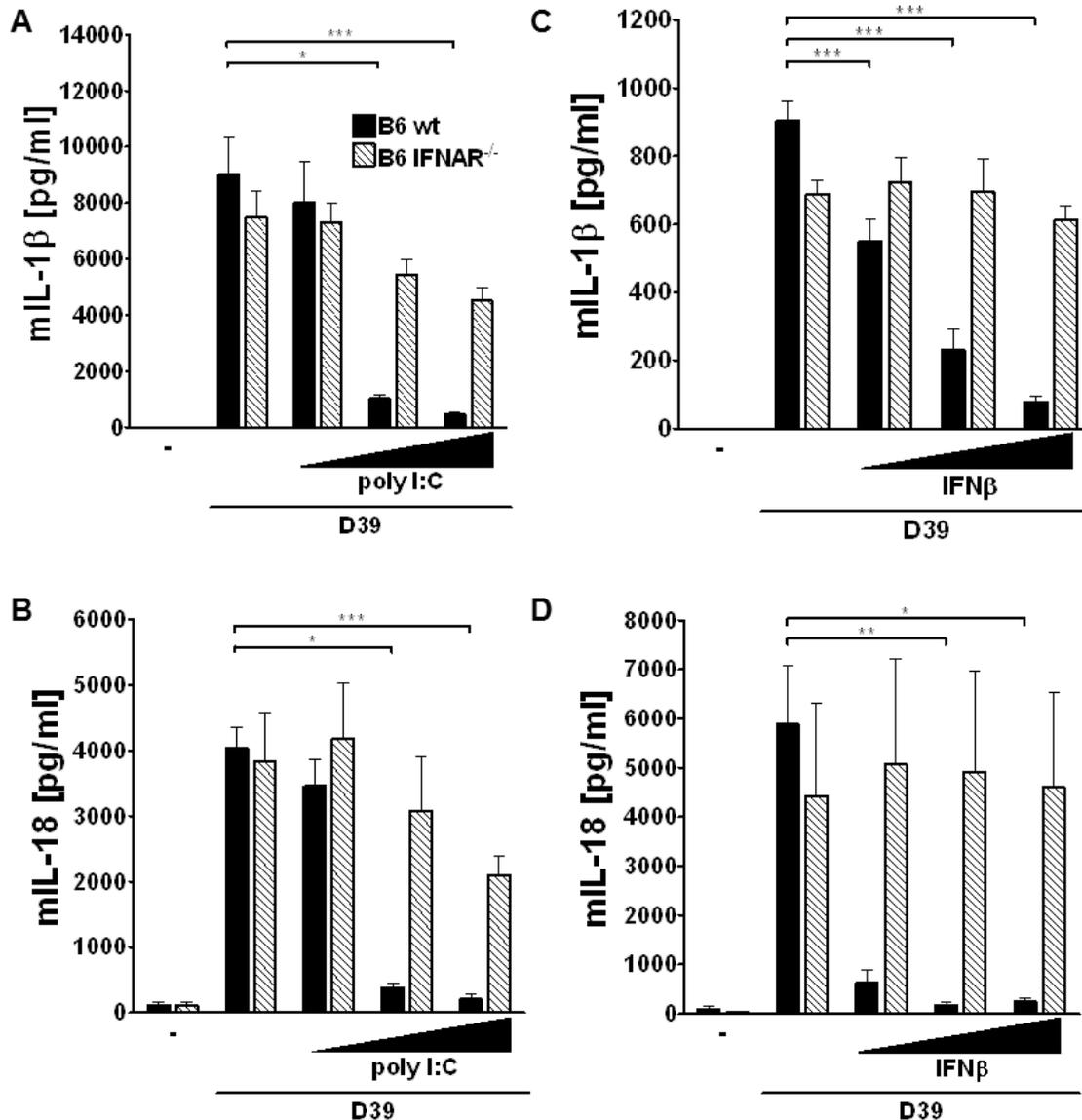
Infektion mit Influenza A-Virusmutanten und Pneumokokken diese IFN $\beta$ -Induktion verstärkte (Abb. 3B). Auch hier war eine Abhängigkeit von der Infektionsdosis der Influenzainfektion erkennbar. Im Vergleich der Abbildungen 3A und 3B deutet sich an, dass die Induktion von IFN $\beta$  negativ mit der Produktion von IL-1 $\beta$  zu korrelieren scheint (Abb. 3A, B).

Die Untersuchung der Konzentration des Zytokins TNF $\alpha$  im Zellüberstand unter denselben Voraussetzungen erbrachte, dass es auch hier durch Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer Produktion des Zytokins kam (Abb. 3C). Die vorausgehende Infektion mit Influenza A-Viren hatte jedoch keinen Einfluss auf die durch *S. pneumoniae* stimulierte TNF $\alpha$ -Produktion (Abb. 3C).

Die Produktion von IL-1 $\beta$  ist abhängig von der Transkription von pro-IL-1 $\beta$  und der nachfolgenden Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  in reifes IL-1 $\beta$  (Schroder und Tschopp, 2010). Um zu klären, ob die eingeschränkte Produktion von pro-IL-1 $\beta$  für den inhibitorischen Effekt der Influenza-Infektion auf die Sekretion von IL-1 $\beta$  verantwortlich ist, wurde die Genexpression von (pro-) IL-1 $\beta$  untersucht. Infektion mit *S. pneumoniae* allein führte zur Induktion von pro-IL-1 $\beta$ -mRNA. Die vorherige Infektion mit Influenza A-Viren hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die durch *S. pneumoniae* induzierte pro-IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression (Abb. 3D).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine vorherige Infektion mit Typ I IFN-stimulierenden Influenza A-Viren zwar die IL-1 $\beta$ -Produktion, nicht jedoch die Expression von pro-IL-1 $\beta$  in Makrophagen inhibiert, die durch eine nachfolgende Pneumokokkeninfektion stimuliert wird.

### 3.2 Vorherige Stimulation von BMMs mit poly I:C oder IFN $\beta$ inhibiert die Sekretion von IL-1 $\beta$ und IL-18 nach Infektion mit *S. pneumoniae* in Abhängigkeit von IFNAR



**Abbildung 4:** poly I:C und IFN $\beta$  inhibieren die durch Pneumokokken aktivierte IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion. Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs wurden über Nacht mit poly I:C (2,5, 25, 250 ng/ml; A, B) oder IFN $\beta$  (5, 50, 500 U/ml; C, D) stimuliert und nachfolgend mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 0,025) infiziert. Nach 16 h wurden mittels ELISA die Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$  (A, C) und IL-18 (B, D) in den Zellüberständen bestimmt. Die gezeigten Daten wurden jeweils in drei voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten erhoben und wie oben beschrieben statistisch untersucht.

Um eine Beeinflussung des Inflammasoms durch Erkennung viraler RNA und Produktion von Typ I IFN zu testen, wurden das dsRNA-Analogon poly I:C und das Typ I Interferon IFN $\beta$  direkt anstelle der Vorinfektion mit Influenza getestet.

Zuerst wurden Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs über Nacht mit verschiedenen Dosen poly I:C stimuliert und am darauffolgenden Tag mit *S. pneumoniae* (D39) infiziert (Abb. 4A, B). Die *S. pneumoniae*-Infektion führte sowohl in Wildtyp- als auch in IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs in vergleichbaren Maßen zur Sekretion von IL-1 $\beta$ . Wurden die BMMs jedoch zuvor mit poly I:C stimuliert, so führte diese Stimulation bei den Wildtyp-Zellen dosisabhängig zur Verminderung des ausgeschütteten IL-1 $\beta$  (Abb. 4A). Im Gegensatz dazu hatte poly I:C keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die durch Pneumokokken aktivierte IL-1 $\beta$ -Ausschüttung in IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs.

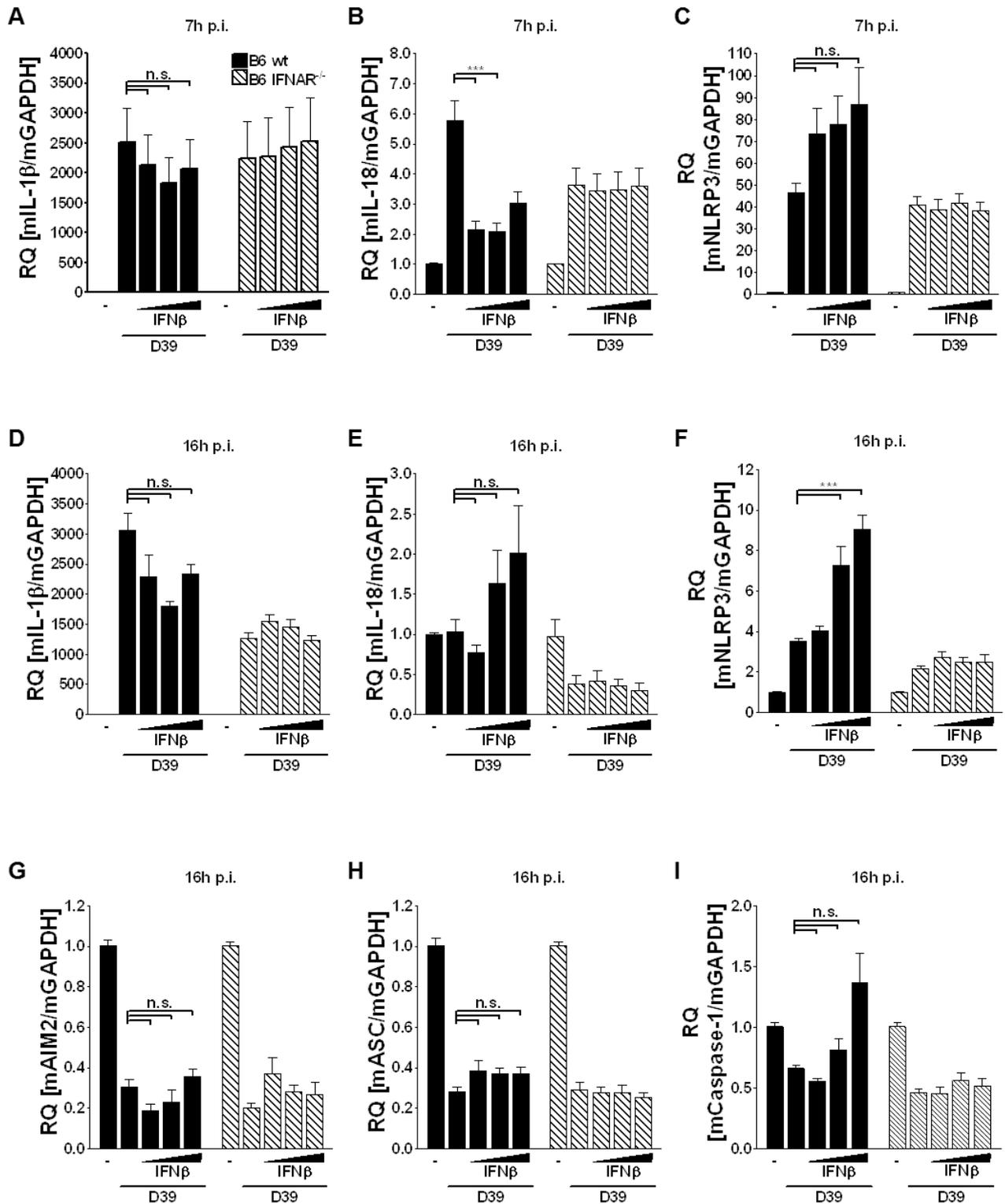
Die Analyse von IL-18 im Zellkulturüberstand der mit poly I:C behandelten und nachfolgend mit *S. pneumoniae* infizierten BMMs zeigt einen ähnlichen Effekt. *S. pneumoniae* allein vermag in beiden Zelltypen die IL-18-Produktion zu induzieren (Abb. 4B), die Vorstimulation mit poly I:C jedoch bewirkt in den Wildtyp-, nicht jedoch in IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs vor allem in höheren Dosen eine fast vollständige Hemmung der bakteriell stimulierten IL-18-Produktion (Abb. 4B).

Nach Vorstimulation von Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs mit IFN $\beta$  vor der jeweiligen Infektion mit *S. pneumoniae* zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der oben beschriebenen Vorstimulation mit poly I:C. In den Wildtyp-BMMs kommt es abhängig von der eingesetzten Dosis an IFN $\beta$  zu einer starken Verminderung sowohl des ausgeschütteten IL-1 $\beta$  (Abb. 4C) als auch des ausgeschütteten IL-18 (Abb. 4D). Wie zu erwarten hatte IFN $\beta$  keinen hemmenden Effekt auf die pneumokokkeninduzierte Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-18 in IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs.

Insgesamt ergibt sich somit, dass das virale RNA-Analogon poly I:C über die Stimulation einer Typ I IFN-Produktion und in Abhängigkeit des Interferonrezeptors IFNAR die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 in durch Pneumokokken infizierten Makrophagen reduziert.

### **3.3 Einfluss von IFN $\beta$ auf die Genexpression von IL-1 $\beta$ , IL-18, Caspase-1, ASC, NLRP3 und AIM2 in *S. pneumoniae*-infizierten Makrophagen**

Ein möglicher Mechanismus, mit dem Influenza A-Viren bzw. IFN $\beta$  die durch Pneumokokken aktivierte Produktion der inflammasomabhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 hemmen könnten, wäre die Hemmung der Expression der Zytokinproformen oder von Komponenten der NLRP3- oder AIM2-Inflammasome. Um zu testen, ob dieser Mechanismus eine Rolle spielt, wurden die Genexpressionen einzelner NLRP3- und AIM2-Inflammasombestandteile sowie von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs, welche zuerst mit IFN $\beta$  vorbehandelt und nachfolgend mit *S. pneumoniae* (D39) infiziert worden waren, mittels qRT-PCR untersucht.



**Abbildung 5:** Die Expression von NLRP3- und AIM2-Inflammasomkomponenten wird kaum durch IFNβ beeinflusst. Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs wurden über Nacht mit IFNβ (5, 50, 500 U/ml) stimuliert und nachfolgend mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 0,025) infiziert. Nach 7 h (A-C) bzw. 16 h (D-I) wurden mittels qRT-PCR die relativen Genexpressionen der Zytokine bzw. Inflammasombestandteile pro-IL-1β (A, D), pro-IL-18 (B, E), NLRP3 (C, F), AIM2 (G), ASC (H) und Caspase-1 (I) in den Zelllysaten untersucht. Die hier gezeigten Daten wurden in Triplikaten in drei unabhängigen Versuchen erhoben und wie beschrieben statistisch analysiert.

Die Infektion mit *S. pneumoniae* allein bedingte sowohl nach 7 h als auch noch nach 16 h *post infectionem* (p. i.) eine Induktion der Expression von pro-IL-1 $\beta$ -mRNA in Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs (Abb. 5A, D). Fand die Infektion nach Stimulation mit IFN $\beta$  statt, ließ sich in der Wildtyp-Gruppe zwar eine leichte Reduktion der pro-IL-1 $\beta$ -Expression beobachten, jedoch war diese nicht abhängig von der Dosis des IFN $\beta$  und statistisch nicht signifikant. Die pro-IL-18-mRNA-Expression war im Vergleich zu unbehandelten Zellen 7 h p. i. mit *S. pneumoniae* erhöht. 16 h nach Infektion war diese Induktion nicht mehr zu beobachten (Abb. 5B, E). Die durch *S. pneumoniae* ausgelöste Steigerung der pro-IL-18-Genexpression 7 h p. i. in Wildtyp-BMMs wurde durch Vorstimulation mit IFN $\beta$  reduziert (Abb. 5B). 16 h p. i. kam es durch Vorstimulation mit IFN $\beta$  jedoch eher zu einer Steigerung der durch die Pneumokokkeninfektion induzierten pro-IL-18-Expression, wobei dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 5E).

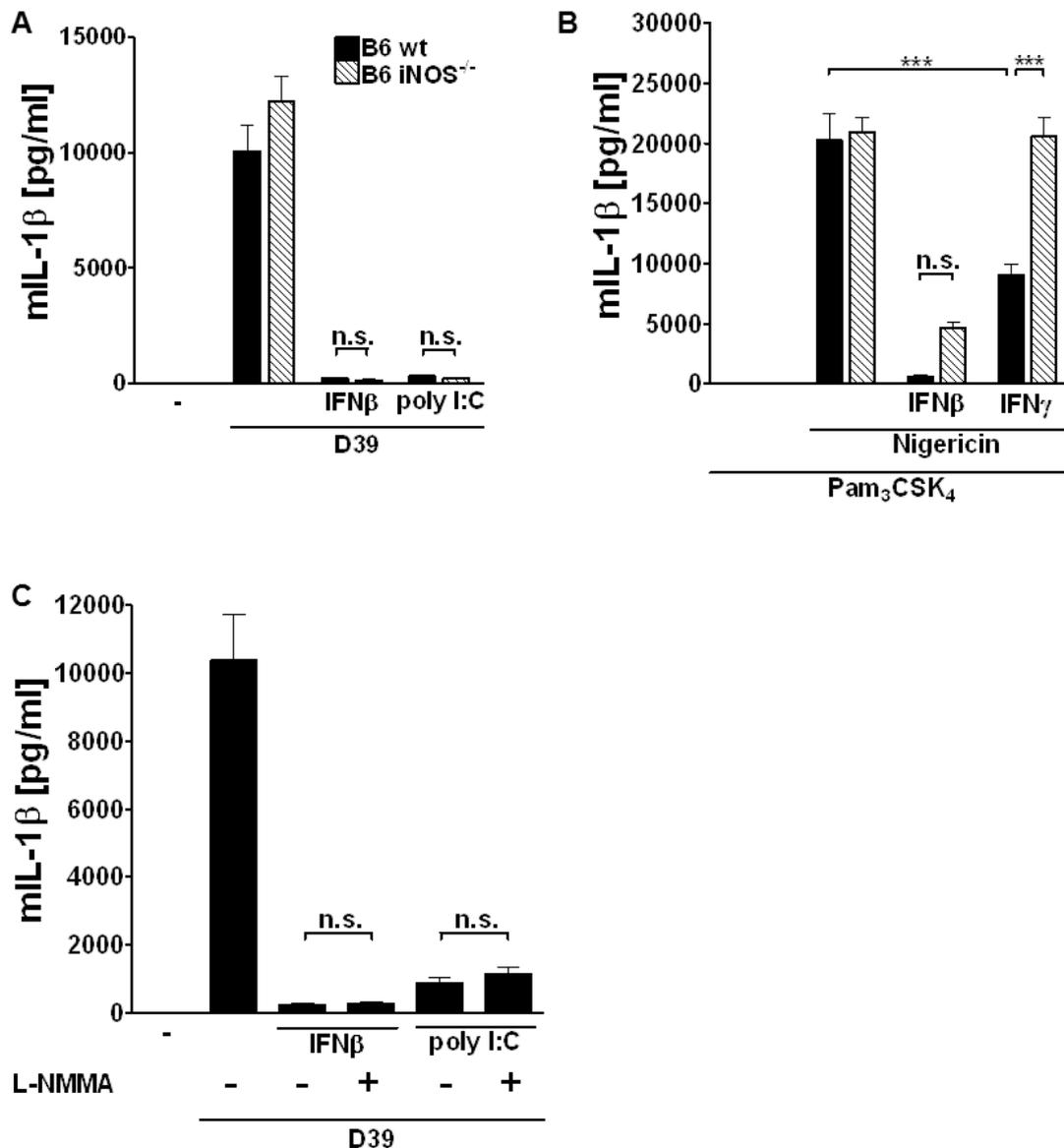
Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch die Expression von NLRP3 7 h und 16 h nach Infektion mit Pneumokokken im Vergleich zur Kontrolle verstärkt war (Abb. 5C, F). Die vorherige Behandlung mit IFN $\beta$  hatte jedoch keinen hemmenden Einfluss auf die NLRP3-Expression, sondern führte sogar zu einer dosisabhängigen Steigerung der NLRP3-Expression (Abb. 5C, F). Die Expressionen von AIM2, ASC und Caspase-1 wurden durch die Infektion mit *S. pneumoniae* nicht verstärkt und durch vorangegangene Stimulation mit IFN $\beta$  nicht inhibiert (Abb. 5G, 5H, 5I).

Zusammengefasst geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die negative Regulation der Produktion der inflammasomabhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 in Pneumokokken-infizierten Makrophagen durch IFN $\beta$  bzw. Virusinfektion nicht durch eine Regulation auf Genexpressionsebene zu erklären ist. Wahrscheinlicher erscheint, dass dieser Regulationsmechanismus nachfolgend in die Signalkaskaden eingreift.

### **3.4 Die inhibitorische Wirkung von poly I:C und IFN $\beta$ auf die Inflammasom-Antwort auf die Pneumokokkeninfektion ist unabhängig von iNOS**

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die induzierbare Isoform der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS) eine Rolle bei der IFN-vermittelten Reduktion der Inflammasomaktivität durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>/Nigericin und *M. tuberculosis* spielt (Hernandez-Cuellar et al., 2012; Mishra et al., 2013). Es sollte deshalb die Hypothese getestet

werden, dass iNOS auch an der Inhibition des Inflammations durch IFN $\beta$  beteiligt ist, nachdem dieses durch Infektion mit Pneumokokken aktiviert wurde.



**Abbildung 6:** Die Hemmung der durch *S. pneumoniae* aktivierten IL-1 $\beta$ -Sekretion durch IFN $\beta$  oder poly I:C ist unabhängig von iNOS. Wildtyp (WT)- und iNOS<sup>-/-</sup>-BMMs wurden unbehandelt gelassen oder mit IFN $\beta$  (50 U/ml) oder poly I:C (100 ng/ml) inkubiert und nachfolgend mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 0,025) für 16 h infiziert. Anschließend wurde die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt (A). WT- und iNOS<sup>-/-</sup>-BMMs wurden für 12 h mit dem TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (50 ng/ml), IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$  (100 U/ml) stimuliert und anschließend für 1 h mit Nigericin (5  $\mu$ M) behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (B). WT-BMMs wurden für 16 h mit IFN $\beta$  (50 U/ml) oder poly I:C (100 ng/ml) stimuliert bei gleichzeitiger Inhibition von iNOS mittels L-NMMA (1 mM). Im Anschluss folgten die Infektion mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 0,025) für 16 h und die Bestimmung von IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand (C). Die gezeigten Daten wurden jeweils in drei voneinander unabhängigen Versuchen in Triplikaten erhoben und statistisch untersucht.

Wildtyp- und iNOS<sup>-/-</sup>-BMMs wurden über Nacht mit IFN $\beta$  oder poly I:C stimuliert und am darauffolgenden Tag mit *S. pneumoniae* (D39) infiziert. Sowohl die Wildtyp- als auch die iNOS<sup>-/-</sup>-BMMs produzierten nach Infektion mit *S. pneumoniae* vergleichbare Mengen an IL-1 $\beta$  (Abb. 6A). Die vorherige Stimulation mit IFN $\beta$  oder poly I:C reduzierte sowohl in Wildtyp- als auch in iNOS<sup>-/-</sup>-Makrophagen die durch Pneumokokken aktivierte IL-1 $\beta$ -Sekretion (Abb. 6A). Außerdem zeigte sich, dass auch die chemische Inhibition von iNOS mittels des iNOS-Inhibitors L-NMMA keinen Einfluss auf die Hemmung der Pneumokokken-stimulierten IL-1 $\beta$ -Produktion sowohl durch poly I:C als auch durch direkte Stimulation mit IFN $\beta$  hatte (Abb. 6C).

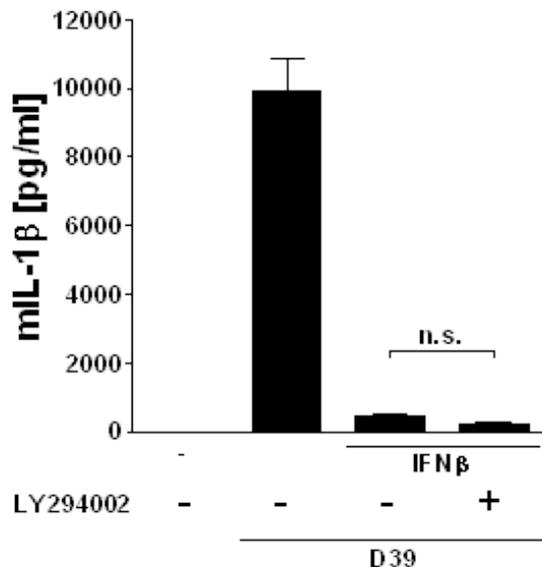
Im Gegensatz dazu und ähnlich wie in bereits publizierten Studien beschrieben (Hernandez-Cuellar et al., 2012) scheint jedoch die Hemmung der Nigericin-stimulierten Inflammassomantwort in mit Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> vorbehandelten BMMs durch IFN $\gamma$  und in der Tendenz auch durch IFN $\beta$  teilweise abhängig von iNOS zu sein (Abb. 6B). So zeigte sich, dass die durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> und Nigericin in gleichem Maße in Wildtyp- und iNOS<sup>-/-</sup>-BMMs induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion sowohl durch Vorbehandlung mit IFN $\beta$  als auch mit IFN $\gamma$  vermindert werden konnte, wobei diese Verminderung nach IFN $\beta$ -Behandlung jedoch nur partiell und statistisch nicht signifikant und die im Vergleich schwächer ausgeprägte Hemmung durch IFN $\gamma$  durch das Fehlen von iNOS komplett aufgehoben werden konnten (Abb. 6B).

Insgesamt zeigt sich also, dass die Hemmung der Inflammassomantwort auf *S. pneumoniae* durch virale RNA-Analoga bzw. IFN $\beta$  weitestgehend unabhängig von iNOS ist, wobei die Hemmung durch IFN $\gamma$  jedoch von iNOS abhängig zu sein scheint.

### **3.5 Die Inhibition der durch *S. pneumoniae* stimulierten IL-1 $\beta$ -Sekretion durch IFN $\beta$ hängt nicht von gesteigerter Autophagie ab**

Autophagie ist ein zelleigener Mechanismus, welcher der Beseitigung defekter Zellorganellen wie Mitochondrien und defekter Proteine dient, indem diese mittels sogenannter Autophagosomen zu Lysosomen geleitet und abgebaut werden (Chen und Sun, 2013). Verschiedene kürzlich veröffentlichte Studien zeigten, dass Autophagie regulatorisch auf die Inflammassom-abhängige Zytokinantwort wirken kann (dos Santos

et al., 2012; Shi et al., 2012). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Typ I IFNs Autophagie aktivieren können (Ambjørn et al., 2013; Schmeisser et al., 2013). Basierend auf diesen Überlegungen wurde nachfolgend getestet, ob die Verminderung der IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion nach IFN $\beta$ -Vorstimulation von der Induktion von Autophagie abhängig ist.



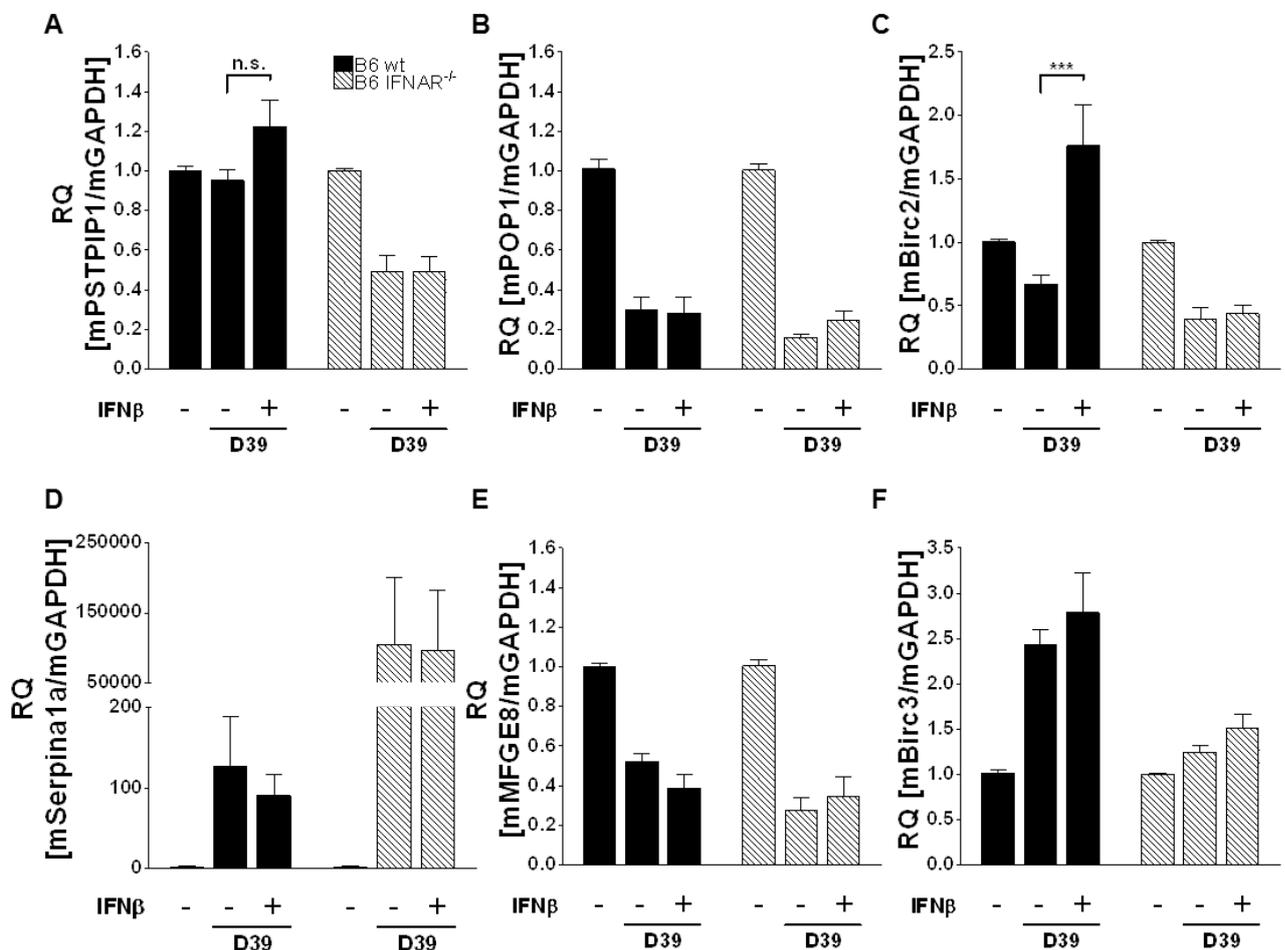
**Abbildung 7:** Kein Einfluss von Autophagie auf die Hemmung der durch Pneumokokken induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion durch IFN $\beta$ . Wildtyp-BMMs wurden über Nacht mit IFN $\beta$  (100 U/ml) behandelt und anschließend mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 0,025) für 16 h infiziert. 30 min vor und erneut bei der Infektion mit *S. pneumoniae* wurde der PI3K-Inhibitor LY294002 (1 mM) zur Inhibition der Autophagie zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend wurde mittels ELISA die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen in Triplikaten erhoben und nachfolgend wie beschrieben statistisch analysiert.

Wildtyp-BMMs wurden über Nacht mit IFN $\beta$  stimuliert und anschließend mit *S. pneumoniae* (D39) infiziert. *S. pneumoniae* allein führte zur Sekretion von IL-1 $\beta$  durch die BMMs, welche durch vorherige Stimulation mit IFN $\beta$  deutlich gehemmt wurde (Abb. 7). Der Einsatz des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Inhibitors LY294002 als Inhibitor der Autophagie vermochte den hemmenden Effekt von IFN $\beta$  auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion nicht abzuschwächen oder aufzuheben (Abb. 7).

Diese Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass eine eventuell durch IFN $\beta$ -vermittelte gesteigerte Aktivität der Autophagie nicht an der Hemmung des durch Pneumokokken-aktivierten Inflammasoms beteiligt ist.

### 3.6 Einfluss von IFN $\beta$ auf die Genexpression verschiedener Regulatoren des NLRP3-Inflammasoms

Bisher konnten u. a. PSTPIP1, POP1, *Birc2*, *Serpina1a*, MFGE8 und *Birc3* als endogene Inhibitoren bzw. Regulatoren der Inflammasome identifiziert werden (Yu et al., 2007; Davis et al., 2011; Labbé et al., 2011; Wang et al., 2012; Vince et al., 2012; Chen und Sun, 2013; Deroide et al., 2013). Um zu untersuchen, ob es zu einer IFN $\beta$ -abhängigen Induktion bzw. Repression dieser Inflammasom-Regulatoren kommt, wurde die mRNA-Expression dieser Moleküle im Folgenden getestet.



**Abbildung 8:** Expression von verschiedenen bekannten endogenen Inflammasom-Regulatoren in *S. pneumoniae*-infizierten und IFN $\beta$ -vorbehandelten BMMs. Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs wurden über Nacht mit IFN $\beta$  (500 U/ml) stimuliert und nachfolgend mit *S. pneumoniae* (D39; MOI 0,025) für 16 h infiziert. Anschließend wurden mittels qRT-PCR die relativen Genexpressionen von PSTPIP1 (A), POP1 (B), *Birc2* (C), *Serpina1a* (D), MFGE8 (E) und *Birc3* (F) in den Zelllysaten untersucht. Die gezeigten Daten wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen in Triplikaten erhoben und wie oben beschrieben statistisch analysiert.

Wildtyp- und IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs wurden über Nacht mit IFN $\beta$  stimuliert und am darauffolgenden Tag für 16 h mit *S. pneumoniae* infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die relative Genexpression in den Zelllysaten mittels qRT-PCR untersucht.

Die Analysen zeigten, dass die Expression von POP1, *Birc2*, Serpina1a, MFGE8 und *Birc3* durch die Infektion mit *S. pneumoniae* gehemmt bzw. gesteigert wurde (Abb. 8B-F). Im Gegensatz dazu hatte die Pneumokokkeninfektion keinen Einfluss auf die Expression von PSTPIP1 in Wildtyp-, jedoch in IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs (Abb. 8A).

Interessanterweise bewirkte die vorherige Behandlung mit IFN $\beta$  eine Expressionssteigerung von *Birc2* in den Wildtyp-Zellen, nicht aber in den IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs (Abb. 8C). Im Gegensatz dazu hatte IFN $\beta$  keinen Einfluss auf die Expression von PSTPIP1, POP1, Serpina1a, MFGE8 und *Birc3* (Abb. 8A, B und D-F).

Zusammengefasst erfüllt nur *Birc2* (bzw. das dadurch kodierte Protein cIAP1) die Kriterien für einen potentiellen Effektorkandidaten unterhalb von IFN $\beta$  (und somit möglicherweise Influenza A-Virus), der eine Regulation der Pneumokokken-stimulierten Inflammation vermitteln könnte.

## 4 Diskussion

Die Infektion mit dem Influenza A-Virus ist weltweit verbreitet und betrifft jährlich einen relevanten Teil der Bevölkerung, was pro Jahr allein in Industrieländern im Verlauf der jährlichen Grippeepidemien hunderttausende Menschenleben kostet (Stöhr, 2003; McCullers, 2006; Robinson et al., 2013).

Eine der Hauptursachen für diese schweren Krankheitsverläufe sind bakterielle Superinfektionen, wobei *S. pneumoniae* hier einen der häufigsten Erreger darstellt (Chertow und Memoli, 2013; Smith et al., 2013). Die höchste Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Superinfektionen tritt etwa in der zweiten Woche nach der Infektion mit Influenza auf. Der zugrundeliegende Mechanismus, über den die oft bereits abklingende Influenzainfektion diese erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Erregern verursacht, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt (Chertow und Memoli, 2013; Metzger und Sun, 2013).

Die Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 durch die Aktivierung von Inflammasomen spielt eine essenzielle Rolle bei der Abwehr der Pneumokokkeninfektion (Fang et al., 2011; Witzernath et al., 2011; Koppe et al., 2012b). Inflammasome sind Multiproteinkomplexe, welche im aktivierten Zustand oligomerisieren und so die autoproteolytische Spaltung des Zymogens pro-Caspase-1 in die enzymatisch aktive Form der Caspase-1 vermitteln. Die aktivierte Caspase-1 spaltet pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in die aktiven Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 und vermittelt über einen noch unbekanntem Mechanismus deren Sekretion (Franchi et al., 2009; Schroder und Tschopp, 2010; Kumar et al., 2011). Die ausschlaggebend an der Abwehr der Pneumokokkeninfektion beteiligten Inflammasome sind die ASC-abhängigen NLRP3- und AIM2-Inflammasome (Koppe et al., 2012b). Eine Hemmung der Funktion ebendieser Inflammasome durch die vorangehende Influenzainfektion hätte dementsprechend weitreichende Folgen hinsichtlich der Anfälligkeit gegenüber invasiven Infektionen mit *S. pneumoniae*.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Mechanismus *in vitro* aufgezeigt werden, der möglicherweise hierbei eine Rolle spielt.

Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe sowie anderer Gruppen konnten zeigen, dass das NLRP3- sowie wahrscheinlich das AIM2-Inflammasom an der Abwehr einer Pneumokokkeninfektion maßgeblich beteiligt sind (McNeela et al., 2010; Fang et al.,

2011; Witzernath et al., 2011; Koppe et al., 2012b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Pneumokokken induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  durch eine vorangegangene Infektion mit Influenza A-Virus vermindert wird (Abb. 3). Hierbei scheint die Verminderung der Inflammation auf die Pneumokokkeninfektion von der Erkennung viraler RNA sowie dem als Antwort auf das bei der Influenza-Infektion produzierten IFN $\beta$  abhängig zu sein (Abb. 3, 4). IFN $\beta$  hemmt die Inflammation jedoch wahrscheinlich nicht auf der Ebene der Genexpression (Abb. 5). Außerdem scheinen iNOS und Autophagie (Abb. 6, 7) hierbei keine Rolle zu spielen. Darüber hinaus werden die bekannten Inflammation-Regulatoren PSTPIP1, POP1, Serpina1a, MFGE8 und *Birc3/cIAP2* nicht durch Typ I IFN reguliert, was darauf schließen lässt, dass sie wahrscheinlich nicht an der Virus- bzw. Typ I IFN-abhängigen Hemmung der Inflammation auf Pneumokokken beteiligt sind (Abb. 8). Lediglich die Expression von *Birc2/cIAP1* wird durch Typ I IFN stimuliert, was dieses Molekül zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen des Mechanismus der durch IFN $\beta$  vermittelten Hemmung der Inflammation auf Pneumokokken macht (Abb. 8C).

#### **4.1 Infektion mit Influenzavirus A inhibiert die Inflammation-abhängige Zytokinproduktion**

Für die erfolgreiche Abwehr einer Infektion mit Pneumokokken sind die Erkennung des Pathogens durch das angeborene Immunsystem und die daraufhin erfolgende Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine notwendig. Hierbei spielen sowohl die Inflammation-abhängigen Zytokine wie IL-1 $\beta$  als auch Inflammation-unabhängige Zytokine wie z. B. TNF $\alpha$  eine entscheidende Rolle (Kerr et al., 2008; Witzernath et al., 2011; Koppe et al., 2012b).

Die vorangegangene Infektion mit Influenzavirus A führte *in vitro* zu einer Verminderung der durch Pneumokokken aktivierten Ausschüttung des Inflammation-abhängigen Zytokins IL-1 $\beta$  (Abb. 3A). Diesen inhibitorischen Effekt hatten Influenza A-Virus-Mutanten, die kein NS1-Protein produzierten und somit erhöhte Mengen an Typ I IFN induzierten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein solcher Mechanismus *in vivo* auch bei Infektionen mit Wildtyp-Viren eine Bedeutung hat, da es hier zu einer

Produktion von größeren Mengen Typ I IFN z. B. durch pDCs kommt, die nicht durch das NS1-Protein gehemmt wird (Jewell et al., 2007).

In vorangegangenen Versuchen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass auch eine Infektion mit Influenzavirus alleine in der Lage ist, zur Produktion von IL-1 $\beta$  zu führen, wobei diese ASC-Inflammasom-abhängige Produktion für die Abwehr der viralen Infektion unerlässlich war (Stasakova et al., 2005; Ichinohe et al., 2009). Des Weiteren ist das NS1-Protein dafür bekannt, dass es sowohl die Induktion von Typ I IFN als auch die Produktion von IL-1 $\beta$  inhibiert (Stasakova et al., 2005). In den hier dargestellten Experimenten *in vitro* in BMMs konnte jedoch keine Produktion von IL-1 $\beta$  in den alleinig mit Influenza A-Virus bzw. NS1-defizienten Influenza A-Viren beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die intranasale Infektion von Mäusen mit Influenza A-Virus (H1N1/PR/8) zu einer Produktion von IL-1 $\beta$  *in vivo* (Daten nicht gezeigt).

Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Beobachtungen *in vitro* liegen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen. Während in den Studien der Gruppen von Stasakova und Ichinohe GM-CSF verwendet wurde, um die Zellen vor der Infektion zu Makrophagen zu differenzieren, so wurde in dieser Arbeit M-CSF-haltiger Zellüberstand von L929-Fibroblasten verwendet (Stasakova et al., 2005; Ichinohe et al., 2009). GM-CSF und M-CSF haben unterschiedliche Effekte auf die Immunantwort der jeweils stimulierten Zellen (Lacey et al., 2012), wobei GM-CSF sowohl IL-1 $\beta$  als auch Caspase-1 induziert (Pirhonen et al., 1999). Des Weiteren wurden in dieser Studie im Gegensatz zur Arbeit von Stasakova et al. murine anstatt humaner Makrophagen verwendet. Auch unterscheidet sich die Zellisolationstechnik: In diesen Versuchen wurden Knochenmarkszellen isoliert und nachfolgend zu BMMs differenziert. Stasakova et al. jedoch isolierten Monozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender und differenzierten diese mittels GM-CSF zu Makrophagen (Stasakova et al., 2005). Die Unterschiede lassen sich dementsprechend eventuell durch die unterschiedlichen Zellarten und Versuchsbedingungen erklären, wobei auch ein vorangegangenes *Priming* der relativ zu den Knochenmarkszellen entwickelten Monozyten durch die Mikrobiota des Gastrointestinal- oder Respirationstraktes eine Rolle spielen könnte (Clarke et al., 2010). Auch *in vivo* könnte ein *Priming* des Inflammasoms bzw. von pro-IL-1 $\beta$  durch die Mikrobiota dazu beitragen, dass die Infektion mit Influenza A Virus eine starke Produktion des Zytokins verursacht (Ichinohe et al., 2011). Das Fehlen dieses *Primings* durch eine vorhandene kommensale Mikroflora der BMMs in dieser Arbeit *in*

*in vitro* könnte ebenfalls die Unterschiede zu unseren eigenen (nicht gezeigten) Daten *in vivo* erklären.

Wie oben dargestellt führte die vorherige Infektion mit NS1-defizienten Influenza A-Viren in unseren Versuchen *in vitro* jedoch sogar zu einer Verminderung der Inflammation-abhängigen Zytokinantwort auf eine nachfolgende Pneumokokkeninfektion. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob dieser Effekt durch die Hemmung der Aktivität der Inflammation-osome oder durch die Verminderung der Induktion der pro-IL-1 $\beta$ -Expression bedingt war. Robinson et al. fanden *in vivo* eine signifikante Reduktion der pro-IL-1 $\beta$ -Expression nach Infektion mit Influenzavirus A und Koinfektion mit *Staphylococcus aureus*, wobei sie jedoch keine Beeinträchtigung der Inflammation-ome-Aktivierung zeigen konnten. Diese Verminderung der pro-IL-1 $\beta$ -Expression war abhängig von der Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Robinson et al., 2013).

Bei der eigenen Untersuchung der Expression von pro-IL-1 $\beta$  jedoch fiel auf, dass zwar ein Trend zu einer leichten Verminderung der Expression durch eine hohe Dosis der Virusmutante dNS1 auftrat, dieser aber nicht signifikant war und die deutlich stärkere Einschränkung der Sekretion reifen IL-1 $\beta$  nicht erklären konnte (Abb. 3D). Zudem war bei geringen Dosen der dNS1-Mutante und bei Infektion mit der Mutante mit trunziertem NS1-Protein (NS1-125) ein solcher Trend nicht sichtbar, obwohl es auch hier zu einer Verminderung der IL-1 $\beta$ -Sekretion gekommen war.

Eine generelle Suppression der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Infektion mit Influenza A-Viren würde zudem auch zur Einschränkung der Produktion anderer NF- $\kappa$ B-abhängiger Zytokine führen, was hier am Beispiel TNF $\alpha$  nicht beobachtet werden konnte (Abb. 3C). Bekannterweise führt die Infektion mit Influenzavirus A nach der Erkennung durch das angeborene Immunsystem zur Induktion und folgender Produktion von Typ I IFNs (White et al., 2008). Auch in diesem *in vitro*-Modell kam es nach Infektion mit dem Influenzavirus zur Steigerung der IFN $\beta$ -Expression (Abb. 3B), welche selbst 23 h nach der Virusinfektion noch deutlich nachweisbar war. Auch die Infektion mit *S. pneumoniae* allein führte zur Induktion der IFN $\beta$ -Expression, die jedoch schwächer ausgeprägt war als nach Influenza-Vorinfektion. Die Induktion von IFN $\beta$  war genau dort am stärksten, wo die Verminderung der IL-1 $\beta$ -Produktion am deutlichsten ausgeprägt war. Die Sekretion von IFN $\beta$  als Antwort auf die Influenza-Infektion könnte also die verminderte Sekretion Inflammation-ome-abhängiger Zytokine nach einer folgenden Infektion mit Pneumokokken bedingen und so die Anfälligkeit gegenüber der Koinfektion verstärken.

Dies deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Studien, die ebendiese Influenza-induzierte Typ I IFN-Abhängigkeit der Prädisposition gegenüber bakteriellen Infektionen beschrieben (Shahangian et al., 2009; Nakamura et al., 2011). Außerdem führen auch die Vorstimulation der Zellen mit einem viralen RNA-Analogon Typ I IFN-abhängig sowie die Gabe von rekombinantem Typ I IFN zu einer Hemmung der Inflammation auf eine Infektion mit Pneumokokken (siehe unten).

#### **4.2 Analoga viraler RNA inhibieren die durch *S. pneumoniae* stimulierte Produktion Inflammation-abhängiger Zytokine in Abhängigkeit von IFNAR**

Um zu prüfen, ob die Erkennung viraler RNA durch RLRs die Verminderung der *S. pneumoniae*-induzierten IL-1 $\beta$ - und IL-18-Produktion bewirkt und um die Bedeutung der Erkennung viraler RNA ohne Interferenzen mit den Wirkungen anderer viraler Bestandteile untersuchen zu können, wurde die Virusinfektion durch die Vorbehandlung mit poly I:C ersetzt.

Poly I:C ist ein synthetisches Analogon von dsRNA und aktiviert den endosomalen TLR3 und den zytosolischen RNA-Rezeptor MDA5. Die Stimulation mit poly I:C bewirkt ähnlich wie die virale Infektion die Expression und Produktion von Typ I IFNs (Kato et al., 2006; Tian et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von murinen BMMs mit poly I:C im Vorfeld einer Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer verminderten Produktion Inflammation-abhängiger Zytokine führte. Dies lässt darauf schließen, dass die Hemmung der Zytokinproduktion hierbei von IFNAR abhängig war, da der Effekt nur in Wildtyp-, nicht aber in IFNAR<sup>-/-</sup>-BMMs zu beobachten war (Abb. 4A, B).

Tian et al. konnten zeigen, dass bei Mäusen die intranasale Gabe von poly I:C zu einer verminderten Abwehr gegenüber einer nachfolgenden Infektion mit *S. pneumoniae* oder Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* und in der Folge zur erhöhten Mortalität der Tiere führte. Für diesen nachteiligen Effekt von poly I:C wurde auch hier die Induktion von Typ I IFNs verantwortlich gemacht (Tian et al., 2012). Da IL-1 $\beta$  auch in der Abwehr einer Infektion mit *S. aureus* eine zentrale Rolle spielt (Robinson et al., 2013), könnte eine wie in den Ergebnissen dieser Arbeit gezeigte durch poly I:C und

Typ I IFN vermittelte Reduktion dieses Zytokins auch in der Studie von Tian et al. ursächlich für die beobachtete erhöhte Mortalität nach poly I:C-Behandlung sein (Abb. 4A, C).

### **4.3 Hemmung der Inflammasom-abhängigen Zytokinproduktion durch IFN $\beta$ in *S. pneumoniae*-infizierten Makrophagen**

Die aktuellen Daten zeigen, dass sowohl die poly I:C-vermittelte als auch die direkte Stimulation von murinen Makrophagen mit IFN $\beta$  dosisabhängig zu einer deutlichen Reduktion der Sekretion der Inflammasom-abhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 nach Infektion mit *S. pneumoniae* führt (Abb. 4). IFN $\beta$  vermittelt diesen Effekt offenbar nachhaltig, da durch den Austausch des Nährmediums der Zellen während der Infektion das vor der Infektion hinzu gegebene poly I:C bzw. das (ausgeschüttete) IFN $\beta$  von den Zellen entfernt wurde. Einmal mit IFN $\beta$  stimuliert, vermindert sich in Wildtyp-Zellen also für einen gewissen Zeitraum die Fähigkeit, durch Inflammasomaktivierung aufgrund des Erkennens eines Erregers IL-1 $\beta$  und IL-18 auszuschütten. Diese Erkenntnisse stützen die Ergebnisse einer Studie von Guarda et al., die nachweisen konnte, dass IFN $\beta$  die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch LPS/Aluminiumhydroxid STAT1-abhängig hemmt. Ein genauerer Mechanismus dieses antiinflammatorischen Effektes konnte jedoch nicht gezeigt werden (Guarda et al., 2011).

Bemerkenswert und klinisch von besonderer Relevanz ist die Tatsache, dass die antiinflammatorische Wirkung von Typ I IFN bereits Anwendung findet: IFN $\beta$  ist in der Erstlinientherapie der demyelinisierenden Erkrankung Multiple Sklerose (MS) fest etabliert und auch in der Behandlung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wirksam. Bei beiden Erkrankungen wird eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms angenommen (Inoue und Shinohara, 2013). IFN $\beta$  vermindert bei der schubförmig-remittierenden Verlaufsform der MS die Schwere der Erkrankung, indem es zur Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke beiträgt und die Häufigkeit der Schübe vermindert (Giovannoni und Miller, 1999). Ebendiese antiinflammatorische Wirkung der Typ I IFNs scheint auch bei der Entwicklung bakterieller Pneumonien in Folge einer Infektion mit Influenza eine Rolle zu spielen und die Anfälligkeit gegenüber

diesen Superinfektionen mittels verschiedener Mechanismen zu erhöhen (Shahangian et al., 2009; Nakamura et al., 2011; Li et al., 2012; Tian et al., 2012).

Aufgrund der Hemmung der IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion nach Behandlung mit IFN $\beta$  stellt sich nun die Frage, ob diese IFN $\beta$ -vermittelte Hemmung durch eine Verminderung der Menge an pro-IL-1 $\beta$ , die der Zelle zur Verfügung steht, oder durch eine Inhibition des Inflammasoms selbst zustande kommt.

Henry et al. zeigten, dass für die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen, die mit den zytosolischen Erregern *Francisella tularensis* oder *Listeria monocytogenes* infiziert worden waren, die Ausschüttung von Typ I IFNs mit nachfolgender Stimulation der Typ I IFN-abhängigen Signalwege erforderlich war. Bei nicht-zytosolischen Bakterien wie z. B. *Salmonella Typhimurium* war Typ I IFN hingegen keine Voraussetzung für die Inflammasom-abhängige Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 (Henry et al., 2007). Vielmehr fanden Veeranki et al. nach der Stimulation von THP-1-Zellen mit den Typ I Interferonen IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  eine Verminderung der Expression von pro-IL-1 $\beta$ -mRNA, bei der Behandlung mit dem Typ II Interferon IFN $\gamma$  jedoch eine Erhöhung ebendieser (Veeranki et al., 2011). Auch eine Studie von Novikov et al. erbrachte, dass das in *Mycobacterium tuberculosis*-infizierten humanen Makrophagen induzierte IFN $\beta$  die Sekretion von IL-1 $\beta$  vermindert. Der genannte Mechanismus ist auch hier nicht die Verminderung der Aktivität des Inflammasoms, sondern die verringerte Bereitstellung von pro-IL-1 $\beta$  durch Hemmung der Transkription (Novikov et al., 2011). Diese Ergebnisse zu Typ I IFNs stimmen mit den Erkenntnissen überein, die Guarda et al. im gleichen Jahr publizierten (Guarda et al., 2011). Diese Gruppe sah in murinen BMMs eine durch LPS-Priming bedingte Expression von pro-IL-1 $\beta$ , die in der darauffolgenden Stimulation mit Aluminiumhydroxid (Alum), Harnsäurekristallen, Asbest, Nigericin, ATP, Milzbrandtoxin (LeTx) und *Salmonella Typhimurium* durch Typ I IFNs gehemmt wurde. *In vivo* konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, wobei hier anstatt mit IFN $\beta$  mit poly I:C vorbehandelt und die Inflammasom-Aktivität mit Alum oder *Candida albicans* stimuliert worden war. Dieser Mechanismus konnte von der Arbeitsgruppe auch in humanen primären Monozyten aufgezeigt werden, welche mit IFN $\beta$  und LPS/Alum behandelt wurden (Guarda et al., 2011). Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass die Inhibition der Expression von pro-IL-1 $\beta$  durch Typ I IFNs in murinen Makrophagen IFNAR-, STAT1-, STAT3- und Interleukin-10-abhängig ist. Pro-IL-1 $\beta$  wird NF- $\kappa$ B-abhängig z. B. durch Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien über TLR4

induziert. Nach Stimulation der Makrophagen mit LPS und IFN $\beta$  wird jedoch STAT1-abhängig das antiinflammatorische Zytokin IL-10 produziert, das wiederum über Aktivierung des IL-10-Rezeptors und STAT3 in der Folge zu einer Verminderung der Induktion von pro-IL-1 $\beta$  führt (Guarda et al., 2011). Shahangian et al. untersuchten den Einfluss von Typ I IFN auf die postinfluenza-Pneumokokkenpneumonie *in vivo*, konnten hier jedoch keinen Einfluss von IL-10 auf die pulmonale Pneumokokkenlast in Mäusen beobachten, die 5 Tage vor einer Infektion mit *S. pneumoniae* mit Influenzaviren infiziert worden waren (Shahangian et al., 2009).

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus diesen Studien konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen durch Stimulation von murinen BMMs mit IFN $\beta$  sowohl 7 h als auch 16 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* keine signifikante Verminderung der Genexpression von pro-IL-1 $\beta$  festgestellt werden (Abb. 5A, D). Die sichtbaren vorhandenen Trends erscheinen nicht dosisabhängig, da die Expression nach Stimulation mit der höchsten Dosis IFN $\beta$  diesem Trend nicht folgt. Hinzu kommt, dass die vergleichsweise leichten Unterschiede in der Induktion von pro-IL-1 $\beta$  die viel stärkeren Unterschiede bei der Betrachtung der Sekretion der aktivierten Form von IL-1 $\beta$  nicht allein erklären können (vgl. Abb. 4C). Dies würde die Vermutung nahelegen, dass die Hemmung des Inflammasoms durch IFN $\beta$  in diesem Modell eine entscheidendere Rolle spielt. Auch Guarda et al. konnten sowohl *in vitro* in murinen Makrophagen und in humanen primären Monozyten als auch *in vivo* im Mausmodell neben der Beeinflussung des vorhandenen pro-IL-1 $\beta$  eine Hemmung der Inflammasomaktivität durch Behandlung mit IFN $\beta$  nachweisen, welche in den murinen Makrophagen über den Transkriptionsfaktor STAT1 vermittelt wurde (Guarda et al., 2011).

Betrachtet man hingegen die im Vergleich zur Expression von pro-IL-1 $\beta$  schwache Expression von pro-IL-18 7 h nach Infektion mit *S. pneumoniae*, findet sich tatsächlich eine signifikante Repression, welche jedoch ebenfalls nicht eindeutig dosisabhängig und deutlich schwächer als die Verminderung des sekretierten Zytokins ist (Abb. 5B, vgl. Abb. 4D). Dies kann darauf hindeuten, dass die Produktion von IL-18 anders als die von IL-1 $\beta$  zumindest unter diesen Versuchsbedingungen zusätzlich zur Regulation auf der Ebene der Inflammasome auch auf der Ebene der Proform des Zytokins reguliert wird. 16 h nach der Infektion andererseits ist dieser Effekt zumindest als Trend ins Gegenteil verkehrt, IFN $\beta$  scheint hier eher die Induktion als die Repression von pro-IL-18 zu bewirken (Abb. 5E).

Auch bei der Expression des Inflammasombestandteils NLRP3 kommt es durch IFN $\beta$ -Behandlung in der Folge eher zu einer Induktion als zu einer Repression (Abb. 5C, F). Andere bisher bekannte Inflammasombestandteile wie AIM2, ASC oder Caspase-1 werden ebenfalls nicht negativ beeinflusst, was die von Inoue und Shinohara publizierten Ergebnisse bestätigen (Inoue und Shinohara, 2013).

Auch dies weist auf die Beeinflussung der Inflammasomaktivität selbst hin, was die Frage nach einem möglichen Mechanismus aufkommen lässt. Um den direkten Effekt von IFN $\beta$  (bzw. Influenza A-Virus) auf die Aktivierung des Inflammasoms beurteilen zu können, wäre jedoch als klarer Beweis eine Darstellung der Inflammasomaktivität in Pneumokokken-infizierten Zellen nach Vorbehandlung beziehungsweise vorangehender Infektion mit Influenzaviren z. B. in Form des Nachweises aktivierter Caspase-1 im Western Blot nötig. Die Etablierung dieses Western Blots wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits begonnen und sollte als nächster Schritt zur Klärung dieser Fragestellung durchgeführt werden.

#### **4.4 IFN $\beta$ reguliert die Inflammasomaktivität in *S. pneumoniae*-infizierten Makrophagen unabhängig von iNOS**

Die Signalwege, die durch IFN $\beta$  über den IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor angestoßen werden, regulieren über einen STAT1/STAT2/IRF9-Transkriptionsfaktorenkomplex unter anderem die Transkription des *Nos2*-Gens, das für die induzierbare Form der NO-Synthase (iNOS) kodiert. Stickstoffmonoxid (NO) besitzt wichtige Funktionen, welche die antimikrobielle Abwehr und die Regulation verschiedener Signaltransduktionswege betreffen (Farlik et al., 2010). Die Transkription von iNOS wird durch IFN $\beta$  induziert, jedoch mittels SPSB1 auch negativ reguliert, was eine Möglichkeit der Feinregulierung darstellen könnte (Lewis et al., 2011).

Kürzlich publizierten zwei verschiedene Gruppen, dass die Aktivität der iNOS über die Synthese von NO das NLRP3-Inflammasom inhibiert. Der Mechanismus, der für diese Inhibition verantwortlich gemacht wird, ist die S-Nitrosylierung, eine reversible Bindung von NO an Thiol-Gruppen des Proteins, die wahrscheinlich am C-Terminus eine bedeutendere Rolle spielt als am N-Terminus (Hernandez-Cuellar et al., 2012; Mishra et al., 2013). Mishra et al. fanden eine Induktion von iNOS nach Stimulation mit IFN $\gamma$  in

Abhängigkeit eines zweiten Signals durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR2-Agonist), welche wiederum zur Produktion von NO führte. Durch dieses NO konnte die IL-1 $\beta$ -Produktion von Makrophagen gehemmt werden, was jedoch durch das Hinzugeben eines Reduktors in Form von Ascorbinsäure, welcher die S-Nitrosylierung rückgängig machte, wieder aufgehoben werden konnte (Mishra et al., 2013). Hernandez-Cuellar et al. zeigten diesen inhibitorischen Effekt der NO-Synthese durch iNOS auf die Aktivität des Inflammasoms in Abhängigkeit von der Gabe von IFN $\beta$ , welcher durch den iNOS-Inhibitor L-NMMA aufgehoben werden konnte, da es durch L-NMMA zu einer drastischen Verminderung des produzierten Stickstoffmonoxids kam (Hernandez-Cuellar et al., 2012).

Die Hemmung der durch *S. pneumoniae* induzierten Sekretion von IL-1 $\beta$  war jedoch nicht von durch iNOS produziertem NO abhängig (Abb. 6A, C). Dies gilt sowohl für die direkte Inhibition durch IFN $\beta$  als auch indirekt durch das dsRNA-Analogon poly I:C, wobei der Zusammenhang sowohl mittels des iNOS-Inhibitors L-NMMA (Abb. 6C) als auch mittels iNOS-defizienten murinen Makrophagen (Abb. 6A) getestet wurde. iNOS scheint also in diesem Modell nicht an der Wirkung des IFN $\beta$  auf die IL-1 $\beta$ -Produktion beteiligt zu sein, weder durch Hemmung des NLRP3-Inflammasoms noch durch Verminderung der Bereitstellung von pro-IL-1 $\beta$ , wie sie zusätzlich von Mishra et al. angenommen wird (Mishra et al., 2013).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in einem Kontrollexperiment, dass iNOS an der Hemmung der durch den TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> und den NLRP3-Inflammasom-Aktivator Nigericin stimulierten IL-1 $\beta$ -Produktion durch IFN $\gamma$  und möglicherweise auch durch IFN $\beta$  beteiligt war. Die Sekretion von IL-1 $\beta$  wurde in murinen Makrophagen durch IFN $\beta$  unterdrückt, wobei die Hemmung bei iNOS<sup>-/-</sup>-Makrophagen tendenziell schwächer ausfiel (Abb. 6B). Dieser Unterschied war jedoch in der statistischen Analyse nicht signifikant. Bei IFN $\gamma$  allerdings scheint iNOS in die inhibitorische Wirkung auf die Produktion von IL-1 $\beta$  auch statistisch signifikant involviert: Das Typ II IFN war zwar in der Lage, in Wildtyp-Makrophagen die ausgeschüttete Menge an IL-1 $\beta$  zu vermindern, nicht aber bei iNOS-defizienten Zellen (Abb. 6B). Dies weist darauf hin, dass iNOS eine Rolle in der durch IFN $\gamma$  vermittelten Hemmung des Inflammasoms spielt und eventuell auch bei der Hemmung durch IFN $\beta$  involviert ist.

#### **4.5 IFN $\beta$ inhibiert die IL-1 $\beta$ -Sekretion nicht durch Steigerung der Autophagie**

Autophagie ist ein Mechanismus von Zellen, welcher die jeweilige Zelle schützen soll, indem er defekte Zellorganellen wie Mitochondrien und alte, möglicherweise defekte Proteine mittels Autophagosomen zu Lysosomen geleitet, wo sie abgebaut werden (Levine et al., 2011). Autophagie reguliert zudem die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms, indem sie dieses zum einen direkt über die Ubiquitylierung von ASC und Rekrutierung von p62 und LC3 hemmt, zum anderen jedoch auch durch das Entfernen von pro-IL-1 $\beta$  und Abbau in Lysosomen die Substratverfügbarkeit des Inflammasoms vermindert und zusätzlich auch die endogenen Stimuli des Inflammasoms entfernt. Das Entfernen endogener Stimuli geschieht in diesem Fall vor allem durch die Verminderung der Produktion von ROS durch das Beseitigen defekter Mitochondrien (Chen und Sun, 2013).

Daraus resultiert, dass eine Verminderung der Autophagie zu einer Steigerung der Inflammasomaktivität bzw. eine Steigerung der Autophagie zu einer Verminderung der Inflammasomaktivität führt (dos Santos et al., 2012; Shi et al., 2012).

Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass Typ I IFN in verschiedenen humanen Zelllinien Autophagie induzieren kann (Ambjørn et al., 2013; Schmeisser et al., 2013).

Deshalb wurde getestet, ob Autophagie bei der Inhibition der Pneumokokken-stimulierten Inflammasom-Aktivierung durch IFN $\beta$  eine Rolle spielt. Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ist essentiell nötig zur Initiierung der Autophagie, wobei der PI3K-Inhibitor LY294002 Autophagie zu verhindern vermag (Mitroulis et al., 2010; Shi et al., 2012).

Das Blockieren der Autophagie in murinen BMMs führte jedoch nicht zu einer Wiederherstellung der durch IFN $\beta$  verminderten Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Infektion der Zellen mit *S. pneumoniae* (Abb. 7). Diese Erkenntnis macht einen Zusammenhang der Wirkung von IFN $\beta$  auf die Sekretion von IL-1 $\beta$  und einer möglichen Steigerung der Autophagie durch IFN $\beta$  unwahrscheinlich. Allerdings muss bedacht werden, dass LY294002 relativ unspezifisch PI3K blockiert, sodass neben der Autophagie zusätzlich auch andere PI3K-abhängige Prozesse wie die Phagozytose gestört sein können (Mitroulis et al., 2010).

## 4.6 IFN $\beta$ beeinflusst nicht die Transkription bekannter Regulatoren des Inflammasoms

Da sowohl die Induktion von iNOS als auch die Induktion von Autophagie nicht verantwortlich für die Hemmung des Inflammasoms durch IFN $\beta$  zu sein scheinen (siehe oben), müssen die Ursachen hierfür in anderen Mechanismen gesucht werden.

Guarda et al. testeten bereits die mögliche Typ I IFN-abhängige Regulation verschiedener Proteine, welche als Kandidaten für Caspase-1- oder Inflammasom-Inhibitoren gelten. Zu diesen bereits getesteten Proteinen zählen die Proteinaseinhibitoren Serpinb9 und Serpinb2, Pysin, Caspase-12 und die Mitglieder der Bcl-Proteinfamilie Bcl-2 und Bcl-XL. Keiner dieser Inhibitoren wurde durch Typ I IFN in signifikanter Menge induziert. Die Autoren der Studie schlussfolgerten deshalb, dass keines dieser getesteten Moleküle essenziell für die IFN $\beta$ -vermittelte Inhibition des Inflammasoms sei (Guarda et al., 2011).

In meiner Arbeit habe ich die Expression weiterer Proteine getestet, von denen angenommen wird, dass sie die Aktivität von Inflammasomen regulieren können. Grundlage dieser Experimente war die Annahme, dass ein möglicher Effortorkandidat, der unterhalb von IFN $\beta$  die Pneumokokken-stimulierte Inflammasom-Aktivität hemmt, durch IFN $\beta$  induziert werden sollte.

Pysin interagiert wahrscheinlich über seine Pysin-Domäne mit ASC und inhibiert so die Oligomerisierung ASC-abhängiger Inflammasome (Davis et al., 2011). Zusätzlich ist es dazu in der Lage, direkt mit der katalytischen Domäne von Caspase-1 zu interagieren und die Autoaktivierung zu verhindern (Davis et al., 2011). Pysin ist der zytosolische Rezeptor für das Protein PSTPIP1, welches als Homotrimer Pysin aktiviert und zur Demaskierung dessen Pysin-Domänen (PYDs) führt, sodass diese Protein-Protein-Interaktionen eingehen können (Yu et al., 2007). Außer eines kleinen, nicht signifikanten Trends wurde jedoch keine Induktion von PSTPIP1 in *S. pneumoniae*-infizierten Makrophagen durch IFN $\beta$ -Exposition beobachtet (Abb. 8A), sodass PSTPIP1-Pysin-abhängiger Mechanismus als verantwortlicher für die IFN $\beta$ -Wirkung unwahrscheinlich erscheint.

Ein weiterer bekannter Inhibitor der Inflammasomaktivität, welcher wahrscheinlich durch einen ähnlichen Mechanismus agiert wie Pysin, ist das *Pysin-only* Protein POP1. Aufgrund seines hohen Homologiegrades mit den PYDs des Adapterproteins ASC wird

vermutet, dass POP1 ebenfalls mit dessen PYDs interagiert und es von der Interaktion mit NLRs wie NLRP3 abhält (Stehlik et al., 2003; Chen und Sun, 2013). Allerdings wurde auch POP1 nicht IFN $\beta$ -abhängig induziert und spielt so wahrscheinlich ebenfalls keine Rolle in der Virus- bzw. IFN $\beta$ -abhängigen Hemmung der Inflammation auf Pneumokokken (Abb. 8B). Eine kürzlich von Khare et al. veröffentlichte Studie zeigte auf, dass das *Pyrin-only* Protein POP3 dazu in der Lage ist, ALR (*AIM2-like receptor*)-Inflammation zu inhibieren und so deren Aktivität als Antwort auf die Erkennung von DNA-Viren zu regulieren (Khare et al., 2014). POP3 wird natürlicherweise allerdings im Gegensatz zu humanen Zellen in Mäusen nicht exprimiert (Khare et al., 2014), sodass hier eventuell weitere funktionelle Orthologe zu suchen und zu untersuchen wären.

Wang et al. beschrieben den Alpha-1-Proteinase-Inhibitor (Serpina1a) als Inhibitor der Caspase-1, welcher *in vitro* die Sekretion von IL-1 $\beta$  verhindert (Wang et al., 2012). Auch Serpina1a wird jedoch in unseren Experimenten nicht IFN $\beta$ -abhängig exprimiert (Abb. 8D).

MFGE8 inhibiert laut Deroide et al. die IL-1 $\beta$ -Reifung und –Sekretion durch das Inflammation mittels seines Rezeptors  $\beta$ 3-Integrin (Deroide et al., 2013). Die Ergebnisse der Untersuchung der MFGE8-Induktion nach IFN $\beta$ -Stimulation jedoch legen nahe, dass auch MFGE8 nicht an der Hemmung des Inflammation durch IFN $\beta$  beteiligt ist (Abb. 8E).

Die Apoptoseinhibitor-Proteine (*inhibitor of apoptosis protein*) cIAP1 (Gen: *Birc2*) und cIAP2 (*Birc3*) nehmen offenbar verschiedene Rollen bei der Regulation des Inflammation ein. Zum einen scheinen sie für die Aktivierung des Inflammation über die aktivierende (nicht degradierende) K63-verknüpfte Polyubiquitylierung von Caspase-1 essentiell zu sein, andererseits sind sie ebenfalls als Inhibitoren von RIP3 beschrieben, welches möglicherweise an der vollständigen Aktivierung des NLRP3-Inflammation beteiligt ist (Labbé et al., 2011; Vince et al., 2012). Die Untersuchung der Genexpression von *Birc3* ergab keine Veränderung durch Stimulation mit IFN $\beta$  (Abb. 8F). Lediglich *Birc2* wurde IFN $\beta$ -abhängig signifikant heraufreguliert (Abb. 8C). Mit den Ergebnissen von Labbé et al. als Grundlage würde diese verstärkte Expression von *Birc2* jedoch eher eine verstärkte Antwort des Inflammation erwarten lassen (Labbé et al., 2011). Die Aussagen von Vince et al. wiederum passen zu den hier erhobenen Daten, wonach die Vermehrung von *Birc2* über eine Inhibition von RIP3 zur indirekten Inhibition des Inflammation führt (Vince et al., 2012). Eventuell genügen bereits basale Level an IAPs aus, um eine suffiziente Antwort des Inflammation via

Ubiquitylierung auszulösen, eine weitere Induktion über die basalen Level hinaus jedoch könnten das Inflammasom eventuell eher inhibieren. Diese These bedarf allerdings experimenteller Bestätigung.

Die meisten getesteten Regulatoren des Inflammasoms werden durch IFN $\beta$  nicht in dem Maße reguliert, um die Inhibition der Inflammasomaktivität erklären zu können. Einzig *Birc2* käme hier als Inhibitor des Inflammasoms in Frage, der durch eine Vorbehandlung mit IFN $\beta$  heraufreguliert wird. Die Studienlage zu *Birc2* ist jedoch schwach und die Ergebnisse nicht vollständig überzeugend, sodass die Rolle von *Birc2* weiterhin unklar bleibt. Um die Beteiligung von *Birc2* an der Hemmung der Inflammasomaktivierung durch Pneumokokken nach Virusinfektion bzw. IFN $\beta$ -Gabe weiter zu eruieren, sollte die Rolle mittels *Birc2*<sup>-/-</sup>-Zellen oder mithilfe spezifischer siRNAs untersucht werden, um klare Hinweise auf das Verhalten der Inflammasome in Abwesenheit dieses Proteins zu erhalten.

#### **4.7 Weitere vermutete Mechanismen der erhöhten Anfälligkeit gegenüber sekundären Infektionen nach Influenza-Infektion**

Zusätzlich zu den bereits genannten könnten weitere Mechanismen für die Inhibition der Inflammasome verantwortlich sein und so zur Beeinträchtigung der Immunantwort auf bakterielle Erreger nach vorangegangener Influenza-Infektion führen.

Es wurde gezeigt, dass Typ I IFN die Resistenz von Zellen gegenüber dem Alphatoxin von *S. aureus* erhöht (Yarovinsky et al., 2008). Das Alphatoxin von *S. aureus* ist als porenbildendes Toxin ein wichtiger Virulenzfaktor und dazu in der Lage, ähnlich wie PLY, das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren (Yarovinsky et al., 2008; Craven et al., 2009). Typ I IFN führt zur Induktion der Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1), was zur Reduktion des Alphatoxin-induzierten Austritts des Inflammasom-Aktivators ATP in den extrazellulären Raum führt (Lizak und Yarovinsky, 2012). Wenn PLSCR1 einen solchen Effekt auf die Wirkung von Alphatoxin hat, stellt sich die Frage, ob dies auch für andere bakterielle porenbildende Toxine wie PLY gilt.

Ein weiterer Mechanismus von IFN $\beta$ , welcher zur Inhibition des Inflammasoms führt, wurde von Inoue et al. untersucht. Sie fanden heraus, dass die Stimulation von IFNAR durch Typ I IFN zur Assoziation des *Suppressor of Cytokine Signalling-1* (SOCS1) mit

aktiviertem Rac1 führt, was die Ubiquitylierung und Degradierung von Rac1 zur Folge hat. Dadurch findet die Rac1-abhängige Generation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Mitochondrien vermindert statt und die NLRP3-Aktivität wird nachfolgend herunterreguliert (Inoue et al., 2012).

MAVS ist ein Adaptermolekül, welches zur optimalen Initiierung der Inflammasomaktivität NLRP3 an die Mitochondrien rekrutiert (Subramanian et al., 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass die (bereits ihrem Namen nach) IFN-abhängigen ISGs an der Regulation von MAVS beteiligt sein könnten, was wiederum einen weiteren potentiellen Mechanismus der Interaktion von IFNs mit dem Inflammasom birgt (Jacobs und Coyne, 2013).

Auch könnte es weitere, bisher unbekannte Möglichkeiten geben, wie IFNs die Inflammasomaktivität beeinflussen.

In den letzten Jahren haben sich viele Arbeitsgruppen mit den zugrundeliegenden Mechanismen der erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Superinfektionen nach Virusinfektion der oberen Atemwege befasst, was zu einer Vielzahl unterschiedlicher weiterer Erklärungsansätze unabhängig von der Aktivität der Inflammasome führte.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist der Gewebs- und Barrierschaden, den die Influenzavirusinfektion durch das Infizieren der Epithelzellen verursacht (Ballinger und Standiford, 2010). Die Epithelzellen sterben im Rahmen der Infektion bei der Freisetzung der Viren, durch Induktion von Apoptose oder durch Einflüsse angeborener Immunzellen ab und hinterlassen Gewebeschäden, wodurch es nachfolgenden Pathogenen wie Bakterien einfacher gelingt, diese Barrieren zu überwinden und zu invasiven Infektionen zu führen (Ballinger und Standiford, 2010). Jamieson et al. berichteten zudem, dass es im Rahmen der viralen Infektion unabhängig vom Kontrollieren des sekundären Erregers durch das angeborene Immunsystem zu einer Insuffizienz beim Schutz und der Reparatur von Geweben kommt und so die Toleranz des Körpers gegenüber Gewebeschäden durch die Koinfektion deutlich abnehme (Jamieson et al., 2013).

Die mukoziliäre Aktivität des respiratorischen Epithels ist eine wichtige erste Hürde des Immunsystems gegen eindringende Pathogene. Die Infektion mit Influenzaviren kann dazu führen, dass zum einen die Anzahl an Zilien auf den Epithelien abnimmt, sich zum anderen jedoch zusätzlich noch die Schlagfrequenz der verbleibenden Zilien vermindert und deren koordinierte Aktivität gestört wird, was ebenfalls die Invasion von

nachfolgenden Pathogenen erleichtert (McCullers, 2006; Ballinger und Standiford, 2010).

*S. pneumoniae* bindet während einer Infektion an den Plättchen-aktivierenden Faktor-Rezeptor (*platelet-activating factor receptor*, PAFr). Dieser Rezeptor wird während einer Influenzainfektion durch proinflammatorische Zytokine induziert und spielt eine Rolle beim Übergang der Pneumonie in eine systemische Verteilung des Erregers, indem er die Adhäsion der Pneumokokken begünstigt (McCullers et al., 2006; Ballinger und Standiford, 2010). Außerdem scheint die virale Neuraminidase ebenfalls die bakterielle Adhäsion zu begünstigen, indem sie durch ihre enzymatische Aktivität zelluläre Oberflächen-Glykoproteine so modifiziert, dass nachfolgende Bakterien besser an ihnen binden können (Peltola et al., 2005).

Viele Ansätze behandeln die Beeinträchtigung des Immunsystems des Wirtes durch die Influenzainfektion, welche in der Folge bakterielle Superinfektionen begünstigt.

Ghoneim et al. untersuchten in einer aktuellen Studie das Verhalten residenter Alveolarmakrophagen nach einer Influenzainfektion. Sie fanden heraus, dass innerhalb der ersten Woche im Verlauf der viralen Infektion mehr als 90% der Alveolarmakrophagen verloren gehen, wobei auch die verbleibenden Makrophagen phänotypisch nekrotisch erscheinen, was die Invasion von Pneumokokken deutlich erleichtert (Ghoneim et al., 2013).

Die Infektion mit Inflanzaviren führt unter anderem zur Induktion von Glukokortikoiden. Diese Glukokortikoide unterdrücken die Immunantwort z. B. durch Verminderung der Sekretion bestimmter Zytokine und Chemokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 oder CCL7, was die Grundlage des Schaffens eines empfindlichen Gleichgewichtes zwischen einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber sekundären bakteriellen Infektionen einerseits und der Verhinderung einer überschießenden Immunantwort im Rahmen der Koinfektion andererseits darstellt (Fantuzzi und Ghezzi, 1993; Jamieson et al., 2010).

Es existieren einige Arbeiten zum Einfluss von IFNs, die im Rahmen der Reaktion des Immunsystems auf die Influenzainfektion ausgeschüttet werden, auf die Entwicklung einer bakteriellen Koinfektion (Sun und Metzger, 2008; Shahangian et al., 2009; Guarda et al., 2011; Nakamura et al., 2011; Li et al., 2012; Chertow und Memoli, 2013). Typ I IFN hat neben den Einflüssen auf die Aktivität des Inflammasoms durch Hemmung der IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretionen auch Auswirkungen auf andere Zytokine und Chemokine. Es konnte gezeigt werden, dass die Chemokine KC und MIP-2, welche zur Chemotaxis neutrophiler Granulozyten wichtig sind, durch virusinduziertes Typ I IFN bei bakterieller

Superinfektion vermindert produziert werden, was zur Beeinträchtigung der antibakteriellen Immunantwort durch neutrophile Granulozyten in der frühen Phase der entstehenden Koinfektion führt (Shahangian et al., 2009).

Nakamura et al. zeigten zudem, dass Virus-induziertes Typ I IFN auch das Chemokin CCL2 durch Typ I IFN während einer bakteriellen Superinfektion hemmt, wodurch die Rekrutierung von Monozyten bzw. Exsudatmakrophagen geschwächt wird (Nakamura et al., 2011). Dies stimmt mit den klinischen Daten von Wadowsky et al. überein, die herausfanden, dass die Kolonisationsrate mit *S. pneumoniae* im Oropharynx von Patienten, welche mit Influenza infiziert wurden, in der Zeit nach der Influenzainfektion anstieg (Wadowsky et al., 1995).

Es wurde zusätzlich gezeigt, dass das durch die Viren induzierte Typ I IFN  $\gamma\delta$ -T-Zellen negativ reguliert, was daraufhin zur verminderten Expression von IL-17 und der verminderten IL-17-abhängigen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt (Li et al., 2012; Metzger und Sun, 2013). Zusätzlich zur Verminderung von IL-17 führt die virale Infektion auch zur Verminderung der Zytokine IL-22 und IL-23, wobei diese Zytokine wichtig für die Reduktion der Entzündungsreaktion in der Lunge und für die Beseitigung der nachfolgenden bakteriellen Invasion sind, sodass sie die Anfälligkeit gegenüber invasiven Koinfektionen nach einer Grippe vermindern (Ivanov et al., 2013; Metzger und Sun, 2013). Robinson et al. betrachten die Verminderung der IL-1 $\beta$ -Sekretion während einer Koinfektion durch die vorangegangene Influenzainfektion als ursächlich für die Verminderung der IL-17- und IL-22-Sekretion (Robinson et al., 2013).

Das Typ II Interferon IFN $\gamma$  wird ebenfalls während einer Influenzainfektion durch die Aktivierung von T-Zellen ausgeschüttet und scheint ebenfalls Auswirkungen auf in der Folge auftretende bakterielle Infektionen zu haben. Sun und Metzger zeigten, dass IFN $\gamma$  die bakterielle Elimination durch Alveolarmakrophagen hemmt, indem es den Scavengerrezeptor MARCO herunterreguliert, welcher für die Erkennung nicht-opsonisierter Pneumokokken notwendig ist (Sun und Metzger, 2008; Metzger und Sun, 2013). So wird auch von Shahangian et al. Typ II IFN für die Hemmung der Makrophagen verantwortlich gemacht, wobei Typ I IFN für die Hemmung der neutrophilen Granulozyten verantwortlich sei (Shahangian et al., 2009).

IFN $\gamma$ -abhängig werden zudem die Expression von iNOS und die Bildung von NO induziert (Hang et al., 2011), worauf auch die Ergebnissen unserer Experimente hinweisen, bei denen die IL-1 $\beta$ -Sekretion durch IFN $\gamma$  iNOS-abhängig gehemmt wird (Abb. 6B). IFN $\gamma$  führt jedoch Eigenbrod et al. zufolge auch NO-unabhängig zu einer

raschen Inhibition der pro-IL-1 $\beta$ -Expression, indem es NF- $\kappa$ B an der Bindung am IL-1 $\beta$ -Promotor hindert (Eigenbrod et al., 2013).

#### 4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit Typ I IFN-induzierenden Influenza A-Viren die Inflammasom-abhängige Zytokinantwort von Makrophagen auf eine nachfolgende Infektion mit *S. pneumoniae* hemmt. Die Ergebnisse der Arbeit geben deutliche Hinweise darauf, dass die Hemmung der durch Pneumokokken stimulierten IL-1 $\beta$ -Produktion abhängig von der Erkennung viraler RNA durch PRRs sowie der nachfolgenden Produktion von Typ I IFNs ist. Die Inhibition der Sekretion Inflammasom-abhängiger Zytokine ist dabei jedoch nicht abhängig von einer Verminderung der Expression der Zytokinproformen sowie der Komponenten des NLRP3- oder AIM2-Inflammasoms und findet unabhängig vom NS1-Protein des Influenzavirus statt. Des Weiteren ist die Hemmung der durch Pneumokokken stimulierten IL-1 $\beta$ -Produktion weitestgehend unabhängig von iNOS sowie der Induktion von Autophagie. Ferner konnte gezeigt werden, dass verschiedene bekannte Regulatoren des Inflammasoms, mit Ausnahme des durch *Birc2* kodierten cIAP1, nicht durch IFN $\beta$  reguliert werden und somit wahrscheinlich nicht an den beschriebenen Effekten beteiligt sind.

Um die Bedeutung und den Mechanismus der Hemmung des NLRP3-Inflammasoms durch Influenza-Viren bzw. IFN $\beta$  besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen *in vivo* sowie *in vitro* nötig. Interessant wären u. a. Experimente, in denen man versuchen könnte, das Inflammasom bei der Koinfektion von Influenza und *S. pneumoniae* experimentell-therapeutisch zu stimulieren, um eine normale Inflammasomantwort zu erhalten.

Bedenkt man die immer noch hohe Morbidität und Mortalität der Influenza- und Pneumokokkeninfektionen, so ist ein tiefgreifendes Verständnis der Mechanismen, die der erhöhten Empfänglichkeit gegenüber Pneumokokken nach Influenza-Infektion zugrunde liegen, dringend notwendig. Dieses Wissen könnte dazu beitragen, neuartige Strategien zur Therapie und Prophylaxe der postinfluenza-Pneumokokkenpneumonie zu entwickeln. Von diesen Erkenntnissen könnte auch bei anderen

Erregerkonstellationen profitiert werden, bei denen eine primäre virale Infektion die Entstehung einer nachfolgenden bakteriellen Koinfektion begünstigt.

## 5 Literaturverzeichnis

Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, Holmskov U, Takahashi K, Stahl GL, Dudler T, Girija UV, Wallis R, Kadioglu A, Stover CM, Andrew PW, Schwaebler WJ. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog* 2012; 8(7): e1002793.

Ambjørn M, Ejlerskov P, Liu Y, Lees M, Jäättelä M, Issazadeh-Navikas S. IFN $\beta$ /interferon- $\beta$ -induced autophagy in MCF-7 breast cancer cells counteracts its proapoptotic function. *Autophagy* 2013; 9(3): 287-302.

Ballinger MN, Standiford TJ. Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30(9): 643-652.

Benincasa M, Mattiuzzo M, Herasimenka Y, Cescutti P, Rizzo R, Gennaro R. Activity of antimicrobial peptides in the presence of polysaccharides produced by pulmonary pathogens. *J Pept Sci* 2009; 15(9): 595-600.

Bhat N, Fitzgerald KA. Recognition of Cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors. *Eur J Immunol* 2014; 44(3): 634-640.

Bogaert D, de Groot R, Herman PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet* 2004; 4(3): 144–154.

Chen S, Sun B. Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein Cell* 2013; 4(4): 251-258.

Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA* 2013; 309(3): 275-282.

Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 2010; 16(2): 228-231.

Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, Ting JP, Duncan JA. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One* 2009; 4(10): e7446.

Crotta S, Davidson S, Mahlakoiv T, Desmet CJ, Buckwalter MR, Albert ML, Staeheli P, Wack A. Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia. *PLoS Pathog* 2013; 9(11): e1003773.

Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 707-735.

Davis KM, Nakamura S, Weiser JN. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3666-3676.

Decker T, Müller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(9): 675-687.

Deroide N, Li X, Lerouet D, Van Vré E, Baker L, Harrison J, Pointhevin M, Masters L, Nih L, Margail I, Iwakura Y, Ryffel B, Pocard M, Tedgui A, Kubis N, Mallat Z. MFGE8 inhibits inflammasome-induced IL-1 $\beta$  production and limits postischemic cerebral injury. *J Clin Invest* 2013; 123(3): 1176-1181.

Dessing MC, Schouten M, Draing C, Levi M, von Aulock S, van der Poll T. Role played by Toll-like receptors 2 and 4 in lipoteichoic acid-induced lung inflammation and coagulation. *J Infect Dis* 2008; 197(2): 245-252.

dos Santos G, Kutuzov MA, Ridge KM. The inflammasome in lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(8): L627-633.

Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol Rev* 2013; 255(1): 25-39.

Eigenbrod T, Bode KA, Dalpke AH. Early inhibition of IL-1 $\beta$  expression by IFN- $\gamma$  is mediated by impaired binding of NF- $\kappa$ B to the IL-1 $\beta$  promoter but is independent of nitric oxide. *J Immunol* 2013; 190(12): 6533-6541.

Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen Y, Hara H, Sakai S, Yamamoto T, Fernandes-Alnemri T, Yang R, Hernandez-Cuellar E, Dewamitta SR, Xu Y, Qu H, Alnemri ES, Mitsuyama M. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol* 2011; 187(9): 4890-4899.

Fantuzzi G, Ghezzi P. Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 1993; 2(4): 263-270.

Farlik M, Reutterer B, Schindler C, Greten F, Vogl C, Müller M, Decker T. Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF- $\kappa$ B transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. *Immunity* 2010; 33(1): 25-34.

Fitzgerald KA. The interferon inducible gene: Viperin. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(1): 131-135.

Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Núñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10(3): 241-247.

Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 2012; 13(4): 325-332.

Franchi L, Warner N, Viani K, Núñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; 227(1): 106-128.

Frazaõ N, Sá-Leão R, de Lencastre H. Impact of a single dose of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on colonization. *Vaccine* 2010; 28(19): 3445-3452.

Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, Taubenberger JK, Bumgarner RE, Palese P, Katze MG, García-Sastre A. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(16): 10736-10741.

Ghoneim HE, Thomas PG, McCullers JA. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *J Immunol* 2013; 191(3): 1250-1259.

Giovannoni G, Miller DH. Multiple sclerosis and its treatment. *J R Coll Physicians Lond* 1999; 33(4): 315-322.

Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Decker T, Du Pasquier RA, Romero P, Tschopp J. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 2011; 34(2): 213-223.

Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5571-5580.

Hang do TT, Song JY, Kim MY, Park JW, Shin YK. Involvement of NF- $\kappa$ B in changes of IFN- $\gamma$ -induced CIITA/MHC-II and iNOS expression by influenza virus in macrophages. *Mol Immunol* 2011; 48(9-10): 1253-1262.

Hayashida H, Toh H, Kikuno R, Miyata T. Evolution of influenza virus genes. *Mol Biol Evol* 1985; 2(4): 289-303.

Henry T, Brotcke A, Weiss DS, Thompson LJ, Monack DM. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J Exp Med* 2007; 204(5): 987-994.

Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, Fang R, Sakai S, Kawamura I, Akira S, Mitsuyama M. Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 2012; 189(11): 5113-5117.

Hirst R, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew P. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138, 195–201.

Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R, Sitter H; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin; Deutsche Gesellschaft für Infektiologie; Kompetenznetzwerk CAPNETZ. S3-Leitlinien zu Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobieller Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen. *Pneumologie* 2009; 63(10): e1-e68.

Högberg L, Geli P, Ringberg H, Melander E, Lipsitch M, Ekdahl K. Age- and serogroup-related differences in observed durations of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 948-952.

Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* 2010; 78(2): 704–715.

Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* 2009; 206(1): 79-87.

Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 404-410.

Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, Iwasaki A. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(13): 5354-5359.

Inoue M, Shinohara ML. The role of interferon- $\beta$  in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis - in the perspective of inflammasomes. *Immunology* 2013; 139(1): 11-18.

Inoue M, Williams KL, Oliver T, Vandenabeele P, Rajan JV, Miao EA, Shinohara ML. Interferon- $\beta$  therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal* 2012; 5(225): ra38.

Ivanov S, Renneson J, Fontaine J, Barthelemy A, Paget C, Fernandez EM, Blanc F, De Trez C, Van Maele L, Dumoutier L, Huerre MR, Eberl G, Si-Tahar M, Gosset P, Renaud JC, Sirard JC, Faveeuw C, Trottein F. Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection. *J Virol* 2013; 87(12): 6911-6924.

Jacobs JL, Coyne CB. Mechanisms of MAVS Regulation at the Mitochondrial Membrane. *J Mol Biol* 2013; 425(24): 5009-5019.

Jamieson AM, Pasman L, Yu S, Gamradt P, Homer RJ, Decker T, Medzhitov R. Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection. *Science* 2013; 340(6137): 1230-1234.

Jamieson AM, Yu S, Annicelli CH, Medzhitov R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2010; 7(2): 103-114.

Jefferies JM, Johnston CH, Kirkham LA, Cowan GJ, Ross KS, Smith A, Clarke SC, Brueggemann AB, George RC, Pichon B, Pluschke G, Pfluger V, Mitchell TJ. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis* 2007; 196(6): 936-944.

Jewell NA, Vaghefi N, Mertz SE, Akter P, Peebles RS Jr, Bakaletz LO, Durbin RK, Flaño E, Durbin JE. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo. *J Virol* 2007; 81(18): 9790-9800.

Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 2002; 76(1): 105-115.

Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and Lower Respiratory Tract Infection by *Streptococcus pneumoniae* Is Affected by Pneumolysin Deficiency and Differences in Capsule Type. *Infect Immun* 2002; 70(6): 2886-2890.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology* 2008; 6: 288-301.

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441(7089): 101-105.

Kerr AR, Irvine JJ, Search JJ, Gingles NA, Kadioglu A, Andrew PW, McPheat WL, Booth CG, Mitchell TJ. Role of inflammatory mediators in resistance and susceptibility to pneumococcal infection. *Infect Immun* 2002; 70(3): 1547-1557.

Khare S, Ratsimandresy RA, de Almeida L, Cuda CM, Rellick SL, Misharin AV, Wallin MC, Gangopadhyay A, Forte E, Gottwein E, Perlman H, Reed JC, Greaves DR, Dorfleutner A, Stehlik C. The PYRIN domain-only protein POP3 inhibits ALR inflammasomes and regulates responses to infection with DNA viruses. *Nat Immunol* 2014; 15(4): 343-353.

Koppe U, Högner K, Doehn JM, Müller HC, Witzentrath M, Gutbier B, Bauer S, Pribyl T, Hammerschmidt S, Lohmeyer J, Suttorp N, Herold S, Opitz B. *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol* 2012a; 188(2): 811-817.

Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol* 2012b; 14(4): 460-466.

Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(5): 985-992.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30(1): 16-34.

Labbé K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* 2011; 35(6): 897-907.

Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, Chang MW, Beckman SK, Cook AD, Hamilton JA. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* 2012; 188(11): 5752-5765.

Lee CJ, Banks SD, Li JP. Virulence, Immunity, and Vaccine Related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev Microbiol* 1991; 18(2): 89-114.

Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, Snapper CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol* 2007; 245(2): 103-110.

Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; 469(7330): 323-335.

Lewis RS, Kolesnik TB, Kuang Z, D'Cruz AA, Blewitt ME, Masters SL, Low A, Willson T, Norton RS, Nicholson SE. TLR regulation of SPSB1 controls inducible nitric oxide synthase induction. *J Immunol* 2011; 187(7): 3798-3805.

Li W, Moltedo B, Moran TM. Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of  $\gamma\delta$  T cells. *J Virol* 2012; 86(22): 12304-12312.

Lizak M, Yarovinsky TO. Phospholipid scramblase 1 mediates type I interferon-induced protection against staphylococcal  $\alpha$ -toxin. *Cell Host Microbe* 2012; 11(1): 70-80.

Lock RA, Zhang QY, Berry AM, Paton JC. Sequence variation in the *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. *Microb Pathog* 1996; 21(2): 71-83.

Ludwig S, Planz O, Pleschka S, Wolff T. Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? *Cell - Trends Mol Med* 2003; 9(2): 46-52.

Lynch JP, Zhanell GG: *Streptococcus pneumoniae*. Epidemiology, Risk Factors, and Strategies for Prevention. *Semin Respir Crit Care Med* 2009; 30(2): 189-209.

McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 571-582.

McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol* 2009; 86(4): 803-812.

McNeela EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, Ferreira D, Smeaton S, El-Rachkidy R, McLoughlin RM, Mori A, Moran B, Fitzgerald KA, Tschopp J, Pétrilli V, Andrew PW, Kadioglu A, Lavelle EC. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog* 2010; 6(11): e1001191.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000a; 173: 89-97.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000b; 343(5): 338-344.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449(7164): 819-826.

Metzger DW, Sun K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J Immunol* 2013; 191(5): 2047-2052.

Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo YM, Cárdenas WB, Gale M Jr, García-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* 2007; 81(2): 514-524.

Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Sasseti CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 $\beta$ . *Nat Immunol* 2013; 14(1): 52-60.

Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 411–418.

Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Rafail S, Chrysanthopoulou A, Speletas M, Ritis K. Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2010; 40(5): 1461-1472.

Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *J Infect Dis* 2008; 198(7): 962–970.

Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 2013; 38(6): 1142-1153.

Nakamura S, Davis KM, Weiser JN. Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3657-3665.

Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* 2007; 75(1): 83-90.

Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, Mayer-Barber KD, Myers TG, Rabin RL, Trinchieri G, Sher A, Feng CG. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages. *J Immunol* 2011; 187(5): 2540-2547.

Opitz B, Püschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, Schumann RR, Suttorp N, Hippenstiel S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae. *J Biol Chem* 2004; 279(35): 36426-36432.

Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, Eckhard J, Vinzing M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Wolff T. IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol* 2007; 9(4): 930-938.

Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(12): 1294-1309.

Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009; 30(11): 513-521.

Peltola VT, Murti KG, McCullers JA. Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia. *J Infect Dis* 2005; 192(2): 249-257.

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314(5801): 997-1001.

Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J Immunol* 1999; 162(12): 7322-7329.

Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 2012; 13(4): 333-342.

Ricci S, Gerlini A, Pammolli A, Chiavolini D, Braione V, Tripodi SA, Colombari B, Blasi E, Oggioni MR, Peppoloni S, Pozzi G. Contribution of different pneumococcal virulence factors to experimental meningitis in mice. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13: 444.

Robert Koch-Institut. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: August 2013. *Epidem Bull* 2013; 34: 313-344.

Robinson KM, Choi SM, McHugh KJ, Mandalapu S, Enelow RI, Kolls JK, Alcorn JF. Influenza A Exacerbates *Staphylococcus aureus* Pneumonia by Attenuating IL-1 $\beta$  Production in Mice. *J Immunol* 2013; 191(10): 5153-5159.

Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RA, Smith DJ. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science* 2008; 320(5874): 340-346.

Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human  $\beta$ -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res* 2012; 38(2): 100-110.

Schmeisser H, Fey SB, Horowitz J, Fischer ER, Balinsky CA, Miyake K, Bekisz J, Snow AL, Zoon KC. Type I interferons induce autophagy in certain human cancer cell lines. *Autophagy* 2013; 9(5): 683-696.

Schrauwen EJ, de Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; [Epub ahead of print].

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140(6): 821-832.

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274(25): 17406-17409.

Shahangian A, Chow EK, Tian X, Kang JR, Ghaffari A, Liu SY, Belperio JA, Cheng G, Deng JC. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(7): 1910-1920.

Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 2012; 13(3): 255-263.

Smith AM, Adler FR, Ribeiro RM, Gutenkunst RN, McAuley JL, McCullers JA, Perelson AS. Kinetics of coinfection with influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 2013; 9(3): e1003238.

Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, Egorov A. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1 $\beta$  and 18. *J Gen Virol* 2005; 86: 185-195.

Stehlik C, Krajewska M, Welsh K, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J* 2003; 373(1): 101-113.

Stöhr K. Preventing and treating influenza. *BMJ* 2003; 326(7401): 1223-1224.

Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 2013; 153(2): 348-361.

Sun K, Metzger DW. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med* 2008; 14(5): 558-564.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140(6): 805-820.

Tian X, Xu F, Lung WY, Meyerson C, Ghaffari AA, Cheng G, Deng JC. Poly I:C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria. *PLoS One* 2012; 7(9): e41879.

Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 2005; 121(2): 247-256.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013; 9(10): e1003657.

Vahlenkamp TW, Harder TC. Influenza virus infections in mammals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119(3-4):123-131.

van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009; 374: 1543-1556.

Veeranki S, Duan X, Panchanathan R, Liu H, Choubey D. IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes. *PLoS One* 2011; 6(10): e27040.

Vince JE, Wong WW, Gentle I, Lawlor KE, Allam R, O'Reilly L, Mason K, Gross O, Ma S, Guarda G, Anderton H, Castillo R, Häcker G, Silke J, Tschopp J. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* 2012; 36(2): 215-227.

Wadowsky RM, Mietzner SM, Skoner DP, Doyle WJ, Fireman P. Effect of experimental influenza A virus infection on isolation of *Streptococcus pneumoniae* and other aerobic bacteria from the oropharynxes of allergic and nonallergic adult subjects. *Infect Immun* 1995; 63(4): 1153-1157.

Wang Y, He Y, Abraham B, Rouhani FN, Brantly ML, Scott DE, Reed JL. Cytosolic, autocrine alpha-1 proteinase inhibitor (A1PI) inhibits caspase-1 and blocks IL-1 $\beta$  dependent cytokine release in monocytes. *PLoS One* 2012; 7(11): e51078.

Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 2007; 9(5): 1162-1171.

Weinberger DM, Dagan R, Givon-Lavi N, Regev-Yochay G, Malley R, Lipsitch M. Epidemiologic evidence for serotype-specific acquired immunity to pneumococcal carriage. *J Infect Dis*. 2008; 197(11): 1511-1518.

Weinheimer VK, Becher A, Tönnies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, Hocke AC. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J Infect Dis* 2012; 206(11): 1685-1694.

White MR, Doss M, Boland P, Tecele T, Hartshorn KL. Innate immunity to influenza virus: implications for future therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 2008; 4(4): 497-514.

Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3

inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2011; 187(1): 434-440.

Wolff T, Ludwig S. Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29(9): 549-557.

World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82: 93–104.

Yarovinsky TO, Monick MM, Husmann M, Hunninghake GW. Interferons increase cell resistance to Staphylococcal alpha-toxin. *Infect Immun* 2008; 76(2): 571-577.

Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P, Wu J, Juliana C, Solorzano L, McCormick M, Zhang Z, Alnemri ES. Pylrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell* 2007; 28(2): 214-227.

Zhu X, Yu W, McBride R, Li Y, Chen LM, Donis RO, Tong S, Paulson JC, Wilson IA. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(4): 1458-1463.

Zinzula L, Tramontano E. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: Hide, mask, hit. *Antiviral Res* 2013; 100(3): 615-635.

## 6 Anhang

### Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Phillip Brenya Sasu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema “Einfluss von Influenza A-Viren auf die Inflammation-abhängige Zytokinproduktion in der nachfolgenden Pneumokokkeninfektion” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Ort und Datum

---

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

Ich möchte diese letzte Seite meiner Dissertation dazu nutzen, mich bei den Personen zu bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und diese Arbeit so möglich gemacht haben.

Zuerst möchte ich Prof. Bastian Opitz meinen herzlichen Dank aussprechen, der es mir ermöglicht hat, als Mitglied seiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden Thema zu arbeiten und der mir als Betreuer jederzeit mit Ratschlägen und Ideen zur Seite stand. Außerdem danke ich Prof. Norbert Suttorp dafür, dass ich diese Arbeit in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie durchführen durfte.

Sehr viel bedeutet hat mir in meiner Laborzeit die stets positive Atmosphäre, die vor allem durch die zahlreichen netten Kollegen und Weggefährten ausgemacht wurde und sich nicht nur auf das Labor beschränkte. Zum einen geht dieser Dank an die restlichen Mitglieder der AG Opitz: Anne, Catherine, Claudia, Elena, Jan und Oliver. Zum anderen möchte ich aber auch einigen Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen aufrichtig für ihre Unterstützung in jedweder Form danken, was insbesondere für Andrea, Christin, Elisa, Janine, Kathrin, Leif, Mara und Toni gilt. Von allen Seiten erfuhr ich stets Anerkennung und Unterstützung – sowohl fachlicher Art in Form von Ratschlägen, wertvollen Diskussionen, dem Lehren verschiedenster Techniken oder dem bloßen Inkubieren von Kokken, als auch persönlicher Art z. B. durch gemütliches Beisammensitzen mit Kaffee und Kuchen oder aufmunternde Worte.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern einen ganz besonderen Dank für ihre stets bedingungslose Unterstützung in jeglicher Form aussprechen. Ohne Euch und Euer Verständnis hätte ich diese Fragestellung niemals bearbeiten können. Vielen Dank!

Und ebenfalls vielen Dank an all die anderen Menschen, die ihren Teil dazu beigetragen haben, mich in den letzten Jahren bei Laune zu halten.

Dankeschön!