

Aus dem Institut für Lungenforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd T. Schmeck
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Globale Expressionsprofile
Pneumokokken-infizierter Bronchialepithelzellen –
Einfluss der miRNA-3135b und des
Nicotinamidstoffwechselweges auf
die bakterielle Replikation

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

André Wesener

aus Ueckermünde

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
07.08.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Bernd Schmeck

Korreferent: Prof. Dr. Markus Schnare

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	- 3 -
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	- 6 -
TABELLENVERZEICHNIS.....	- 8 -
1 EINLEITUNG	- 9 -
1.1 Die Pneumonie.....	- 9 -
1.2 Das Bakterium <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 10 -
1.2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> als Krankheitserreger	- 10 -
1.2.2 Bakteriell-virale Koinfektionen	- 12 -
1.2.3 Epitheliale Erkennung von <i>S. pneumoniae</i> -Infektionen	- 14 -
1.2.4 Globale Analysen nach Infektion mit Streptokokken	- 17 -
1.3 Die humane Lunge als <i>ex vivo</i> Modell	- 19 -
1.4 Die Bedeutung des Energiestoffwechsels in Infektionen	- 20 -
1.5 microRNAs	- 23 -
1.5.1 Biogenese und Funktion von microRNAs	- 24 -
1.5.2 microRNAs in Erkrankungen.....	- 25 -
1.5.3 microRNAs in Streptokokkeninfektionen	- 28 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	- 29 -
2 ERGEBNISSE	- 30 -
2.1 Humanes Lungengewebe als <i>ex vivo</i> Infektionsmodell.....	- 30 -
2.1.1 Inflammatorische Reaktionen auf <i>S. pneumoniae</i> -Infektionen.....	- 30 -
2.1.2 Inflammatorische Reaktionen auf Influenza- <i>S. pneumoniae</i> -Koinfektionen.....	- 32 -
2.2 Etablierung der <i>Streptococcus pneumoniae</i> Infektion in BEAS-2B Zellen	- 34 -
2.3 Gewinnung der Hochdurchsatzdaten	- 37 -
2.3.1 Untersuchung des Transkriptom von BEAS-2B Zellen nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	- 37 -

2.3.2	Untersuchung des Proteoms von BEAS-2B Zellen nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion	42 -
2.3.3	Untersuchung des miRNA-Profiles von BEAS-2B Zellen nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion	47 -
2.4	Überexpression der miRNA-3135b in BEAS-2B Zellen und der Einfluss auf	
	<i>S. pneumoniae</i>.....	52 -
2.4.1	Erfolgreiche Überexpression der miRNA-3135b hemmt das Wachstum von <i>S. pneumoniae</i> ..	52 -
2.4.2	Nicotinamidstoffwechsel-Genexpression nach miRNA-3135b Überexpression nicht beeinflusst	54 -
2.4.3	Ziel-mRNA-Identifizierung nach miRNA-3135b Überexpression	57 -
2.5	Beeinflussung der <i>S. pneumoniae</i>-Replikation durch Änderungen im	
	Nicotinamidstoffwechsel von BEAS-2B Zellen	61 -
2.5.1	Regulationen der mRNAs des Nicotinamidstoffwechsels im Lungenmodell.....	62 -
2.5.2	Erfolgreiche Depletion von NAMPT bewirkt keinen Vitalitätsverlust in BEAS-2B Zellen..	65 -
2.5.3	Depletion von NAMPT führt zu signifikanten Expressions-änderungen weiterer Gene des Nicotinamidmetabolismus.....	68 -
2.5.4	Reduziertes Wachstum von <i>S. pneumoniae</i> nach Depletion von NAMPT in BEAS-2B Zellen...	69 -
2.5.5	Depletion von NAMPT reduziert die inflammatorische Antwort der BEAS-2B Zellen.....	70 -
2.5.6	Auswirkungen der NAMPT Depletion nach inflammatorischen Stimuli.....	71 -
2.5.7	Nicotinamid-Mononukleotid fördert das Wachstum von <i>S. pneumoniae</i>	74 -
3	DISKUSSION	77 -
3.1	Humanes Lungengewebe als <i>ex vivo</i> Infektionsmodell.....	77 -
3.1.1	Präklinische Faktoren beeinflussen das Transkriptom des humanen <i>ex vivo</i> Lungengewebes erheblich.....	77 -
3.1.2	Grenzen des <i>ex vivo</i> Modells und alternative Möglichkeiten.....	79 -
3.1.3	Beeinflussung von Genexpressionen im Gewebeverband	81 -
3.2	Expressionsprofil-Analysen ergaben Pneumokokken-spezifische Muster	82 -
3.2.1	<i>S. pneumoniae</i> -spezifische Genregulation zum späten Infektionszeitpunkt.....	82 -
3.2.2	Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> führt zu wenigen Änderungen des Protein-Expressionsprofils..	85 -
3.2.3	<i>S. pneumoniae</i> -spezifisches miRNA-Profil mit vielen hoch-nummerierten miRNAs zum späten Infektionszeitpunkt	86 -
3.2.4	Verknüpfung der Datensätze ergibt nur wenige Interaktionen	89 -
3.3	Die Expression der miRNA-3135b hemmt die Replikation von <i>S. pneumoniae</i>... -	89 -
3.3.1	miRNAs als pro- und anti-infektiöse Faktoren.....	90 -

3.3.2	Die miRNA-3135b im klinischen Kontext.....	- 91 -
3.3.3	Netzwerk liefert vielversprechende Ziel-mRNAs für die miRNA-3135b	- 93 -
3.3.4	Die miRNA-3135b als neues therapeutisches Ziel	- 95 -
3.4	Der Nicotinamid-Stoffwechselweg beeinflusst die Replikation von <i>S. pneumoniae</i>	- 96 -
3.4.1	Zusammenhänge zwischen Metabolismus und Erkrankungen	- 96 -
3.4.2	Wirtsveränderungen durch Pathogene	- 98 -
3.4.3	Modulation der Pneumokokken-Replikation durch NAMPT und NMN.....	- 99 -
3.4.4	Auswirkungen auf den NAD-Haushalt der Zelle	- 102 -
3.4.5	Beeinflussung des NAD-Metabolismus als alternative Therapie-Strategie	- 105 -
3.5	Fazit	- 107 -
3.6	Ausblick.....	- 108 -
4	MATERIAL UND METHODEN.....	- 109 -
4.1	Materialien	- 109 -
4.1.1	Geräte.....	- 109 -
4.1.2	Materialien	- 110 -
4.1.3	Chemikalien und Agenzien	- 111 -
4.1.4	Puffer und Medien.....	- 112 -
4.1.4.1	Medien und Agenzien in der Zellkultur und Bakteriologie	- 112 -
4.1.4.2	Puffer, Gele und Agenzien in der Molekularbiologie.....	- 113 -
4.1.5	Primer (Fa. Metabion)	- 114 -
4.1.6	TaqMan-microRNA-Sonden (Fa. Life technologies).....	- 115 -
4.1.7	<i>small interfering RNAs</i> (siRNAs) und miRNA <i>mimics</i>	- 115 -
4.1.8	Antikörper zur Western Blot Analyse	- 115 -
4.1.9	Kits	- 116 -
4.1.10	Bakterienstämme und Influenzastränge.....	- 116 -
4.1.11	Software.....	- 116 -
4.2	Methoden	- 117 -
4.2.1	Zellbiologische Methoden	- 117 -
4.2.1.1	Kultivierung von BEAS-2B Zellen.....	- 117 -
4.2.1.2	Transfektionen	- 117 -
4.2.1.3	Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 119 -
4.2.1.4	Stimulation und Infektion von BEAS-2B Zellen	- 119 -
4.2.1.5	<i>Ex vivo</i> Infektion von humanem Lungengewebe	- 120 -
4.2.1.6	Ermittlung der initialen Bakterienmenge (<i>Input-Plattierung</i>).....	- 121 -

4.2.1.7	Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (<i>CFU-Assay</i>).....	- 121 -
4.2.1.8	Wachstumskurven von <i>S. pneumoniae</i>	- 121 -
4.2.2	Molekularbiologische und biochemische Methoden	- 121 -
4.2.2.1	RNA-Isolierung	- 121 -
4.2.2.2	Reverse-Transkriptase (RT-) und qualitative PCR (qPCR).....	- 123 -
4.2.2.3	Proteinisolierung.....	- 126 -
4.2.2.4	Proteinbestimmung mittels BCA-Methode	- 127 -
4.2.2.5	Proteinprofil-Analyse	- 127 -
4.2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	- 128 -
4.2.2.7	Western Blot	- 129 -
4.2.2.8	<i>Enzyme-linked-immunosorbent Assay</i> (ELISA)	- 130 -
4.2.2.9	Durchflusszytometrische Zytotoxizitätsbestimmung.....	- 130 -
4.3	Statistik	- 131 -
4.3.1	Statistische Auswertung der Zellkultur- und Gewebeanalysen.....	- 131 -
4.3.2	Statistik der Hochdurchsatzdaten	- 131 -
4.3.2.1	Proteinprofil-Analyse	- 131 -
4.3.2.2	Transkriptomanalyse	- 132 -
4.3.2.3	miRNA-Profil-Analyse.....	- 132 -
4.3.2.4	Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis, PCA</i>)	- 132 -
4.3.2.5	<i>Heatmaps</i> des miRNA-Profiles.....	- 132 -
5	APPENDIX	- 134 -
	REFERENZEN	- 135 -
	CURRICULUM VITAE	ENTFERNT
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	- 160 -
	DANKSAGUNG	- 161 -
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	ENTFERNT

ZUSAMMENFASSUNG

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*), auch als Pneumococcus bezeichnet, ist ein grampositives Bakterium, welches gewöhnlich als Kommensale asymptomatisch den humanen Nasopharynx besiedelt, jedoch auch schwere Erkrankungen bis hin zur Sepsis oder Meningitis auslösen kann. Pneumokokken sind Hauptverursacher der Pneumonie beim Menschen und fordern jährlich mehrere Millionen Opfer weltweit. Weiterhin können Koinfektionen mit Influenza A Viren die Erkrankung verschlimmern. Die Epithelzellen des humanen Respirationstraktes bilden die erste Verteidigungsbarriere gegen die Infektion. Es sind jedoch viele Aspekte der Interaktion zwischen Epithelzellen und *S. pneumoniae* noch nicht umfassend geklärt.

Um diese Interaktion detailliert zu analysieren, wurde ein Expressionsprofil aus mRNAs, Proteinen und miRNAs von infizierten Bronchialepithelzellen erstellt. Zusätzlich wurde ein Koinfektionsmodell in humanem *ex vivo* Lungengewebe zu Vergleichszwecken untersucht. Signalweg-Analysen der infizierten Epithelzellen ergaben eine verstärkte Regulation des Zellzyklus zum späten Zeitpunkt der Infektion (16 h). Eine Vernetzung der Daten mit dem miRNA-Profil offenbarte wenige, bereits bekannte Verknüpfungen.

Dennoch konnten mit Hilfe der miRNA-Untersuchungen behandlungsabhängige Expressionsmuster detektiert werden, welche *S. pneumoniae*-spezifische miRNAs, wie die induzierte miRNA-3135b, aufzeigten. Bei dieser hypothetischen miRNA könnte es sich tatsächlich um ein t-RNA-deriviertes Fragment (tRF) handeln. Eine Überexpression der miRNA-3135b resultierte in einer signifikanten Reduktion der Pneumokokken-Last, was auf einen Abwehrmechanismus der Epithelzellen hindeutet. Zudem zeigte die RNA-Sequenzierung nach miRNA-3135b-Überexpression verschiedene putative Ziel-mRNAs, deren Funktionen bisher nur eingeschränkt bekannt sind.

Des Weiteren weisen funktionelle Analysen der mRNAs und Proteine auf eine Regulation des Nicotinamidmetabolismus hin. Die in den Epithelzellen durchgeführte Depletion von NAMPT, dem Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges, führte zu einer verminderten Replikation von *S. pneumoniae*. Weiterhin bewirkte die Zugabe von Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) eine gesteigerte Replikationsrate der Bakterien. Dies deutet auf NMN als wichtige Nährstoffquelle von Pneumokokken hin.

Die Daten dieser Arbeit erweitern die Kenntnisse zur Interaktion von humanen Epithelzellen und Pneumokokken und könnten zur Identifizierung alternativer und neuer Therapiestrategien genutzt werden.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae, the pneumococcus, is a gram-positive bacterium that colonizes the human nasopharynx as a commensal, in most cases asymptotically, but can also cause severe diseases, including sepsis or meningitis. Pneumococci are major pathogens of human pneumonia, causing millions of death each year worldwide. Furthermore, co-infections with Influenza A viruses can worsen the disease. Increasing abundance of antibiotics resistance makes treatment more and more difficult. The epithelial cells of the human respiratory tract are the first line of defense against the infection. However, many aspects of the interaction between epithelial cells and *S. pneumoniae* have not been fully elucidated yet.

To analyze this interaction in detail, an expression profile of mRNAs, proteins and miRNAs of infected bronchial epithelial cells has been created. In addition, a co-infection model in human *ex vivo* lung tissue was investigated for comparison. Pathway analysis of the infected epithelial cells revealed an up-regulation of cell cycle associated molecules at 16 h post infection. Linking of the data with the miRNA profile revealed mainly known interaction partners.

However, treatment-dependent expression patterns of miRNAs have been detected, which revealed miRNAs specifically induced by *S. pneumoniae*, but not isolated TLR2-ligation, such as miRNA-3135b. Overexpression of miRNA-3135b resulted in a significant reduction in pneumococcal load, suggesting involvement of a defense mechanism of epithelial cells. In addition, RNA sequencing after miRNA-3135b overexpression revealed various putative target mRNAs, whose functions are currently only partially known. It is currently still under investigation if miRNA-3135b is a *bona fide* miRNA or a t-RNA-derived fragment (tRF).

Furthermore, functional analyses of regulated mRNAs and proteins indicated involvement of the nicotinamide metabolism. In epithelial cells, depletion of NAMPT, the key enzyme of this pathway, resulted in a reduced replication of *S. pneumoniae*. Moreover, the addition of nicotinamide mononucleotide (NMN) caused an increased rate of bacterial replication. This suggests NMN might be an important nutrient source of pneumococci.

The data from this work extends the understanding of the interaction of human epithelial cells and pneumococci, and might be useful for the identification of alternative or adjuvant therapeutic strategies.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro-
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bichinonsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
ca.	zirka
cDNA	DNA-Kopie (<i>copy DNA</i>)
CT	Zyklen Grenzwert (<i>Cycle-Threshold</i>)
Ktr	Kontrolle
CXCL	CXC-Motiv Chemokin Ligand (<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNAMPT	extrazelluläre Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
Fa.	Firma
FC	<i>fold change</i> (relative Expressionsänderung)
FKS	Fetales Kälberserum
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)
HxNx	Hämagglutinin x und Neuraminidase x von Influenza A Viren
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IAV	Influenza A Virus
IL	Interleukin
K	Kilo-
KbE	Kolonien-bildende Einheiten (<i>CFU</i>)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LP	Lipoprotein

LTA	Lipoteichonsäure (<i>lipoteichoic acid</i>)
LytA	Autolysin
m	Meter
M	Molar
m	milli-
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
miRNA	microRNA
MNA	1-Methylnicotinamid
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>Multiplicity of infection</i>)
mRNA	messenger RNA
n	nano-
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAM	Nicotinamid
NAMPT	Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase
NF-κB	nukleärer Faktor kappa-leichte-Ketten-Verstärker aktivierter B-Zellen (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>)
NMN	Nicotinamid-Mononukleotid
NMNAT	Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase
NNMT	Nicotinamid N-Methyltransferase
NP40	Nonidet P 40 <i>substitutue</i>
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p	piko-
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
Ply	Pneumolysin
PGG ₂ /PGH ₂	Prostaglandin G ₂ /H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PPWP	Phosphoproteinwaschpuffer

PRR	Mustererkennungs-Rezeptor (<i>pattern-recognition receptor</i>)
rev.	rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPS18	ribosomales Protein S 18
<i>S. p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>S. pneumoniae</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
siRNA	kleine eingreifende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SOD2	Superoxid-Dismutase 2
spec.	Spezies
SV-40	Adenovirus 12-Simian-Virus 40
T/E	Trypsin/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
THY	Todd-Hewitt-Broth mit Hefeextrakt
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UP-Wasser	<i>Ultra-pure</i> Wasser
UTR	untranslatierte Region
xg	x-fache der Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Schematischer und vereinfachter Ausschnitt des Nicotinamidmetabolismus. ..	- 21 -
Abbildung 2-1: Inflammatorische Reaktion von humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	- 31 -
Abbildung 2-2: Inflammatorische Reaktion von humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit Influenza A Viren (H1N1 oder H3N2) und/oder <i>S. pneumoniae</i>	- 33 -
Abbildung 2-3: Durchflusszytometrische Analyse der Zytotoxizität und CXCL8-Sekretion gemessen via ELISA von infizierten BEAS-2B Zellen.....	- 36 -
Abbildung 2-4: Biotypen, Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Venn-Diagramme der <i>Microarray</i> -Analyse von BEAS-2B Zellen nach LP-Stimulation oder <i>S. pneumoniae</i> -Infektion. .	- 39 -
Abbildung 2-5: Balkendiagramme signifikant regulierter mRNAs in BEAS-2B Zellen nach LP-Behandlung oder <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	- 42 -
Abbildung 2-6: Proteomanalyse von <i>S. pneumoniae</i> -infizierten BEAS-2B Zellen.....	- 43 -
Abbildung 2-7: Validierung der Proteomanalyse am Beispiel von NAMPT.....	- 45 -
Abbildung 2-8: Balkendiagramme signifikant regulierter mRNAs in BEAS-2B Zellen nach LP-Behandlung oder <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	- 46 -
Abbildung 2-9: Hauptkomponentenanalyse (PCA) und <i>heatmaps</i> signifikant regulierter miRNAs von BEAS-2B Zellen nach LP- oder <i>S. pneumoniae</i> -Behandlung.....	- 49 -
Abbildung 2-10: Balkendiagramme zum Nachweis spezifisch regulierter miRNAs in BEAS-2B Zellen nach LP-Behandlung oder <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	- 51 -
Abbildung 2-11: CXCL8-Sekretion und Effizienz der miRNA-3135b Überexpression von BEAS-2B Zellen mit und ohne Infektion sowie KbE-Bestimmung von <i>S. pneumoniae</i> im Überstand von BEAS-2B Zellen.....	- 53 -
Abbildung 2-12: Analyse der Expressionsänderungen von mRNAs des Nicotinamidstoffwechselweges in BEAS-2B Zellen nach miRNA-3135b Überexpression und <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	- 56 -
Abbildung 2-13: Venn-Diagramm der signifikant deregulierten Sequenzen nach Überexpression der miRNA-3135b in BEAS-2B Zellen mit und ohne <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.	- 57 -
Abbildung 2-14: Netzwerkbildung zur Veranschaulichung putativer Interaktionen der mRNAs aus dem Venn Diagramm.	- 60 -

Abbildung 2-15: Analyse der Expressionsänderungen von mRNAs des Nicotinamidstoffwechselweges und die relative Proteinexpressionsrate von NAMPT in humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	- 63 -
Abbildung 2-16: Analyse der Expressionsänderung von mRNAs des Nicotinamidstoffwechselweges und die relative Proteinexpressionsrate von NAMPT in humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit Influenza A Viren (H1N1 oder H3N2) und/oder <i>S. pneumoniae</i>	- 64 -
Abbildung 2-17: Effekt des NAMPT <i>knockdowns</i> auf die Zytotoxizität von BEAS-2B Zellen und Nachweis der <i>knockdown</i> Effizienz auf RNA- und Proteinebene.	- 66 -
Abbildung 2-18: Effekt des NAMPT <i>knockdowns</i> auf mRNAs des Nicotinamidstoffwechsels. ...	- 68 -
Abbildung 2-19: Effekt des NAMPT <i>knockdowns</i> auf die Replikation von <i>S. pneumoniae</i> ..	- 70 -
Abbildung 2-20: Effekt des NAMPT <i>knockdowns</i> auf die inflammatorische Antwort von BEAS-2B Zellen.	- 71 -
Abbildung 2-21: Auswirkungen des NAMPT <i>knockdowns</i> auf Regulationen von BEAS-2B Zellen nach Behandlung mit inflammatorischen Stimuli.	- 73 -
Abbildung 2-22: Wachstumsversuche von <i>S. pneumoniae</i> in Suspensionen aus sonifizierten BEAS-2B Zellen mit und ohne additivem NMN.	- 75 -
Abbildung 3-1: Schematisches Modell zum Einfluss von Nicotinamid-Mononukleotid auf <i>S. pneumoniae</i>	- 107 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1: Adressierte Signalwege der Transkriptom-Analyse	- 40 -
Tabelle 2-2: Darstellung der angereicherten Signalwege der Proteom-Analyse	- 44 -
Tabelle 2-3: Transkripte der bioinformatischen Vorhersage von Ziel-mRNAs der miRNA-3135b	- 55 -
Tabelle 2-4: Sequenzen aus dem Venn-Diagramm.....	- 58 -
Tabelle 4-1: Auflistung verwendeter Laborgeräte	- 109 -
Tabelle 4-2: Auflistung verwendeter Materialien	- 110 -
Tabelle 4-3: Auflistung verwendeter Chemikalien und Agenzien.....	- 111 -
Tabelle 4-4: Auflistung verwendeter Medien.....	- 112 -
Tabelle 4-5: Auflistung verwendeter Agenzien	- 113 -
Tabelle 4-6: Auflistung verwendeter Puffer, Gele und Agenzien	- 113 -
Tabelle 4-7: Auflistung verwendeter qPCR-Primer	- 114 -
Tabelle 4-8: Auflistung verwendeter TaqMan-Sonden	- 115 -
Tabelle 4-9: Auflistung verwendeter siRNAs und miRNA mimics.....	- 115 -
Tabelle 4-10: Auflistung verwendeter Antikörper	- 115 -
Tabelle 4-11: Auflistung der verwendeten Kits	- 116 -
Tabelle 4-12: Auflistung verwendeter Erregerstämme	- 116 -
Tabelle 4-13: Auflistung der verwendetes Softwares	- 116 -
Tabelle 4-14: Transfektionsansatz zum knockdown von NAMPT	- 118 -
Tabelle 4-15: Transfektionsansatz zur Überexpression der miRNA-3135b	- 118 -
Tabelle 4-16: Zusammensetzung des high capacity-reverse transcription (HCRT)-Mastermixes	- 123 -
Tabelle 4-17: Programm zur Umschreibung der mRNAs.....	- 123 -
Tabelle 4-18: Zusammensetzung des Mastermixes zur Analyse der mRNA-Expression....	- 123 -
Tabelle 4-19: qPCR Programm zur Analyse der mRNA-Expression.....	- 124 -
Tabelle 4-20: Zusammensetzung des microRNA-reverse transcription (miR-RT)-Mastermixes.. ..	- 124 -
Tabelle 4-21: Programm zur Umschreibung der miRNAs.....	- 124 -
Tabelle 4-22: Zusammensetzung des Mastermixes zur Analyse der miRNA-Expression...	- 124 -
Tabelle 4-23: qPCR Programm zur Analyse der miRNA-Expression.....	- 125 -

1 EINLEITUNG

1.1 Die Pneumonie

Die Pneumonie, auch Lungenentzündung genannt, bezeichnet eine in der Regel infektiöse, akute oder chronische Entzündung des pulmonalen Parenchyms. Pneumonien werden nach der Art des Erwerbs in ambulant erworbene (*community-acquired pneumonia*, CAP), nosokomial erworbene (*hospital-acquired pneumonia*, HAP) und beatmungsassoziierte (*ventilator-associated pneumonia*, VAP) Pneumonie unterteilt (Longo 2012). Weltweit sterben jährlich etwa drei bis fünf Millionen Menschen an dieser Erkrankung. Hierbei erkranken in Süd-Asien und Subsahara-Afrika hauptsächlich Kinder (UNICEF 2017; WHO 2016). Die Pneumonie ist mit nahezu 2500 betroffenen Kindern pro Tag die vorherrschende Todesursache durch Infektionen bei Kindern unter 5 Jahren. Des Weiteren sind neben Kindern auch ältere Menschen über 65 Jahre sowie Menschen mit einem geschwächten Immunsystem gefährdet. Eine Pneumokokken-Pneumonie ist auch in den Industrienationen ein schweres Krankheitsbild mit Mortalitätsraten von über 10%, welche in den Risikogruppen deutlich höher liegen kann (Lungeninformationsdienst 2016). In Deutschland erkranken schätzungsweise bis zu 800.000 Menschen jährlich an einer ambulant erworbenen Pneumonie (Braun & Dalhoff 2018). Die Sterberate liegt hier bei etwa 6 bis 8%.

Auslöser einer Pneumonie sind meist bakterielle, virale oder mykotische Erreger, selten können auch chemische oder immunologische Ursachen vorliegen. Je nach klinischem Bild und welcher Erreger die Krankheit auslöst, werden atypische und typische Pneumonien unterschieden. Atypische Erreger einer Pneumonie sind solche, welche nicht durch die Kultur von Atemwegssekret auf Standardmedien nachgewiesen werden können und machen etwa 20% aller Pneumonien aus (Lungeninformationsdienst 2016). Dazu zählen Viren wie das Influenza A Virus (IAV) und das humane respiratorische Synzytial-Virus oder Bakterien wie *Mycoplasma pneumoniae* oder *Legionella pneumophila*. Erreger einer typischen Pneumonie können demzufolge aus dem Atemwegssekret auf Standardmedien kultiviert werden. Wichtige Auslöser einer typischen, bakteriellen Pneumonie sind zum Beispiel *Haemophilus influenzae* Typ B und *Staphylococcus aureus*. Die Hauptursache einer Pneumonie sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen ist eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

1.2 Das Bakterium *Streptococcus pneumoniae*

Das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) wurde erstmals 1881 von Georg Miller Steinberg und Louis Pasteur unabhängig voneinander isoliert (White 1938). Diese unbeweglichen Bakterien, auch Pneumokokken genannt, besitzen eine runde bis ovale Form und einen Durchmesser von durchschnittlich 1 μm (Hahn *et al.* 2001). Da sich die Pneumokokken nur in einer Ebene teilen, entstehen kurze Ketten und Paare, welche charakteristisch sind, und sie daher oft als Diplokokken bezeichnet werden. Die Fähigkeit der natürlichen Kompetenz des Erregers, durch welche er frei vorhandene DNA aufnehmen kann, wurde erstmals 1928 durch Fred Griffith beschrieben (Griffith 1928). Diese Fähigkeit ermöglicht es dem Bakterium, beispielsweise Resistenzgene aufzunehmen. *S. pneumoniae* ist Bestandteil der Normalflora der Schleimhäute, kann aber in anderen Bereichen des humanen Körpers auch schwerwiegende Krankheiten auslösen. Die Unterscheidung der verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämme erfolgt durch die Kapsel, welche das Bakterium umschließt (Cooper *et al.* 1932). Bis heute sind 97 verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae* anhand struktureller Unterschiede der Kapsel unterscheidbar (Geno *et al.* 2015). Viele dieser verschiedenen Serotypen, z. B. Serotyp 2 wie D39 oder Serotyp 4 wie TIGR4, können Erkrankungen im Menschen auslösen. Jedoch sind 10 dieser Serotypen für annähernd 62% der invasiven *S. pneumoniae*-Erkrankungen verantwortlich (CDC 2016). Die Reihenfolge und Verbreitung dieser Serotypen ist dabei abhängig von Faktoren wie dem Alter der Patienten oder dem geographischen Gebiet. Die Kapsel erschwert das Phagozytieren der Bakterien durch Makrophagen und bildet damit einen wichtigen Virulenzfaktor in der Infektion mit *S. pneumoniae*.

1.2.1 *Streptococcus pneumoniae* als Krankheitserreger

Streptococcus pneumoniae ist ein humaner Kommensale, welcher asymptomatisch den Nasopharynx besiedelt (Reinert 2004). Studien zur asymptomatischen Besiedlung von *S. pneumoniae* verzeichnen eine Verbreitung von 11% bis 93%, abhängig von Faktoren wie Alter, sozioökonomischem Umfeld und anderen Erkrankungen der oberen Atemwege (Dagan *et al.* 2002; Granat *et al.* 2007). In den meisten Fällen sind Menschen nur von einem Serotyp zur selben Zeit befallen, auch wenn die Besiedlung von mehr als einem Serotypen möglich ist (Hare *et al.* 2008).

Vom Nasopharynx aus kann dieses Bakterium jedoch zu schweren Erkrankungen führen. Normalerweise beginnt dies mit geringen Reizungen des oberen Respirationstraktes, welche

auf Infektionen mit respiratorischen Viren zurückzuführen sind. Wenn sich *S. pneumoniae* in den unteren Atemwegen ansiedelt, bekämpft die Abwehr des Wirtes die Bakterien durch die mukuziliäre Aktivität, Husten, antimikrobielle Peptide und die lokale Immunabwehr (Bogaert *et al.* 2004). Hier spielt die Kapsel ebenfalls eine entscheidende Rolle durch die Verhinderung der Bindung an den Mukus der Atemwege und Verhinderung des Auswurfes durch die mukuziliäre Aktivität. Infektionen mit *S. pneumoniae* werden unterschieden in invasive Erkrankungen wie Sepsis oder Meningitis und in nicht-invasive Erkrankungen wie Nasennebenhöhlenentzündung (*Sinusitis*) und Mittelohrentzündung (*Otitis Media*). Eine Pneumokokken-Pneumonie kann sowohl invasiv (einhergehend mit Sepsis) oder nicht-invasiv (ohne begleitende Sepsis) sein (Feldman & Anderson 2016). Eine Sepsis tritt in 10-30% der Fälle einer Pneumokokken-Pneumonie auf (Blasi *et al.* 2012).

Wie bereits erwähnt, stellt die Kapsel einen der wichtigsten Virulenzfaktoren der Pneumokokken dar. Diese bildet eine abgrenzende Schutzschicht für das Bakterium gegen das umgebende Milieu und inhibiert gleichzeitig die phagozytotische Immunantwort des Wirtes. Die Kapsel von *S. pneumoniae* ist aus Polysacchariden aufgebaut und deren Funktion als Virulenzfaktor wurde durch den enzymatischen Verdau der Kapsel des Serotyps 3 bewiesen, was zu einer 1 Million-fachen Verringerung der Virulenz im Mausmodell führte (Avery & Dubos 1931; Heidelberger & Avery 1923; Heidelberger & Avery 1924). Neben der Kapsel besitzt *S. pneumoniae* eine Reihe weiterer Virulenzfaktoren. So dienen die Oberflächenproteine PspA und PspC (*pneumococcal surface proteins A* und *C*) der Inhibierung der Immunantwort des Wirtes durch das Komplementsystem. Auch Zellwandbestandteile wie Lipoteichonsäuren (LTA) bzw. Lipoprotein (LP) oder Peptidoglykan können eine Immunantwort stimulieren (Han *et al.* 2003). Des Weiteren spaltet der Virulenzfaktor LytA die Lactyl-Amid-Bindung, welche die Stammpeptide und die Glykanstränge des Peptidoglykans verbindet, und führt zur Autolyse der bakteriellen Zellwand (Howard & Gooder 1974). Ferner produziert *S. pneumoniae* das porenbildende Toxin Pneumolysin, welches die Zellmembran der Wirtszellen perforieren kann und zur Ausbreitung der Infektion beiträgt. Die Freisetzung des Pneumolysins ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch scheinen verschiedene Mechanismen für eine gesteuerte und eine dauerhafte Freisetzung dieses Moleküls zu existieren (Balachandran *et al.* 2001; Mitchell TJ 1997). Durch die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Konzentrationen bis in den millimolaren Bereich, hauptsächlich durch die Aktivität der Pyruvatoxidase (SpxB), nimmt *S. pneumoniae* eine einzigartige Rolle unter den Katalase-negativen Bakterien ein (McLeod & Gordon 1922; Pericone *et al.* 2003). Obwohl H_2O_2 in sehr hohen Konzentrationen ebenfalls tödlich für *S. pneumoniae* ist, wurde in *in vivo* Experimenten gezeigt, dass eine Deletion des

spxB Gens zu einer reduzierten Virulenz führt (Spellerberg *et al.* 1996). Neben diesen und weiteren länger bekannten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* wurden in den letzten Jahren auch neue Virulenzfaktoren identifiziert. Es wurde beispielsweise in der Zellwand das Protein Spbhp-37, ein hämoglobinbindendes Protein, entdeckt, welches für die Aufnahme von Eisen verantwortlich ist und sich positiv auf das bakterielle Wachstum und die Infektiösität der Pneumokokken auswirken soll (Romero-Espejel *et al.* 2016). Weiterhin wird dem Elongationsfaktor Tu (Tuf), einem Protein, welches im Zytoplasma und auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert ist, eine immunevasive Eigenschaft zugeschrieben (Mohan *et al.* 2014).

1.2.2 Bakteriell-virale Koinfektionen

Neben den schwerwiegenden Infektionen mit *S. pneumoniae* kommen nicht nur weitere bakterielle Pathogene hinzu, sondern ebenfalls bakteriell-virale Koinfektionen, welche die sozioökonomischen Belastungen deutlich erhöhen. Hierbei stellt das Influenza A Virus den wichtigsten Vertreter dar.

Die erste Vermutung, dass virale Infektionen den Patienten für eine sekundäre bakterielle Infektion prädisponieren können, wurde vor fast einem Jahrhundert geäußert (Laennec 1923). Ein typisches Virus, welches in kombinierter Infektion mit Bakterien auftritt, ist das Influenza Virus. Dieses negativ-Strang RNA-Virus wird in die Subtypen A, B und C unterteilt und gehört zur Gruppe der *Orthomyxoviridae* (Neumann *et al.* 2004). Influenza Viren vom Typ A werden weiterhin anhand der unterschiedlichen Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterteilt und können weltweite Pandemien auslösen (Li *et al.* 2004). Bis heute sind 18 HA Subtypen und 11 NA Subtypen in Vögeln und Fledermäusen bekannt (Richard & Fouchier 2015; Schrauwen & Fouchier 2014; Tong *et al.* 2012). Influenza A Viren (IAV) sind durch ihr segmentiertes Genom dazu befähigt, genetisches Material in einem Prozess namens Reassortierung oder Antigenshift untereinander auszutauschen (Noah & Krug 2005; Webster *et al.* 1992). Diese Fähigkeit bildet das grundlegende pandemische Potential der IAV. Eine weitere, lokal begrenzte Möglichkeit der Antigen-Veränderung bei IAV ist die Antigendrift, bei welcher es zu langsamen, zufälligen Veränderungen der präsentierten Antigene kommt (Scholtissek 1995).

Bei der Pandemie der sogenannten Spanischen Grippe (H1N1) starben zwischen 1918 und 1920 weltweit etwa 50 Millionen Menschen (Johnson & Mueller 2002). Autopsien von mehr als 8000 Verstorbenen aus dieser Zeit bestätigten bakterielle Konfektionen in nahezu allen Fällen (Morens *et al.* 2008). Auch in der letzten Influenza A (H1N1) Pandemie, der sogenannten

Schweinegrippe von 2009, wurden weltweit mehr als 280.000 Tote verzeichnet, viele in Ländern mit eingeschränkter medizinischer Versorgung (Dawood *et al.* 2012). Doch ebenso in Ländern mit moderner medizinischer Versorgung verkomplizierten bakterielle Koinfektionen zwischen 18% und 34% der in Notaufnahmen behandelten Fälle (Kumar *et al.* 2009; Marten-Loeches *et al.* 2011; Rice *et al.* 2012). In den jährlich auftretenden Influenza-Ausbrüchen erschweren bakterielle Koinfektionen etwa 0,5% aller Influenza Fälle in gesunden jungen Menschen und mindestens 2,5% der Fälle in älteren Menschen oder Menschen mit prädisponierenden Bedingungen (Metersky *et al.* 2012). Die Kolonisierung des Nasopharynx mit pathogenen Bakterien kann den Patienten für eine Koinfektion prädisponieren. Besonders die Kolonisierung mit *S. pneumoniae* ist mit einem erhöhten Risiko zur Aufnahme in eine Notfallambulanz oder des Todes während einer Influenza Infektion assoziiert (Palacios *et al.* 2009).

Die synergistische Letalität von Influenza und bakteriellen Koinfektionen wurde bereits kurz nach der Isolierung des Influenzavirus in den frühen 1930er Jahren in Tiermodellen beobachtet (Harford *et al.* 1945; Lewis & Shope 1931). Anfänglich wurde die direkte Korrelation zwischen der Zerstörung der Epithelzellen durch die Influenzainfektion und die dadurch erleichterte Adhärenz der Bakterien einhergehend mit Wachstum und Ausbreitung als allgemein gültige Erklärung für die Anfälligkeit der Patienten für sekundäre bakterielle Erkrankungen akzeptiert (Harford & Hara 1950; Harford *et al.* 1949; Luria *et al.* 1959; Martin *et al.* 1959a; Martin *et al.* 1959b). Heutzutage wird diese Synergie differentieller betrachtet. Infektionen mit dem Influenza Virus führen tatsächlich zu einer Dysfunktion der respiratorischen Epithelzellen und zum Zelltod durch Apoptose (Hinshaw *et al.* 1994; Mori *et al.* 1995). Jedoch führt eine Influenzainfektion ebenso zu Änderungen des humanen Immunsystems, wodurch dieses eine bakterielle Infektion nicht mehr adäquat bekämpfen kann (McCullers 2014; Robinson *et al.* 2015). Ferner steigert das proapoptotische Influenza Protein PB1-F2 die Anfälligkeit für bakterielle Koinfektionen durch einen noch nicht gänzlich erklärten Mechanismus (McAuley *et al.* 2007). Die Ausbreitung des Influenza Virus entlang des Respirationstraktes beeinträchtigt schließlich die mukuziliäre Beseitigung der Bakterien (LeVine *et al.* 2001; Pittet *et al.* 2010). Durch das Absterben der Epithelzellen wird sowohl die basale Zellschicht als auch die Basalmembran freigelegt, wodurch eine gesteigerte bakterielle Adhärenz und Invasion, wie schon früher postuliert, begünstigt wird (Kash *et al.* 2011; Okamoto *et al.* 2003; Plotkowski *et al.* 1986). Ferner führt die virale Neuraminidase durch die verstärkte Präsenz von Pneumokokken-Adhärenz-Rezeptoren zu einer erhöhten Anfälligkeit für *S. pneumoniae*-Infektionen (McCullers & Bartmess 2003; Tong *et al.* 2001). Influenza-*S. pneumoniae*-

Koinfektionen von humanen Epithelzellen des Mittelohrs führen ebenfalls zu synergistischen inflammatorischen Antworten (Tong *et al.* 2003). Analysen der Genexpression dieser Zellen durch *Microarrays* zeigte eine gesteigerte Expression des Toll-ähnlichen Rezeptors (TLR) 2 durch die Influenza-Infektion auf, welches die Zellen möglicherweise empfänglicher für die Stimulation mit Pneumokokken-Peptidoglykan oder -LTA bzw. -LP macht (Han *et al.* 2003; Tong *et al.* 2004). Ebenfalls wurde eine durch IAV ausgelöste, anhaltende Desensibilisierung von Alveolarmakrophagen auf bakterielle Komponenten beschrieben (Didierlaurent *et al.* 2008).

Es ist festzuhalten, dass eine primäre Infektion mit Influenza A Viren alle Aspekte der bakteriellen Infektion, wie beispielsweise Übertragung, Kolonisierung und Replikation, beeinflusst (McCullers *et al.* 2010; Mina & Klugman 2014; Siegel *et al.* 2014). Sogar Vakzine mit abgeschwächten Influenza Viren erhöhen die Dauer und Menge von *S. pneumoniae* im Nasopharynx und im Mittelohr, was eine Grundvoraussetzung für invasive Pneumokokkeninfektionen ist (Mina *et al.* 2015; Mina *et al.* 2014). Doch auch eine veränderte IAV-Replikation durch eine vorangegangene *S. pneumoniae*-Infektion wurde postuliert. So wurde in Totenkopffaffen eine erhöhte IAV-Replikation nachgewiesen, wohingegen eine bakterielle Vorinfektion in Mäusen zu geringeren Mortalitätsraten nach IAV führte (Berendt *et al.* 1975; Van Daal *et al.* 1991). Weiterhin deuten neuere Untersuchungen in Mäusen auf einen protektiven Effekt durch bakterielle Komponenten in einer IAV Infektion hin (Shinya *et al.* 2011). Generell wird postuliert, dass sich bestimmte Kombinationen pathogener Organismen besser ergänzen als andere (Bakaletz 2004). Die Interaktion zwischen IAV und *S. pneumoniae* ist komplex, dynamisch und noch immer nicht vollständig verstanden. Wichtig ist dabei jedoch auch das humane Immunsystem, welches die Pathogene erkennt und abwehrt.

1.2.3 Epitheliale Erkennung von *S. pneumoniae*-Infektionen

Epithelzellen bilden eine Barriere, um das Gewebe gegen äußere Einflüsse zu schützen und führen dabei zusätzlich oftmals spezifische Funktionen wie Sekretion oder Resorption aus. Die Schutzfunktion wird durch den Aufbau der Epithelzellen gewährleistet, wobei die Ausbildung sogenannter *tight junctions* zu einer Unterteilung der Plasmamembran in eine apikale und eine basale Domäne führt (Rodriguez-Boulan & Nelson 1989; Simons & Wandinger-Ness 1990). Die nach außen gerichtete apikale Membrandomäne bildet zur Oberflächenvergrößerung Ausstülpungen wie Zilien oder Mikrovilli aus, wodurch die Austauschfläche mit dem umgebenden Milieu deutlich vergrößert wird (Cao *et al.* 2012). Die basale Membrandomäne stellt durch verschiedene spezielle Strukturen wie Desmosomen oder *gap junctions*

Verbindungen zu Nachbarzellen her und ist somit für die Zell-Zell-Kommunikation notwendig. Des Weiteren sind die Epithelzellen über basal ausgebildete Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden. Auch der Respirationstrakt ist mit Epithelzellen ausgekleidet. So finden sich hier vorwiegend sekretorische Becherzellen sowie zilienträgende und basale Zellen.

Der Mucus bildet eine weitere, zähflüssige Schutzschicht, welche antimikrobielle Peptide enthält, wodurch pathogene Erreger abgetötet oder geschwächt werden. Mittels synchronisiertem Zilienschlag wird der Mucus schließlich aus dem tiefer liegenden Respirationstrakt in die Trachea befördert, wo dieser abgehustet werden kann (Hasenberg *et al.* 2013). DNA Analysen von diesem Oberflächensekret des humanen Respirationstraktes ergaben die Anwesenheit von mehr als 500 bakteriellen Spezies (Paster *et al.* 2001). Daher besitzen Epithelzellen eine Reihe von Mechanismen, durch welche pathogene Eindringlinge erkannt, abgewehrt und die körpereigene Immunabwehr aktiviert werden können.

Wichtige Schlüsselkomponenten des angeborenen Immunsystems sind die Pathogen-erkennenden Rezeptoren (PRRs, *pathogen recognition receptors*). Diese können auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär lokalisiert sein oder sekretiert werden (Janeway & Medzhitov 2002). Diese Rezeptoren erkennen mikrobielle Bestandteile, welche folglich als Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) bezeichnet werden (Paterson & Mitchell 2006). Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein bekanntes Beispiel eines PRR in der Erkennung von *S. pneumoniae*. Es bindet das Phosphorylcholin der Pneumokokken-Zellwand und führt dadurch zur Aktivierung des Komplementsystems und Eradikation der Bakterien (Mold *et al.* 2002; Szalai *et al.* 1997). Weiterhin blockiert CRP die Adhärenz von *S. pneumoniae* durch den Rezeptor des Plättchen-aktivierenden Faktors (*platelet-activating factor receptor*, PAFr) und das Phosphoryl-enthaltene humane Surfactant (Gould & Weiser 2002; McEachren & Keough 1995). Die Familie der TLRs stellt eine wichtige Gruppe der PRRs dar, welche in der Erkennung einer ganzen Reihe von Pathogenen beteiligt sind (Hopkins & Sriskandan 2005; Takeda & Akira 2003). Die Erkennung bakterieller Bestandteile durch das angeborene Immunsystem mittels TLRs, welche von Immunzellen wie Makrophagen aber auch von Epithelzellen exprimiert werden, ist eine effektive Methode, den Wirt gegen verschiedene Pathogene zu schützen (Akira *et al.* 2006). Die Aktivierung von Phagozyten durch inflammatorische Zytokine und die Apoptose infizierter Zellen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr.

Das Pneumolysin von *S. pneumoniae* interagiert mit dem humanen TLR4 und führt so zu proinflammatorischen und proapoptotischen Prozessen (Akira *et al.* 2006). Durch die direkte

Interaktion mit dem Virulenzfaktor Pneumolysin nimmt dieser Rezeptor zusätzlich eine protektive Rolle in der Pneumokokkenpneumonie ein (Branger *et al.* 2004; Srivastava *et al.* 2005). Es wurde gezeigt, dass die mukosale, humorale und die Zytokin-Antwort auf das Pneumolysin und die Oberflächenproteine A und C (PspA und PspC) von *S. pneumoniae* differentiell und spezifisch ist (Palaniappan *et al.* 2005). Bei Pneumokokkeninfektionen in Mäusen stellt die klassische Aktivierung den hauptsächlichen Signalweg des Komplementsystems dar (Brown *et al.* 2002). Dabei ist das Pneumolysin am Schutz von *S. pneumoniae* durch eine Komplement-vermittelte Reinigung beteiligt (Yuste *et al.* 2005). Der Mechanismus, durch welchen dies geschieht, ist noch nicht vollständig geklärt. Das freigesetzte Pneumolysin könnte zu einer Komplementaktivierung abseits der Bakterien selbst führen oder die Komponenten des Komplementsystems beschäftigen, sodass das Bakterium keinen Schaden nimmt (Paterson & Mitchell 2006). Interessanterweise weisen Patienten einer Pneumokokkenpneumonie in Verbindung mit einer Sepsis verminderte Level an Komplement-Komponenten auf (Coonrod & Rylko-Bauer 1977). Darüber hinaus sind Patienten, welche nicht die Komplementsysteme C1q und C2 besitzen, vermehrt anfällig für *S. pneumoniae*-Infektionen, wodurch postuliert wird, dass der klassische Komplementsignalweg essentiell für die Opsonierung von *S. pneumoniae* ist (Yuste *et al.* 2008).

Es wurde beschrieben, dass TLR2 LTA und Peptidoglykan aus der Zellwand von *S. pneumoniae* erkenne (Han *et al.* 2003; Schroder *et al.* 2003; Weber *et al.* 2003; Yoshimura *et al.* 1999). Jedoch wurde später postuliert, dass die Wichtigkeit von LTA in der Stimulation des humanen Immunsystems überschätzt worden sei (Henneke *et al.* 2005). Am Beispiel von *Staphylococcus aureus* wurde gezeigt, dass das immunostimulatorische Potential von LTA eher gering ist und die Reaktionen des humanen Immunsystems oftmals auf LP zurückzuführen sind (Han *et al.* 2003; Hashimoto *et al.* 2006; Stoll *et al.* 2005). Auch die bakterielle DNA hat durch die Anwesenheit von unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanosin (CpG)-Motive inflammatorische Eigenschaften (Krieg 2003). Diese unmethylierten CpG-Motive werden über TLR9 erkannt, was durch vermehrte DNA Freisetzung während der Autolyse in einer *S. pneumoniae*-Infektion von großer Bedeutung ist (Bauer *et al.* 2001; Moscoso & Claverys 2004). Die Zellwand von *S. pneumoniae* wird weiterhin über das LPS-bindende Protein (LBP) erkannt (Weber *et al.* 2003). Die Zytosol-Proteine Nod1 und Nod2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*), ebenfalls PRRs, erkennen verschiedene mikrobielle Bestandteile und leiten eine Immunantwort ein (Philpott & Girardin 2004). Ferner wurde eine Beteiligung der Nod-Proteine in der *S. pneumoniae*-Infektion beschrieben (Opitz *et al.* 2004).

Der Myeloid-Differenzierungsfaktor 88 (MyD88, *Myeloid differentiation primary response 88*) ist ein Schlüsselmolekül in der Signalkaskade, welche durch Aktivierung der TLR- oder Interleukin-1-Rezeptorfamilien aktiviert wird (Yamamoto *et al.* 2004). In verschiedenen Infektionsmodellen mit MyD88-depletierten Mäusen wurde eine gesteigerte Anfälligkeit gegen *S. pneumoniae*-Infektionen nachgewiesen (Albiger *et al.* 2005; Khan *et al.* 2005; Koedel *et al.* 2004). Über MyD88 wird schließlich die *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B)-abhängige Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) oder Interleukin-6 (IL-6) aktiviert (Knapp *et al.* 2004). Diese proinflammatorischen Mediatoren führen zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Jedrzejak 2001). Die Beteiligung dieser wurde in allen Stadien der Kolonisierung mit *S. pneumoniae* beobachtet (Dallaire *et al.* 2001). Ferner zeigten Studien in TLR9-deletierten Mäusen, dass in der frühen Phase der Infektion die Stimulation des intrazellulären TLR9 durch Phagozytose zur Kontrolle der Bakterienlast beiträgt (Albiger *et al.* 2007).

1.2.4 Globale Analysen nach Infektion mit Streptokokken

Die Wirts-Pathogen-Interaktion zwischen Mensch und Streptokokken ist komplex und noch immer nicht gänzlich verstanden. Zur Untersuchung dieser Interaktion wurde daher seit Beginn des 21. Jahrhunderts eine Reihe von Studien zur Analyse globaler Veränderungen durch eine Streptokokkeninfektion durchgeführt. Dabei wurden nicht nur verschiedene Streptokokkenspezies verwendet, sondern auch die regulatorischen Mechanismen von Wirt, Pathogen oder beider, in einem sogenannten dualen Ansatz, untersucht.

Dabei konnten in *Microarray* Analysen der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 3 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* 182 differentiell exprimierte Wirtsgene, von 4.133 untersuchten, detektiert werden und zeigten damit das Potential von Hochdurchsatzanalysen auf (Rogers *et al.* 2003). Von diesen 182 Genen waren schließlich 142 durch das von den Pneumokokken produzierte Pneumolysin induziert, was die dominante Rolle dieses Virulenzfaktors unterstreicht. In einem *Otitis media*-Ratten-Modell zeigten weiterhin 280 Gene eine mindestens 2-fache Expressionsänderung nach Infektion gegenüber den Kontrollen (Chen *et al.* 2005). Dies bedeutet eine Änderung der Genexpression von 24% der untersuchten Gene und bestätigte die Möglichkeiten für weitreichende Veränderungen durch *S. pneumoniae*-Infektionen. In einem weiteren Ratten-Modell zur Untersuchung der Meningitis wurden die Genexpressionen im Cortex und im Hippocampus nach Infektion mit *S. pneumoniae* untersucht (Coimbra *et al.* 2006). Dabei wurden nahezu 600 regulierte Gene identifiziert, von denen 77%

11 funktionellen Gruppen wie Signaltransduktion, Immunität oder Neurotransmission zugeteilt werden konnten. Ferner wurde die Bedeutung der Kapsel von *S. pneumoniae* bei Infektionen ebenfalls in Transkriptionsstudien untersucht. So wurde eine humane, pharyngale Epithelzelllinie mit verschiedenen bekapselten und unbekapselten Serotypen infiziert (Bootsma *et al.* 2007). Dabei wurden 85% der induzierten Gene spezifisch durch einen oder mehrere bekapselte Serotypen reguliert, wodurch eine Kapsel-abhängige Reaktion der humanen Zellen auf eine *S. pneumoniae*-Infektion gezeigt wurde. Im selben Jahr beschäftigte sich eine andere Studie mit Veränderungen der Genexpression von nasalem Gewebe durch die Besiedelung von *S. pneumoniae* in Mäusen (Joyce *et al.* 2009). Dabei zeigte sich die Veränderung der Expression von hunderten Genen über die Zeit des Experimentes. Dies umfasste die Induktion der Immunabwehr in Form von Typ I-Interferonen oder von Genen zum Umbau der Basalmembran und Zellteilung. So wurde schließlich gezeigt, dass die asymptomatische Besiedelung von *S. pneumoniae* ebenfalls zu Stimulationen des Immunsystems des Wirtes führt.

Auch das Transkriptom von Streptokokken wurde in verschiedenen Studien analysiert. Eine der ersten Studien untersuchte das Genom von Streptokokken der Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*), um Einblicke in die Pathogenese in Verbindung mit akutem rheumatischem Fieber zu bekommen (Smoot *et al.* 2002). Weiterhin gehören Streptokokken der Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*) ebenfalls zu den humanen Pathogenen. Da die Pathogenese noch wenig verstanden war, wurde eine Studie zum Transkriptom dieser Streptokokken durchgeführt (Sitkiewicz *et al.* 2009). Dabei wurden die Genprofile der Bakterien in verschiedenen Wachstumsstadien in humaner, amniotischer Flüssigkeit untersucht und mit dem Genprofil von den Bakterien aus einem reichhaltigen Labormedium verglichen. Es zeigte sich, dass *S. agalactiae* sein Transkriptom in der amniotischen Flüssigkeit deutlich umstellt. Es wurden vermehrt Änderungen in Genen metabolischer Prozesse wie auch in Virulenzgenen, z.B. bei Adhäsinen, festgestellt. Des Weiteren wurde eine Studie zum Transkriptom von *S. pneumoniae* zu frühen Zeitpunkten der Infektion durchgeführt (Song *et al.* 2009). Dafür wurden THP-1 Zellen für bis zu 3 h mit einem TIGR4-Stamm (Serotyp 4) infiziert. Song und Kollegen identifizierten Gene, welche für die frühe Phase der Interaktion mit Makrophagen relevant sind.

Dieser Modellansatz wurde schließlich vor kurzem durch das Prinzip der dualen RNA-Sequenzierung erweitert. In einer Studie von Aprianto und Kollegen wurden duale RNA-Sequenzierungen von *S. pneumoniae* und infizierten A549 Zellen vorgenommen (Aprianto *et al.* 2016). Dabei lag der Fokus ebenfalls auf den Regulationen zu früheren Zeitpunkten der

Infektion, nämlich bis zu 4 Stunden, sowie auf dem Transkriptomprofil bekapselter und unbekapselter Pneumokokken. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich das Transkriptom der Epithelzellen selbst über diesen kurzen Zeitraum der Infektion deutlich verändert. Ferner wurde gezeigt, dass nur adhärente, bekapselte *S. pneumoniae* die angeborene Immunantwort unterdrücken können, nicht jedoch die freien, unbekapselten Pneumokokken.

Diese und weitere Studien bilden eine Grundlage zum Verstehen der vielfältigen Wirts-Pathogen-Interaktion zwischen Mensch und *S. pneumoniae* aus beiden Perspektiven. Jedoch ist dieses Bild noch immer unvollständig und bedarf, vor allem im Hinblick auf *S. pneumoniae*-spezifische Regulationen, weiterer Untersuchungen.

1.3 Die humane Lunge als *ex vivo* Modell

Die meisten infektionsbiologischen Experimente werden entweder in Zellkulturen (*in vitro*) oder in Tiermodellen (*in vivo*) durchgeführt. Jedoch sind beide experimentellen Ansätze limitiert. Beispielsweise können Zellkulturen keine multizellulären Bedingungen und Interaktionen nachbilden, genauso wie Tiermodelle humanspezifische Eigenheiten in Anatomie und Immunität nicht nachahmen können. Der Nutzen von *ex vivo*-Modellen mit humanem Gewebe kann einige dieser Limitationen überbrücken. Dies gilt im Besonderen für pathogene Organismen, welche eine gewisse Humanspezifität aufweisen. Infektionen in *ex vivo* Modellen mit humanem Lungengewebe wurde mit verschiedenen pathogenen Erregern wie *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* oder Coronaviren durchgeführt (Chan *et al.* 2014; Ganbat *et al.* 2016; Hocke *et al.* 2013a; Wagner *et al.* 2015). Aufgrund des Fokus dieser Arbeit wird im Folgenden kurz auf *ex vivo* Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* und dem Influenza A Virus eingegangen.

Ex vivo Infektionen mit *S. pneumoniae* in humanem Lungengewebe wurden in verschiedenen Studien auf inflammatorische Reaktionen dieses multizellulären Komplexes untersucht (Fatykhova *et al.* 2015; Szymanski *et al.* 2012; Xu *et al.* 2008). Dadurch wurde nicht nur die Beteiligung des Cyclooxygenase-2 bestätigt, sondern auch die Rolle der Inflammasomen in dieser Infektion näher erforscht. Weiterhin wurde dieses Infektionsmodell zur Untersuchung der Auswirkungen der bakteriellen Autolyse auf Transkriptionsfaktoren des Immunsystems genutzt (McConnell & Yang 2010; Zahlten *et al.* 2015a; Zahlten *et al.* 2015b). Ferner wurde die Replikation unterschiedlich pathogener Influenza A Viren im *ex vivo* Lungenmodell untersucht (Chan *et al.* 2010; Weinheimer *et al.* 2012). Ebenfalls wurden sowohl die primären Zielzellen der Influenzaviren, die alveolaren Typ II Epithelzellen, im Zellverband näher betrachtet, als

auch die Immunreaktion des Gewebes auf die Infektion, bspw. im Hinblick auf neu auftretende zoonotische Influenzaviren (Chan *et al.* 2010; Hocke *et al.* 2013b; Knepper *et al.* 2013; Weinheimer *et al.* 2012; Wu *et al.* 2010). In einem *ex vivo* Modell der humanen Lunge wurde außerdem die Koinfektion zwischen Influenza A Viren und *S. pneumoniae* nachgestellt. Hier wurde eine durch das Virus vermittelte Typ I und Typ III Interferon-abhängige Blockierung der Zytokine IL-1 β und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) gefunden, wodurch eine entsprechende Antwort des Immunsystems auf eine folgende bakterielle Infektion beeinträchtigt ist (Berg *et al.* 2017).

Diese und weitere Studien zeigen, dass die Infektion des humanen *ex vivo* Lungengewebes ein interessantes und für viele Bedingungen geeignetes Modellsystem zur Untersuchung verschiedener Wirts-Pathogen-Interaktionen darstellt.

1.4 Die Bedeutung des Energiestoffwechsels in Infektionen

In der Literatur wurden verschiedene Stoffwechselwege bereits mit Infektionen assoziiert. So spielt der Eisen-Metabolismus eine große Rolle bei der antimikrobiellen Abwehr (Johnson & Wessling-Resnick 2012). Auch der Energiestoffwechsel wurde mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht (Imai 2009). Das wichtigste Schlüsselmolekül des Energiestoffwechsels und des Elektronentransports ist das Molekül Nicotinamidadenindinukleotid (NAD). Als Redox-Koenzym wechselt es zwischen der oxidierten Form NAD⁺ und der reduzierten Form NADH, wobei die Gesamtkonzentration konstant bleibt (Berger *et al.* 2004). Abhängig vom Organismus werden 4 Moleküle und 4 entsprechende Signalwege zum Aufbau von NAD genutzt: Quinolinsäure in dem sogenannten *de novo* Signalweg und Nicotinsäure, Nicotinamid-Ribosid bzw. Nicotinamid (NA) in sogenannten *Salvage*-Signalwegen (Bieganowski & Brenner 2004; Magni *et al.* 2004). Aufgrund des Fokus dieser Arbeit wird im Folgenden der *Salvage*-Signalweg auf Basis von NA näher beleuchtet (siehe auch Klappenbroschur hinten).

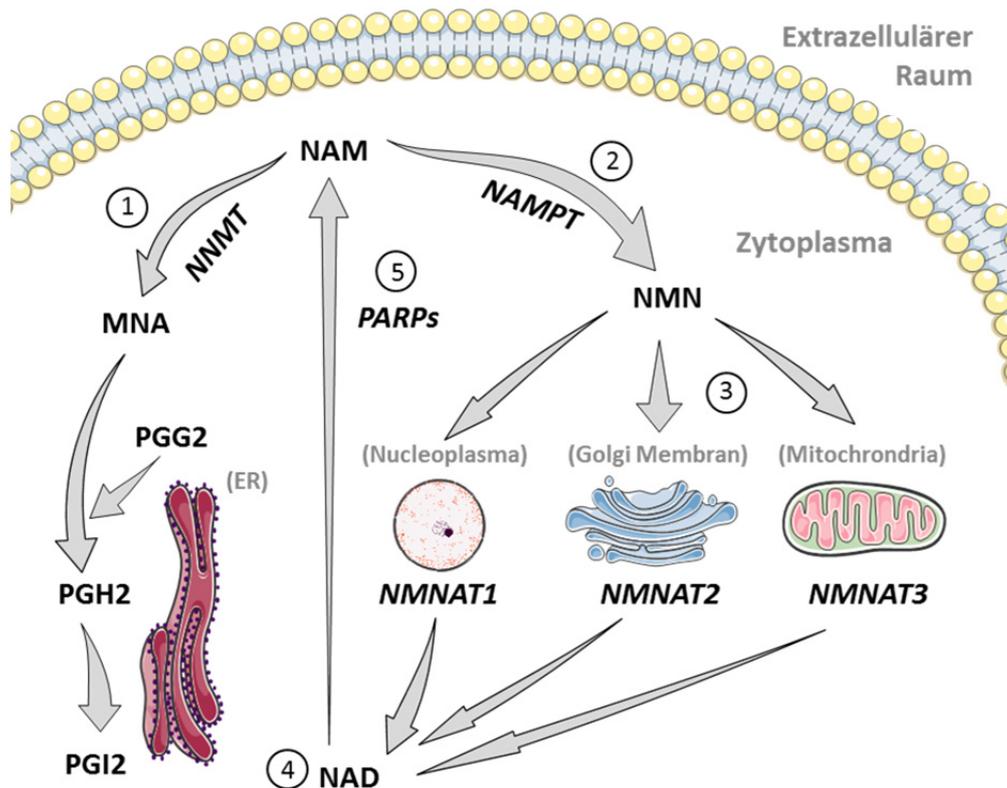


Abbildung 1-1: Schematischer und vereinfachter Ausschnitt des Nicotinamidmetabolismus. NAM wird über zwei Stoffwechselwege metabolisiert. Einerseits kann mittels (1) NNMT die PGI₂ Synthese im ER starten. Andererseits kann, mit deutlich höherer Affinität, die NAD Synthese über (2) NAMPT zu NMN beginnen. Je nach Kompartiment der humanen Zelle wird durch (3) NMNAT1-3 schließlich (4) NMN zu NAD metabolisiert. Wird NAD nicht benötigt, kann es über (5) PARPs wieder zu NAM abgebaut werden. Enzyme sind kursiv geschrieben. ER = Endoplasmatisches Retikulum, MNA = 1-Methylnicotinamid, NAD = Nicotinamidadeninukleotid, NAM = Nicotinamid, NMN = Nicotinamid-Mononukleotid, NAMPT = Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase, NMNAT1 = Nicotinamidnukleotid-Adenyltransferasen, NNMT = Nicotinamide N-Methyltransferase, PARPs = Poly (ADP-ribose) Polymerasen, PGG₂ = Prostaglandin G₂, PGH₂ = Prostaglandin H₂, PGI₂ = Prostacyclin. (Bildobjekte bereitgestellt von Sevier Medical Art).

Beim *Salvage*-Signalweg wird NAD nicht aus Nicotinamid-Ribosid aufgebaut, sondern dieser Prozess beginnt mit der Umwandlung von NAM durch die Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPT) zu Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) im Zytoplasma. Daraufhin erfolgt die Transformation von NMN zu NAD mittels Nicotinamidnukleotid-Adenyltransferasen (NMNAT1/2/3) in verschiedenen zellulären Kompartimenten. Damit steht NAD für die vielfältigen Aufgaben zur Verfügung. NAD kann auch wieder abgebaut werden, wenn dieses gerade nicht benötigt wird. Dazu wird NAD durch Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARPs) wieder zu NAM umgebaut, wodurch dieses erneut für NAMPT zur Verfügung steht. Eine alternative Verwertung von NAM stellt die Bildung von Prostacyclin (PGI₂) im endoplasmatischen Retikulum (ER) dar. Dazu wird NAM zunächst über Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) im Zytoplasma zu 1-Methylnicotinamid (MNA) methyliert, um

anschließend im ER mit Prostaglandin G₂ (PGG₂) zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) und schließlich PGI₂ aufgebaut zu werden. Jedoch ist die Affinität von NAMPT zu NMN um mehr als ein hundertfaches höher als die von NNMT, wodurch der durch NAMPT induzierte Signalweg bevorzugt von der Zelle genutzt wird (Aksoy *et al.* 1994; Burgos & Schramm 2008; Revollo *et al.* 2004).

Die Expression von NAMPT wurde in allen humanen Geweben nachgewiesen (Shibata *et al.* 1986). Eine Deletion des *Nampt* Gens wirkt bereits in der embryonalen Phase letal (Revollo *et al.* 2007). Die katalytische Aktivität von NAMPT kann durch ATP gesteigert werden, wird allerdings gehemmt, wenn 90% der normalen physiologischen Konzentration an NAD erreicht ist (Dietrich *et al.* 1968; Hara *et al.* 2007). Das Enzym NMNAT katalysiert den nukleophile Angriff des 5'-Phosphats von NMN auf das α -Phosphoryl von ATP, wodurch NAD und Pyrophosphat (PP_i) entstehen (Magni *et al.* 2004). Es sind drei humane *Nmnat* Gene bekannt, welche sich im oligomeren Zustand, subzellulärer Lokalisation und katalytischen Eigenschaften unterscheiden (Berger *et al.* 2005). NMNAT1 ist in allen Geweben exprimiert (Fernando *et al.* 2002). Die essentielle Rolle von NMNAT1 im zellulären Metabolismus wird dadurch gezeigt, dass nach Deletion des Gens kein Überleben festgestellt wurde (Conforti *et al.* 2011). Während NMNAT2 vor allem an der Oberfläche des Golgi-Apparates vorkommt und teilweise reichlich in Herz- und Skelettmuskulatur sowie im Gehirn vorhanden ist, wurde NMNAT3 in Erythrozyten, in Lunge und Milz, wie auch in geringerem Maße in der Plazenta und den Nieren nachgewiesen (Berger *et al.* 2005; Di Stefano *et al.* 2010; Mayer *et al.* 2010; Raffaelli *et al.* 2002; Yalowitz *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2003). Noch kann nicht genau gesagt werden, ob durch NMNAT1-synthetisiertes NAD zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma ausgetauscht werden kann, jedoch scheint NMNAT1 den Verlust von NMNAT2 kompensieren zu können (Babetto *et al.* 2010; Conforti *et al.* 2009).

NAD wird in den Zellen für verschiedene Funktionen benötigt. So kontrolliert das nukleäre NAD die Aktivität der PARPs. PARP1 ist beispielsweise an der Reparatur der DNA beteiligt (Hassa & Hottiger 2008). Weiterhin wird nukleäres NAD als Substrat für die nukleären Sirtuine (SIRT1, 6 und 7) verwendet, welche die Expression einer Reihe von Genen durch die Deacetylierung von Histonen regulieren (Cen *et al.* 2011). Zytoplasmatisches NAD kann nicht durch die Membran der Mitochondrien transportiert werden, weshalb mittels NMN und NMNAT3 ein eigener mitochondrialer NAD-Pool generiert wird (Nikiforov *et al.* 2011). Es wird angenommen, dass der mitochondriale NAD-Pool die größte subzelluläre Ansammlung an NAD ist, was durch die zentrale Rolle der Mitochondrien in der oxidativen Phosphorylierung und ATP Synthese, sowie den Redox-Reaktionen beispielsweise im Krebs-Zyklus, unterstützt wird (Nikiforov *et al.* 2011).

NAD kann ebenfalls außerhalb der Zellen vorkommen, wobei die Konzentration deutlich geringer ist (O'Reilly & Niven 2003; Zocchi *et al.* 1999). Dieses extrazelluläre NAD ist an verschiedenen biologischen Funktionen beteiligt. Extrazelluläres NAD kann als Neurotransmitter fungieren oder die cAMP/cADPR/[Ca²⁺]_i Signalkaskade aktivieren, was zur Zellproliferation und Migration führt (Durnin *et al.* 2012; Fruscione *et al.* 2011; Yamboliev *et al.* 2009). Im Gegensatz zu NAMPT wurden bisher keine extrazellulären Formen von NMNAT beschrieben. Das hochaktive Protein NAMPT wird in der extrazellulären Form als eNAMPT bezeichnet. eNAMPT führt ebenfalls verschiedene biologische Funktionen aus. Es kann als Zytokin fungieren, welches die Immunantwort reguliert, wirkt anti-apoptotisch auf Immunzellen wie Makrophagen und ist essentiell für die Regulation der Glucose-stimulierten Insulin-Sekretion (Imai 2009). Die Funktion von eNAMPT als Zytokin ist komplex. Beispielsweise wurde eNAMPT gebildet und freigesetzt als Reaktion auf inflammatorische Stimuli (Jia *et al.* 2004).

NAMPT selbst ist ebenfalls an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Es wird in verschiedenen immunologischen Störungen hochreguliert, wie auch in akuten Verletzung der Lunge (*acute lung injury*, ALI), und gilt als möglicher neuer Faktor des angeborenen Immunsystems (Luk *et al.* 2008). Es wurde weiterhin berichtet, dass eine *in vitro*-Inhibition von NAMPT durch FK866 die Sekretion proinflammatorischer Zytokine unterdrückt (Busso *et al.* 2008). Durch eine erhöhte Aktivität von NAMPT in Krebserkrankungen werden NAMPT-Inhibitoren wie FK866 oder CHS-828 als potentielle Krebsmedikamente angesehen (Hasmann & Schemainda 2003a; Olesen *et al.* 2008).

1.5 microRNAs

Nicht-kodierende RNAs (*non-coding RNAs*, ncRNAs) sind eine Klasse funktioneller RNA-Moleküle ohne proteinkodierende Eigenschaften. Die ersten Gruppen ncRNAs, die ribosomale RNA (rRNA) und die Transfer RNA (tRNA), wurden bereits in den 1950er Jahren beschrieben und seither wurde dieses Feld durch die Entdeckung vieler weiterer ncRNAs bereichert (Palazzo & Lee 2015). Die am besten erforschte Gruppe der ncRNAs sind die im Jahre 1993 entdeckten microRNAs (miRNAs) (Lee *et al.* 1993). Diese RNA Moleküle haben eine Länge von 18 bis 25 Nukleotide und machen etwa 0,02% des gesamten RNA-Gehaltes einer Zelle aus (Bartel 2004; Bartel 2009; Esteller 2011; Palazzo & Lee 2015). Die Datenbank miRbase (Version 21) listet 2.558 humane miRNAs auf. Sie fungieren als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression durch Unterdrückung der mRNA-Translation. Es wird angenommen, dass mehr

als 60% aller proteinkodierenden Gene durch miRNAs kontrolliert werden (Friedman *et al.* 2009). Die Biogenese von miRNAs kann über zwei Arten erfolgen: Den kanonischen und den alternativen Biogeneseweg.

1.5.1 Biogenese und Funktion von microRNAs

Durch die RNA-Polymerase II werden RNA-Moleküle zu etwa 1 kb großen, primären miRNA-Transkripten, den sogenannten pri-miRNAs, umgeschrieben, welche jeweils eine einzelne oder eine Klasse an reifen miRNAs prozessieren können (Lee *et al.* 2004). Die pri-miRNA enthält eine Schleifenstruktur von etwa 34 bp Länge, wobei die terminale Schleife von einzelsträngigen RNA-Sequenzen flankiert ist (Ha & Kim 2014). Im Mikroprozessor erfolgt die Spaltung der pri-miRNA an spezifischen Schnittstellen, was den initialen Schritt in der kanonischen miRNA-Biosynthese darstellt (Auyeung *et al.* 2013). Der Mikroprozessor ist ein heterotrimerer Komplex aus einem Drosha-Protein mit dem aktiven Zentrum der RNase III und zwei *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DCGR8) Proteinen, welche RNA-bindende Domänen enthalten (Kwon *et al.* 2016). Durch diesen Spaltprozess entsteht eine etwa 60 nt große, haarnadelförmige Vorgängerform der miRNA, die sogenannte pre-miRNA (Denli *et al.* 2004; Lee *et al.* 2003). Weiterhin führt Drosha die Erkennung und Spaltung des Substrates nahezu allein aus, obwohl die Genauigkeit der Spaltung mit dem vollständigen DGCR8 Protein zunimmt (Nguyen *et al.* 2015). Nachdem die pre-miRNA durch Drosha prozessiert wurde, erfolgt der Transport in das Zytoplasma durch den Exportin 5 Komplex, wo schließlich die Reifung der miRNA abgeschlossen wird (Lund *et al.* 2004). Im Zytoplasma wird der nur 2 Nukleotid große Überhang am 3' Ende, welcher während der Prozessierung durch Drosha entstanden ist, von einem weiteren RNase III Enzym, Dicer, erkannt. Dicer spaltet schließlich die Schleifenstruktur ab und es entsteht ein etwa 22 nt langes miRNA Duplex-Molekül (Park *et al.* 2011; Yi *et al.* 2003). Vor wenigen Jahren wurde erkannt, dass die Genauigkeit von Dicer durch den Kofaktor *transactivation-responsive RNA-binding protein* (TRBP) gesteigert wird (Lee & Doudna 2012; Wilson *et al.* 2015). Schließlich wird das miRNA Duplex-Molekül vom Ago-Protein gebunden und aufgetrennt, wobei ein Strang, der sogenannte *guide*-Strang, den funktionellen *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) bildet und der andere, der *passenger*-Strang, sich abspaltet (Kwak & Tomari 2012).

Welcher Strang welche Funktion einnimmt, ist teilweise von den thermodynamischen Eigenschaften des miRNA Duplex-Moleküls abhängig (Noland & Doudna 2013). Der miRISC bindet an die Ziel-mRNA und beeinflusst deren Expression durch translationale Repression,

mRNA Deadenylierung und schließlich den Abbau der mRNA (Bartel 2009; Eichhorn *et al.* 2014; Huntzinger & Izaurralde 2011). Welche mRNA als Ziel-mRNA der miRNA fungiert, wird hauptsächlich durch die komplementären Sequenzen der miRNA Kern-Sequenz (die Nukleotide 2 bis 7 vom 5' Ende) und der passenden Region in der untranslatierten 3' Region (3' UTR) der mRNA bestimmt. Jedoch können auch die Nukleotide 8 und 13 bis 16 des miRNA Stranges zu einem gewissen Anteil an der Zielerkennung beteiligt sein (Ameres & Zamore 2013). So kann eine miRNA an verschiedene mRNAs binden und eine mRNA von verschiedenen miRNAs adressiert werden (Krek *et al.* 2005). Mehr als 60% der proteinkodierenden Gene haben eine oder mehr konservierte miRNA-Bindesequenzen, wodurch die Bedeutung der miRNAs als Regulatoren zellulärer Prozesse verdeutlicht wird (Cloonan 2015; Friedman *et al.* 2009; Krek *et al.* 2005).

Die biologische Relevanz von miRNAs ist in vielen Fällen bekannt, jedoch für die meisten noch immer unerforscht. Nichtsdestotrotz können Abweichungen in der Expression von miRNAs schwerwiegende Auswirkungen haben und wurden bereits mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten assoziiert (Bartel 2004; Lin *et al.* 2010).

1.5.2 microRNAs in Erkrankungen

Die Rollen, welche miRNAs in Erkrankungen einnehmen können, sind vielfältig. Beispielsweise wird die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen oder natürliche Killerzellen, durch miRNAs gesteuert (Aalaei-andabili & Rezaei 2013; Essandoh *et al.* 2016; Montagner *et al.* 2013; Nahid *et al.* 2011; Smyth *et al.* 2015). Weiterhin werden verschiedene miRNAs, wie die miRNA-155 oder die miRNA-505, in durch Mykobakterien-infizierten, dendritischen Zellen runterreguliert, wodurch Proteine des Immunsystems translational unterdrückt werden (Siddle *et al.* 2015). Viele miRNAs werden durch TLR-Signalwege induziert, welche wiederum Teile des TLR-Signalweges adressieren, wie z. B. Signalproteine, regulatorische Moleküle oder Zytokine (Curtale *et al.* 2013; Lai *et al.* 2013; Quinn *et al.* 2013). Dies ermöglicht eine Feinabstimmung über Kontrollmechanismen, durch welche eine Infektion in kontrollierter Weise bekämpft werden kann (Rossato *et al.* 2012). So wird über den TLR4-Signalweg nicht nur die miRNA-155, sondern auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, welches eine überschüssige Entzündung verhindert, induziert (McCoy *et al.* 2010).

Die Beteiligung von miRNAs in verschiedenen Krankheitsbildern wurde in vielen Studien untersucht. So gibt es eine Reihe von miRNAs, welche in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes in Sepsis-Patienten dereguliert waren, wie z. B. miRNA-143, miRNA-146a

oder miRNA-584 (Han *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2015). Auch in neueren Studien wurden weitere miRNAs im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten von Sepsis-Patienten gefunden, welche im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen und eine mögliche Biomarker-Funktion einnehmen könnten (Sheng *et al.* 2017). Ferner könnten miRNAs bei Organversagen, bspw. in Folge einer Sepsis, als Biomarker fungieren. In einer Studie von Liu und Kollegen wurde eine erhöhte Expression der miRNA-23a-5p in Ratten detektiert, welche an einem durch LPS ausgelösten akuten Atemnotsyndrom litten (Liu *et al.* 2016b).

Die erste Beteiligung von miRNAs in Krebserkrankungen wurde in einer chronischen, lymphozytischen Leukämie (CLL) entdeckt (Calin *et al.* 2002; Lin *et al.* 2014). Hier wurde die miRNA-15a-miRNA-16-1-Gruppe durch epigenetische Veränderungen bei 69% der Patienten komplett deletiert oder deutlich runterreguliert. Heutzutage wird die veränderte Expression von miRNAs als ein wichtiger Schritt bei der Initiation und Progression vieler Krebserkrankungen anerkannt (Ji *et al.* 2017). Dies gilt ebenfalls für Krebserkrankungen der Lunge. Diese können in zwei Gruppen eingeteilt werden: kleinzelliger Lungenkrebs (SCLC von *small cell lung cancer*) und nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC von *non-small cell lung cancer*). NSCLC macht etwa 80% aller Lungenkrebserkrankungen aus und umfasst u. a. sowohl Plattenepithelkarzinome als auch Adenokarzinome (Sittka & Schmeck 2013). Aufgrund der hohen Fallzahlen, Mortalitätsraten und sozioökonomischen Belastungen umfasst die Forschung nach neuen Biomarkern und putativen therapeutischen Möglichkeiten ebenso die Untersuchung von miRNAs bei Lungenkrebs. Beispielsweise wurde die miRNA-494 in Lungenkrebszellen als durch HIF-1 α hochreguliert gefunden (Mao *et al.* 2015). Zur verbesserten Diagnose von Lungenkrebs wird versucht, im Blut zirkulierende miRNAs als Biomarker zu nutzen. Dafür wurden in einer Studie Plasmaproben von Patienten mit NSCLC und ohne Krebserkrankung auf miRNAs untersucht. Wenige miRNAs wurden dabei mit erhöhter (6 miRNAs) oder verringerter (2 miRNAs) Expression im Serum der Krebspatienten detektiert, welche potentiell für eine frühe Krebsdiagnose wichtig sein könnten (Rani *et al.* 2013; Wozniak *et al.* 2015). Diese Studien zeigen nicht nur das Potential der miRNAs als Krankheitsverursacher, sondern ebenso die Möglichkeiten miRNAs als Hilfsmittel der Krankheitserkennung zu nutzen.

Ferner spielen miRNAs in Infektionserkrankungen eine wichtige Rolle. Im Jahre 2006 erschienen die ersten Studien, welche sich mit der miRNA-Wirtsantwort auf bakterielle Komponenten beschäftigen. Dabei handelte es sich um die Infektion der Pflanze *Arabidopsis thaliana* mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* und der dadurch vermittelten Induktion der miRNA-393 (Navarro *et al.* 2006). Im selben Jahr führten Untersuchungen zur

Immunantwort nach LPS-Stimulation in humanen Monozyten zur Charakterisierung der miRNA-146a/b (Taganov *et al.* 2006b). Bis heute wurden in mehr als 50 Infektionsmodellen die miRNA-Regulationen untersucht (Drury *et al.* 2017).

MiRNAs können im Zusammenhang mit Infektionen vielfältige Auswirkungen nicht nur auf den Wirt, sondern auch auf das Pathogen haben. So hat die humane miRNA-223 suppressive Auswirkungen auf die mRNA des HI-Virus 1 (Huang *et al.* 2007). Andererseits zeigten Studien mit dem Epstein-Barr Virus, dass eine vom Virus prozessierte miRNA (miRNA-BHRF1-3) die Expression des humanen *C-X-C-motif chemokine 11* (CXCL11) Gens beeinflusst (Xia *et al.* 2008). Außerdem spielen miRNAs in bakteriellen Infektionen eine Rolle. Kürzlich wurde in einer Studie das miRNA-Profil von Magenkrebs-Patienten mit und ohne Infektion mit *Helicobacter pylori* untersucht. Dabei wurden 53 unterschiedliche, signifikant regulierte miRNAs gefunden, wovon die nach *H. pylori*-Infektion hochregulierte miRNA-143-3p die höchste Signifikanz aufwies (Wang *et al.* 2017b). Das intrazelluläre Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* reguliert die miRNA-26a in infizierten Makrophagen runter, wodurch die M2-Polarisation der Makrophagen gefördert wird und die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bakterien steigt (Sahu *et al.* 2017). Manche miRNAs wurden auch mit parasitären Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die Infektion mit den Malariaerregern *Plasmodium spec.* beeinflusst ebenfalls das humane miRNA Profil. Neben der miRNA-451 stellt auch die miRNA-16 einen potentiellen Biomarker in *Plasmodium*-Infektionen dar. Für beide miRNAs wurden reduzierte Spiegel in Serumproben von Patienten sowie in Zellen nach Infektion mit *P. vivax* detektiert (Chamnanchanunt *et al.* 2015).

Der Nutzen von zirkulierenden miRNAs z. B. in Plasma oder Serum, wurde durch eine Studie, welche eine gute Stabilität für diese miRNAs nachwies, unterstützt (Mitchell *et al.* 2008). Diese Studie zeigte ebenfalls, dass diese zirkulierenden miRNAs zudem Genexpressionen beeinflussen können. Zirkulierende miRNAs wurde in verschiedenen Infektionssituationen analysiert. So wurde nach entsprechenden Expressionsmustern in dem Blut von Mäusen gesucht, welche mit LPS oder LTA behandelt waren (Hsieh *et al.* 2012; Hsieh *et al.* 2013).

Durch die vielfältigen Auswirkungen, welche miRNAs in verschiedensten Infektionen und Erkrankungen haben, ist die Option, miRNAs als Wirkstoff einzusetzen, zurzeit stark diskutiert. Es gibt Hinweise aus einer Mausstudie, dass die durch Infektionen mit *Salmonella enterica* hochregulierte miRNA-128 positiv für das Überleben der Bakterien ist. Wenn nun jedoch eine entsprechende anti-miRNA-128 verabreicht wird, kommt es zu einer verminderten Infektion mit *S. enterica* in den Mäusen (Zhang *et al.* 2014b). Ebenso wurde in der Infektion mit HCV ein

Oligonukleotid-Inhibitor für die miRNA-122 eingesetzt und zeigte vielversprechende Ergebnisse, konnte jedoch eine Erholung des Virus durch Mutation nicht verhindern (Stelma *et al.* 2017; van der Ree *et al.* 2017; van der Ree *et al.* 2014).

1.5.3 microRNAs in Streptokokkeninfektionen

Einige Studien beschreiben die Auswirkungen von miRNAs in Streptokokkeninfektionen. Kürzlich wurde eine Beteiligung der miRNA-194-3p bei der Adhärenz von *S. equi* subspecies *zooepidemicus* an eine Schweinenierenzelllinie beschrieben (Tang *et al.* 2017). Eine andere Studie befasste sich mit dem miRNA-Expressionsprofil von Eutergeweben nach Mastitis durch *S. agalactiae*, wodurch die regulatorischen Mechanismen von miRNAs in dieser Erkrankung näher beleuchtet werden konnten (Pu *et al.* 2017). In Infektionen mit *S. pneumoniae* wurde die miRNA-155 als essentiell gefunden, um eine primäre oder sekundäre Besiedlung des Bakteriums zu verhindern (Verschoor *et al.* 2014). Weiterhin soll die miRNA-155 mit der Aufnahme der Pneumokokken in Makrophagen in Zusammenhang stehen. Dies wurde mittels aufgereinigter Endopeptidase O aus *S. pneumoniae* untersucht (Yao *et al.* 2017a). Zusätzlich wurde die miRNA-146a in Verbindung mit *S. pneumoniae*-Infektionen in Makrophagen gebracht (Griss *et al.* 2016). In dieser Infektionsstudie wurde eine durch diese miRNA vermittelte negative Rückkopplung (*Feedback Loop*) untersucht, wodurch eine überschüssige Immunantwort verhindert wurde. Die Regulationen von miRNAs wurden ferner in Koinfektionsmodellen untersucht. Dafür wurden neben monozytären, primären Blutzellen ebenfalls eine Zelllinie mit *S. pneumoniae* und einem Influenza A Virus infiziert und neben mRNAs und Zytokinen/Chemokinen auch das miRNA Profil untersucht (Hoffmann *et al.* 2016). Hierbei wurden miRNAs beschrieben, welche nur durch ein Pathogen reguliert wurden, wie bspw. die Expression der miRNA-206 lediglich in IAV Infektionen erhöht wurde. Weiterhin wurden synergistisch regulierte miRNAs detektiert, wie die miRNA-196-5p oder die miRNA-200a-3p.

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass der Fokus bei frühen Infektionszeitpunkten lag. Die Einbeziehung späterer Zeitpunkte, in denen sich das Bakterium komplett auf den Wirt und die Infektionssituation angepasst hat, würde das Wissen über diese Wirts-Pathogen-Beziehung vertiefen und bedarf daher noch weiterer Forschung.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der noch immer wenig verstandenen Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und humanen Epithelzellen, sollte durch das Erstellen eines globalen, infektionsbedingten Expressionsprofils im Rahmen dieser Arbeit die Reaktion des Wirtes auf diese Infektion näher untersucht werden. Dafür sollte die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B mit *S. pneumoniae* infiziert und die mRNA-, Protein- und miRNA-Expressionen zu frühen und prä-apoptischen Infektionszeitpunkten untersucht werden. Ferner sollte ein Stimulus zur Induktion einer TLR2-abhängigen Immunantwort verwendet werden, wodurch diese von *S. pneumoniae*-spezifischen Signalen unterschieden werden kann. Diese Hochdurchsatzdaten sollten durch Signalweganalysen (*pathway enrichment analyses*) auf *S. pneumoniae*-spezifischen und TLR2-vermittelten, infektionsbedingten Regulationen analysiert werden. Durch funktionelle Analysen auf mRNA- und Protein-Ebene sollten beteiligte regulatorische Faktoren identifiziert und daraufhin näher betrachtet werden. Ferner sollten die mRNA- und miRNA-Daten auf regulatorische Interaktionen hin untersucht werden. Durch gezielte Manipulationen ausgewählter, regulierter RNAs sollten die Auswirkungen auf die Wirtszelle sowie auf die bakterielle Replikation hin analysiert werden.

Des Weiteren sollten Infektionen in humanem *ex vivo* Lungengewebe erfolgen, um die Kenntnisse nicht nur der Pneumokokkeninfektion, sondern auch der bakteriell-viralen Koinfektionen zu verbessern. Hierzu sollte sowohl eine *S. pneumoniae*-Infektionsreihe als auch Koinfektionen mit *S. pneumoniae* und Influenza A Viren durchgeführt werden. Dabei sollten die inflammatorischen Reaktionen der Lunge auf die verschiedenen Infektionen hin untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, inwieweit die Erkenntnisse aus dem Zellkulturexperiment zur Generierung der Hochdurchsatzdaten auf das Lungenmodell übertragbar sind.

2 ERGEBNISSE

2.1 Humanes Lungengewebe als *ex vivo* Infektionsmodell

Um eine realitätsnahe Infektion der humanen Lunge als Modellsystem nachzubilden, wurde ein *ex vivo* Modell mit humanem Lungengewebe etabliert. Hierfür wurde humanes Lungengewebe durch das Universitätsklinikum Marburg, nach der Operation geeigneter Patienten durch Prof. Dr. Kirschbaum, bereitgestellt. Dieses Lungengewebe wurde anschließend vorbereitet und infiziert (siehe 4.2.1.5).

Das *ex vivo* Modell wurde für zwei verschiedene Infektionsansätze verwendet. Zum einen wurde die Auswirkung einer *S. pneumoniae*-Infektion durch Injektion zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h und 24 h untersucht. Zum anderen erfolgte die Etablierung einer *post*-Influenza *S. pneumoniae*-Infektion. Als Kontrolle wurde Medium-behandeltes Gewebe verwendet. Zur Untersuchung der Auswirkungen der Infektionen auf das Gewebe wurde die CXCL8-Sekretion in den Überständen mittels eines ELISA gemessen. Dabei wurde der Gewichtsunterschied der einzelnen Gewebestücke mit einbezogen, indem die ermittelten Konzentrationen an freigesetztem CXCL8 ins Verhältnis zum jeweiligen Gewicht der Gewebestücke gesetzt wurden. Weiterhin wurde die RNA aus den Gewebestücken isoliert und es erfolgte die Untersuchung der mRNA-Expressionen der proinflammatorischen Marker IL-6 und SOD2, sowie des virusinduzierten CXCL10 in den koinfizierten Lungen mit Hilfe der quantitativen PCR (siehe 4.2.2.1).

2.1.1 Inflammatorische Reaktionen auf *S. pneumoniae*-Infektionen

In der Kontrolle, welcher als Basiswert diente, wurde eine Sekretion von etwa 16 ng/ml CXCL8 nachgewiesen (Abbildung 2-1 A). Über die Zeit zeigte sich bei den kontroll-infizierten Gewebestücken ein kontinuierlicher Anstieg an freigesetztem CXCL8 mit einer Maximalausschüttung nach 24 h von fast 1.400 ng/ml. In den infizierten Lungenstücken wurden nach 6 h Inkubation mit *S. pneumoniae* 380 ng/ml CXCL8 im Überstand gemessen im Vergleich zum 6 h Kontrollwert von 50 ng/ml. Dieser Wert steigerte sich auf über 3.400 ng/ml nach 24 h und stellte nach 6 h wie auch nach 24 h einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle dar. Die Analyse der IL-6 mRNA zeigte in den nicht infizierten Kontrollen eine 3- bis 3,5-fache Induktion zu allen Zeitpunktes des Experimentes (Abbildung 2-1 B). Durch die Infektion mit *S. pneumoniae* wurde eine 7-fach gesteigerte Expression von IL-6 nach 6 h

gemessen. Nach 12 h wurde eine 8,5-fache Induktion nachgewiesen, welche zum 24 h Zeitpunkt auf etwa 5-fach reduziert wurde. Die Induktion der SOD2 mRNA lag in den uninfizierten Kontrollen zu allen Zeitpunkten des Experimentes bei etwa 1,6-fach (Abbildung 2-1 C). Die infizierten Gewebeproben zeigten eine dazu erhöhte Expression von etwa 2,3-fach nach 12 h und 24 h. Die maximale Induktion der SOD2 mRNA lag bei 3,4-fach nach 12 h *S. pneumoniae*-Infektion. Diese Änderungen stellten jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede dar.

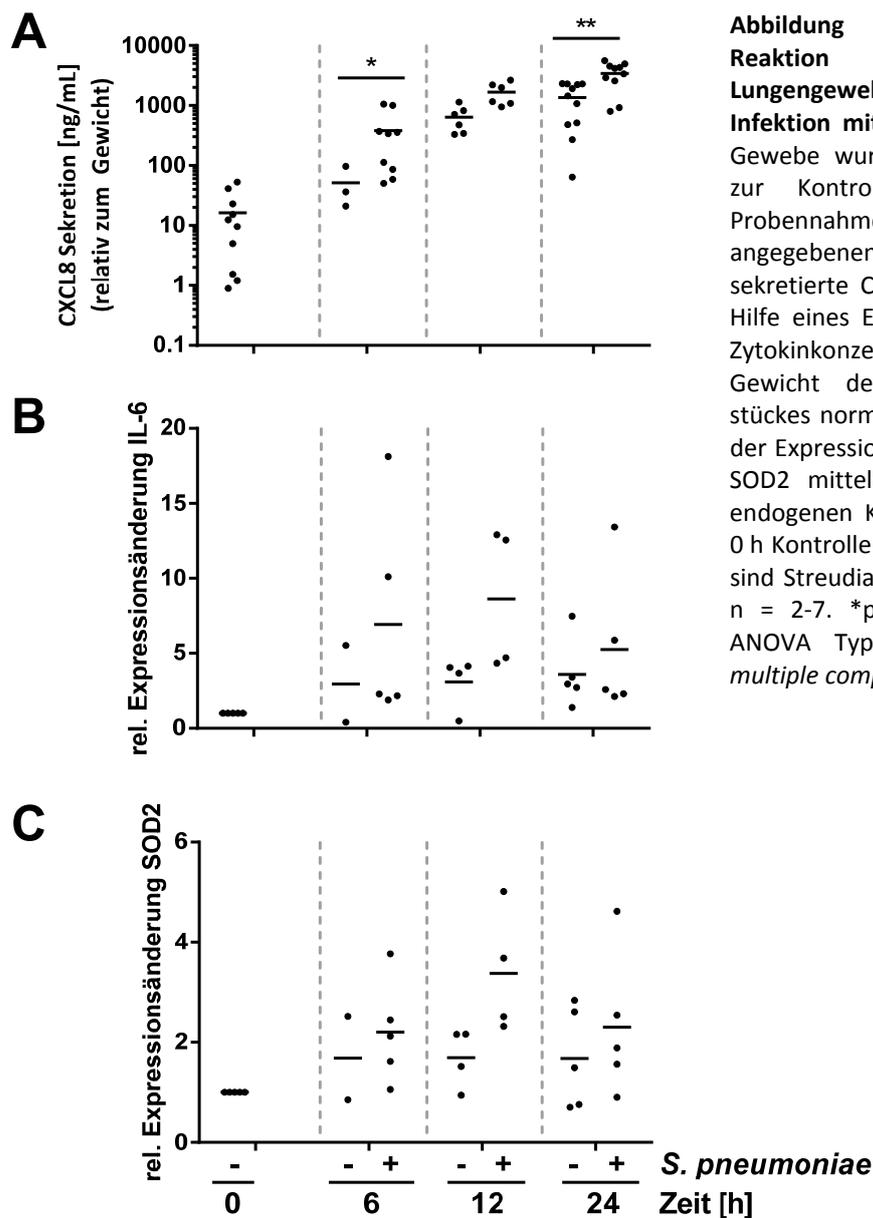


Abbildung 2-1: Inflammatorische Reaktion von humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit *S. pneumoniae*. In das Gewebe wurde *S. pneumoniae* oder zur Kontrolle Medium injiziert. Probennahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten. **A)** Die sekretierte CXCL8 Menge wurde mit Hilfe eines ELISA ermittelt. Absolute Zytokinkonzentration wurde auf das Gewicht des jeweiligen Gewebestückes normalisiert. **B – C)** Analysen der Expressionen von **(B)** IL-6 und **(C)** SOD2 mittels qPCR. Es wurde zur endogenen Kontrolle RPS18 und zur 0 h Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Streudiagramme mit Mittelwert. $n = 2-7$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (2way ANOVA Typ II mit Tukey's HSD multiple comparison test).

Zusammenfassend wurde eine Induktion an sekretiertem CXCL8 in den infizierten Lungenstücken im Vergleich zu den Kontrollgeweben nachgewiesen. Die Expression proinflammatorischer mRNAs war Schwankungen unterworfen. Es wurde zu allen Zeitpunkten gesteigerte, nicht signifikante IL-6- und SOD2-Expression nach Infektion im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ermittelt. Diese Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte, teilweise signifikante Immunantwort aufgrund der *S. pneumoniae*-Infektion hin.

2.1.2 Inflammatorische Reaktionen auf Influenza-*S. pneumoniae*-Koinfektionen

Nachdem, wie zuvor beschrieben, das *ex vivo* Lungengewebe erfolgreich mit *S. pneumoniae* infiziert wurde, sollten im Folgenden viral-bakterielle Koinfektionen in diesem Lungenmodell untersucht werden. Dafür wurden die Influenza A Subtypen H1N1 und H3N2 und erneut das Bakterium *S. pneumoniae* in Einzelinfektionen sowie den jeweiligen Kombinationen verwendet.

Da das Influenza A Virus aktiv in die Wirtszellen eindringen kann, wurde das humane Lungengewebe durch Tropfinokulation mit dem Influenza A Virus für 1 h infiziert. Die Infektion mit *S. pneumoniae* erfolgte weitere 7 h später mittels Injektion. Die Probennahme wurde 1 h, 8 h und 24 h nach der Virusinfektion durchgeführt. Als Basiswert in den Auswertungen wurde der 1 h Wert genutzt. Zur Untersuchung der inflammatorischen Reaktion der Lunge auf die Koinfektion wurde zunächst die sekretierte CXCL8-Konzentration im Überstand mittels ELISA analysiert bzw. die Expressionslevel von IL-6, SOD2 und CXCL10 bestimmt.

Über die Zeit wurde ein stetiger Anstieg an sekretiertem CXCL8 in den kontrollstimulierten Gewebeproben gemessen, welcher nach 24 h ein Maximum von über 1.600 ng/ml erreichte (Abbildung 2-2 A). Die Infektion mit dem H1N1 Virus führte zu einer Sekretion von 115 ng/ml CXCL8 nach 8 h und 2.200 ng/ml nach 24 h. Nach der H3N2 Virusinfektion wurden 113 ng/ml CXCL8 nach 8 h gemessen, was eine deutliche Reduktion im Vergleich zu 8 h Kontrolle bedeutete. Weiterhin wurden 1.800 ng/ml nach 24 h H3N2 Infektion gemessen. Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu einer signifikanten Ausschüttung von 2.900 ng/ml nach 16 h Infektion. Die Koinfektionen führten zu einer weiteren Steigerung der CXCL8-Menge im Vergleich zur alleinigen Virusinfektion und erreichte Werte von über 3.500 ng/ml (H1N1) bzw. 2.900 ng/ml (H3N2). Diese Konzentrationen stellten deutliche, aber nicht signifikante Änderungen im Vergleich zum Kontrollgewebe dar.

Die Expression der IL-6 mRNA stieg in den kontrollstimulierten Gewebestücken über die Zeit auf das 1,8-fache nach 24 h an (Abbildung 2-2 B). Nach der Infektion mit dem H1N1 Virus wurde eine Erhöhung der IL-6-Expression nach 8 h auf das 1,5-fache gemessen, welche zum 24 h Zeitpunkt auf das 3,3-fache stieg. Die Infektion mit dem H3N2 Influenzavirus bewirkte nahezu eine 1,3-fache Änderung der Expression 8 h nach Infektion. Zum Zeitpunkt 24 h wurde eine Induktion um das 5,2-fache nach der H3N2 Infektion gemessen. Zum selben Zeitpunkt führte die Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer 3,5-fachen Erhöhung der IL-6-Expression. Weiterhin wurden in den koinfizierten Lungen über 4-fach erhöhte IL-6-Expressionen detektiert.

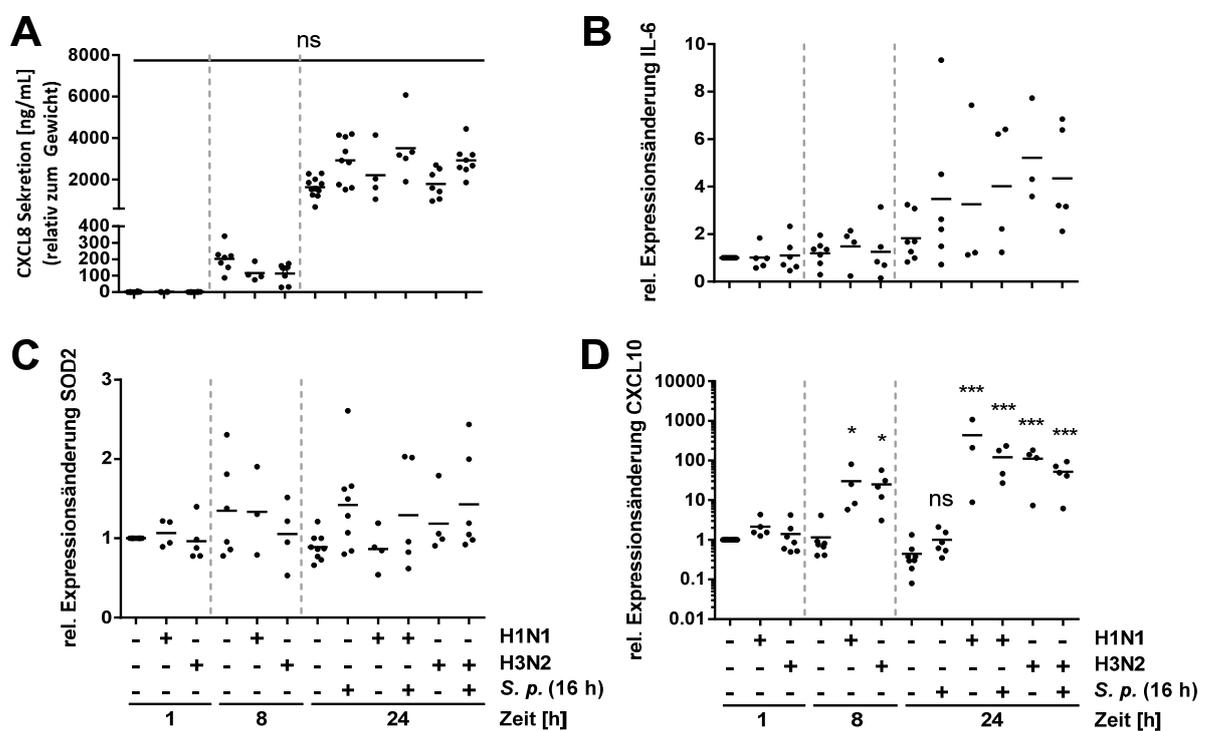


Abbildung 2-2: Inflammatorische Reaktion von humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit Influenza A Viren (H1N1 oder H3N2) und/oder *S. pneumoniae* (*S. p.*). Das Gewebe wurde durch Zugabe des Virus oder per Injektion der Bakterien infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. **A)** Die sekretierte CXCL8-Menge wurde mittels ELISA analysiert. Die absolute Zytokinkonzentration wurde auf das Gewicht des jeweiligen Gewebestückes normalisiert. **B – D)** Analysen der Expressionen von **(B)** IL-6, **(C)** SOD2 und **(D)** CXCL10 erfolgten mittels qPCR. Es wurde zur endogenen Kontrolle RPS18 und zur 1 h Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Streudiagramme mit Mittelwert. n = 3-11. *p<0,05, ***p<0,001 (2way ANOVA Typ II mit Tukey's HSD multiple comparison test).

Die Expression von SOD2 stieg in den kontrollinfizierten Lungengewebestücken nach 8 h gering auf 1,3-fach an und fiel zum 24 h Zeitpunkt wieder auf 0,9-fach ab (Abbildung 2-2 C). Die H1N1 Infektion führte zu keiner veränderten Expression der SOD2 mRNA über alle Zeitpunkte im

Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Weiterhin bewirkte die Infektion mit dem H3N2 Virus eine geringe Erhöhung der SOD2-Expression über die Zeit auf bis zu bis 1,3-fach. Ferner wurde in den *S. pneumoniae*-infizierten Gewebestücken eine SOD2-Expression von 1,4-fach ermittelt. Die Koinfektionen führten zu ähnlichen Expressionsänderung wie die *S. pneumoniae*-Infektion von 1,3- bis 1,4-fach. Die Analyse der Expression von CXCL10 zeigte eine Reduktion in den Kontrollgeweben über die Zeit auf 0,5-fach nach 24 h (Abbildung 2-2 D). Die Infektion mit dem H1N1 Virus bewirkte eine CXCL10-Induktion von 30-fach nach 8 h und signifikant auf 430-fach nach 24 h. Außerdem wurde eine erhöhte CXCL10-Expression nach der H3N2 Infektion gemessen, welche auf 25-fach nach 8 h und 110-fach nach 24 h stieg. Zum 24 h Zeitpunkt wurde keine veränderte CXCL10-Expression nach alleiniger *S. pneumoniae*-Infektion ermittelt. Die Koinfektionen ergaben Expressionswerte, welche geringer als die viralen Einzelinfektionen waren, nämlich 120-fach nach der H1N1- und 50-fach nach der H3N2-Koinfektion.

Somit wurde beobachtet, dass die freigesetzte CXCL8-Menge deutlich über die Zeit anstieg, jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den Kontrollgewebestücken und den Pneumokokken-infizierten Gewebestücken nach 24 h führte. Die Infektionen mit den Viren bewirkten erwartungsgemäß deutliche Steigerungen der CXCL10-Expression, welche nicht nach Infektion mit *S. pneumoniae* auftraten. Die Expression von IL-6 stieg über die Zeit an und zeigte deutliche, aber nicht signifikante Erhöhungen nach den Infektionen zum 24 h Zeitpunkt. Die SOD2-Expression wurde über die Zeit in infizierten und in Kontrollgeweben nur gering verändert. Es kann auf eine erfolgreiche Koinfektion des Lungengewebes geschlossen werden, welche durch unterschiedlich starke inflammatorische Reaktionen in Abhängigkeit der Erreger und deren Kombinationen deutlich wird. Jedoch wird ebenfalls deutlich, dass die stärksten Unterschiede mittels Proteinsekretion bestimmt werden konnten. Die Expressionsanalysen unterlagen vermutlich starken donorabhängigen Schwankungen.

2.2 Etablierung der *Streptococcus pneumoniae* Infektion in BEAS-2B Zellen

Um die globalen Auswirkungen einer *S. pneumoniae*-Infektion auf die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B zu analysieren, wurden zunächst die Infektionsparameter festgelegt. Der Fokus lag auf inflammatorischen Mechanismen der Wirtszelle. Dabei sollten möglichst wenige apoptotische Prozesse der Wirtszelle aktiviert werden. Dafür erfolgte entsprechend die Bestimmung der Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie sowie der inflammatorischen Reaktion der Zellen durch Ausschüttung von CXCL8 mit Hilfe eines ELISA. In vorangegangenen

Experimenten wurden sowohl Dosis- als auch Zeitreihen für die *S. pneumoniae*-Infektion in BEAS-2B Zellen durchgeführt. Daher wurden die Bronchialepithelzellen mit *S. pneumoniae* D39 Wildtyp (wt) für 9 h und 16 h und unter der Verwendung der Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,5 und 1 infiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte BEAS-2B Zellen. Zur Analyse der sekretierten CXCL8-Menge im Überstand der Zellen wurde zusätzlich eine Positivkontrolle mitgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit dem Lipoprotein (LP) des grampositiven Bakteriums *S. aureus* behandelt. LP ruft eine generelle, TLR2-vermittelte Immunreaktion in den Zellen hervor (Hashimoto *et al.* 2006), wodurch in späteren Experimenten eine *S. pneumoniae*-spezifische Wirtsantwort definiert werden sollte.

Die Zellen wurden, wie unter 4.2.2.9 beschrieben, abgelöst und unter Verwendung der Farbstoffe Annexin-V (Bindung an Phosphatidylserin, Apoptosemarker) und 7-AAD (DNA Interkalator, Zelltodmarker) mittels durchflusszytometrischer Messung analysiert und quantifiziert. Die Kontrolle wies zum 9 h Zeitpunkt eine deutlich integre Zellpopulation auf, welche ungefärbt im linken, unteren Raster detektierbar war und somit die lebenden Zellen repräsentierte (Abbildung 2-3 A). Zum 16 h Zeitpunkt wurden in der uninfizierten Kontrolle deutlich über 90% lebende Zellen detektiert.

Nach Infektion mit den MOIs 0,5 oder 1 wurden sowohl zum 9 h als auch zum 16 h Zeitpunkt Lebendzellpopulationen von zirka 90% der Gesamtzellzahl gemessen. In der Zusammenfassung von fünf unabhängigen biologischen Replikaten wurde deutlich, dass es zu minimalen Unterschieden hinsichtlich der Apoptoseinduktion kam (Abbildung 2-3 B). Während sich der prozentuale Anteil lebender BEAS-2B Zellen in den 9 h Proben zwischen den Kontrollzellen und den Infektionen um zwei Prozentpunkte verringerte, betrug der maximale Unterschied 16 h nach Infektion fünf Prozentpunkte. Damit verblieben bei maximaler Todes- oder Absterberate über 88% lebende Zelle, welche für die weiteren Analysen zu Verfügung standen.

Um zu überprüfen, ob die infizierten Zellen nach Behandlung mit einer Sekretion von CXCL8 reagierten, wurde ein ELISA (beschrieben unter 4.2.2.8) durchgeführt. In nicht infizierten Kontrollzellen wurde, wie erwartet, eine geringe CXCL8-Sekretion von 0,1 ng/ml nachgewiesen (Abbildung 2-3 C). Folglich lag keine Vorstimulation der Zellen vor. Bei den LP-stimulierten Zellen wurde eine starke, signifikante inflammatorische Reaktion detektiert. Nach 9 h wurde eine CXCL8-Konzentration von etwa 10 ng/ml gemessen. Dies steigerte sich zum 16 h Zeitpunkt auf über 16,5 ng/ml. Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu einem signifikanten Anstieg an CXCL8. Dabei steigerte sich die CXCL8-Konzentration bei einer MOI 0,5 über die Zeit von

2,4 ng/ml auf über 7 ng/ml. Bei der MOI 1 steigerte sich die Konzentration vom 9 h Zeitpunkt zu 16 h von 2,5 ng/ml auf über 9 ng/ml.

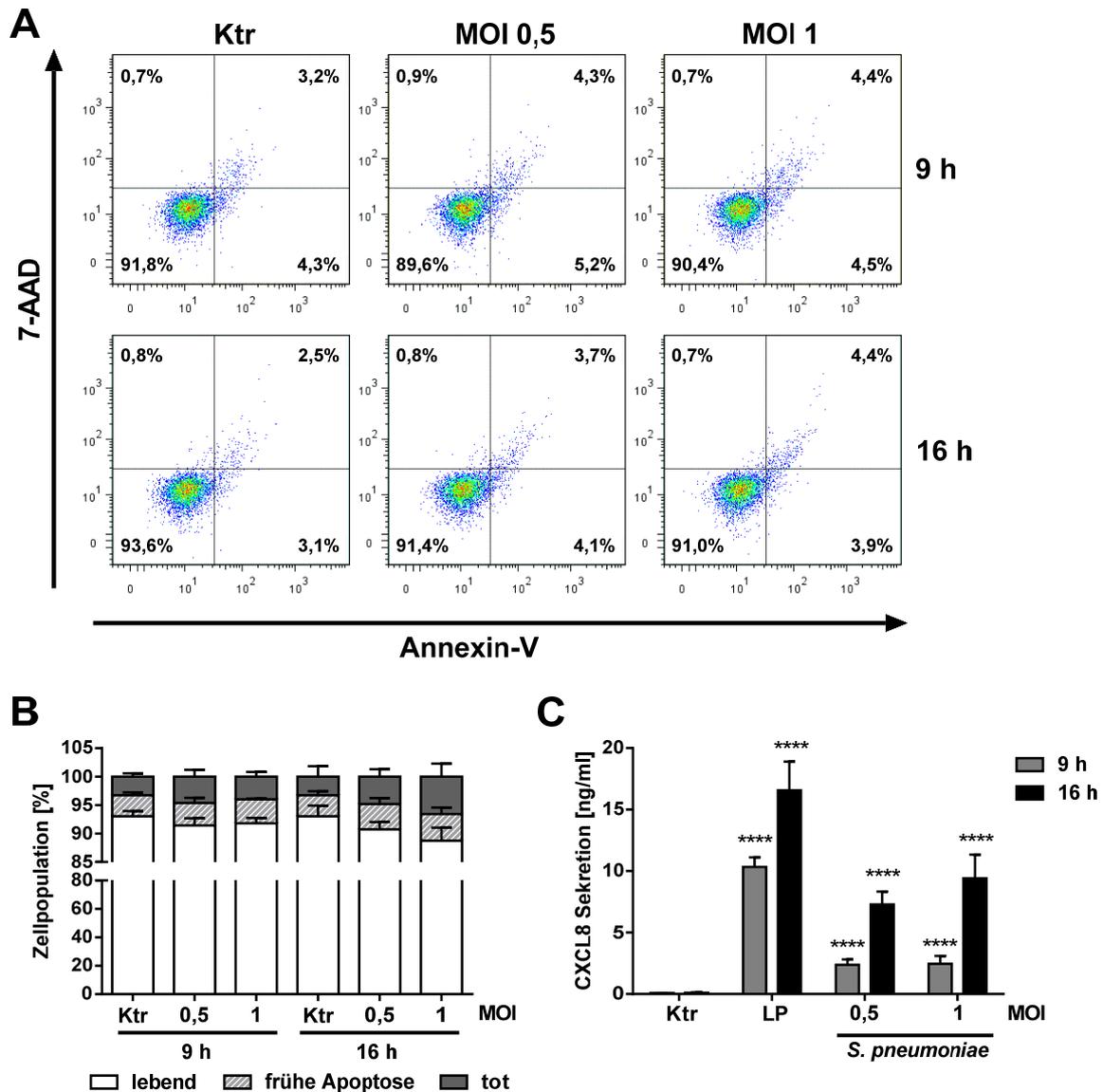


Abbildung 2-3: Durchflusszytometrische Analyse der Zytotoxizität und CXCL8-Sekretion gemessen via ELISA von infizierten BEAS-2B Zellen. BEAS-2B Zellen wurden mit LP (1 µg/ml) stimuliert oder mit *S. pneumoniae* D39 wt (MOI 0,5 und 1) für 9 h und 16 h infiziert. Kontrollzellen (Ktr) blieben unbehandelt. **A**) Repräsentative Abbildung der durchflusszytometrischen Messung nach Färbung mit Muse® Annexin V and Dead Cell Assay. **B**) Quantitative Analyse der Zytotoxizität aus fünf Messungen unabhängiger biologischer Replikate mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil der Zellviabilität an der Gesamtzellpopulation. Die Zellen aus der Phase der späten Apoptose wurden mit den abgestorbenen Zellen in der Population „tot“ zusammengefasst. **C**) Im ELISA gemessene CXCL8-Sekretion wurde in ng/ml abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. LP = Lipoprotein. n = 4-5. ****p≤0,0001 (2way ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).

Somit wurde in den BEAS-2B Zellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* und den hier verwendeten Zeit- und MOI-Bedingungen keine bedeutsame Zytotoxizität induziert. Zusätzlich wurde eine inflammatorische Reaktion in den Zellen hervorgerufen, wodurch diese Infektionsparameter die optimalen Bedingungen für die weiteren Untersuchungen repräsentierten.

2.3 Gewinnung der Hochdurchsatzdaten

Die Generierung der Hochdurchsatzdaten von BEAS-2B Zellen nach *S. pneumoniae*-Infektion sollen der Untersuchung regulatorischer Netzwerke aus mRNAs, Proteinen und miRNAs dienen. Das RNA-Profil wurde dazu auf mRNA-Ebene mittels *Microarrays* und auf miRNA-Ebene durch Sequenzierung ermittelt. Das Proteinprofil der BEAS-2B Zellen wurde durch SILAC Analyse und anschließender nanoLC-MS/MS bestimmt. Die einzelnen Profilanalysen werden im Folgenden näher betrachtet.

2.3.1 Untersuchung des Transkriptoms von BEAS-2B Zellen nach

S. pneumoniae-Infektion

Zur Analyse des mRNA-Profiles von stimulierten sowie infizierten BEAS-2B Zellen wurden *Microarray*-Analysen durchgeführt. Durch den Vergleich zwischen LP-induzierten Genen und *S. pneumoniae*-induzierten Genen sollten allgemeine, TLR2-abhängige Regulationen auf einen grampositiven Stimulus von pneumokokkenspezifischen mRNA-Regulationen unterschieden werden.

Die *Microarrays* der Firma Agilent Technologies umfassen über 46.000 Sequenzen des humanen Genoms mittels Sonden. In BEAS-2B Zellen waren letztlich 9.993 Sequenzen, definiert durch das Überschreiten des Schwellenwertes der Signalstärke, basierend auf allen Bedingungen exprimiert. Mehr als 90% der exprimierten Sequenzen waren mRNAs proteinkodierender Gene (Abbildung 2-4 A). Die verbliebenen ca. 8% teilten sich auf in *long-(intergenic)-noncoding-RNAs* (linc/lncRNAs, 2,59%), Pseudogene (1,59%) oder *antisense-RNAs* (asRNAs, 1,46%) oder wurden keiner spezifischen Klasse nicht-kodierender RNAs (ncRNAs) zugeordnet (2,45%).

Zur Visualisierung der unterschiedlichen Regulationen in Abhängigkeit von der Behandlung wurden die exprimierten Sequenzen in einer Hauptkomponentenanalyse (*Principle Component Analysis*, PCA) im Vergleich zu unbehandelten Zellen gegenübergestellt (Abbildung 2-4 B).

Dabei wurde jedem gemittelten Datensatz eine Kugel, basierend auf einer polychromen Differenzierung gemäß der Behandlung, zugeteilt. Die Anordnung der Kugeln im dreidimensionalen Raum mittels PCA zeigte eine Aufteilung gemäß der Behandlungen und der Zeitpunkte. Die Daten der 9 h Behandlungen bildeten eine von den 16 h Zeitpunkten abgetrennte Gruppe, welche unabhängig von der Behandlung ist. Weiterhin sind die Daten der *S. pneumoniae*-infizierten BEAS-2B Zellen zum 16 h Zeitpunkt von den Daten der LP-stimulierten Zellen (16 h) getrennt. Somit konnte durch die PCA zwischen drei Gruppen, die 9 h behandelten Zellen, die 16 h LP-stimulierten Zellen und den 16 h *S. pneumoniae*-infizierten Zellen, unterschieden werden.

Die signifikant ($p \leq 0,05$) und differentiell (x -fache relative Expressionsänderung $\leq 0,8$ oder $\geq 1,2$) regulierten mRNAs proteinkodierender Gene wurden anschließend in Venn-Diagrammen getrennt nach den Zeitpunkten gegenübergestellt (Abbildung 2-4 C). Somit wurden sowohl allgemein TLR2-abhängig (LP und *S. pneumoniae*) regulierte Gene als auch LP- oder pneumokokkenspezifisch regulierte Gene erfasst. Nach 9 h waren insgesamt 2.055 Gene differentiell reguliert. Von diesen waren 653 Gene (32%) LP-spezifisch reguliert. Weitere 949 Gene (46%) zeigten eine differentielle Regulation nach LP- als auch nach *S. pneumoniae*-Behandlung. Die Gene, welche pneumokokkenspezifisch reguliert waren, stellten 9 h nach Infektion die kleinste Gruppe mit 453 Genen (22%) dar. Zum 16 h Zeitpunkt wurden insgesamt 5.295 proteinkodierende Gene reguliert. Der LP-spezifische Anteil war mit 442 Genen (8%) am geringsten. Die nach LP- als auch nach *S. pneumoniae*-Exposition regulierten Gene machten etwa ein Drittel (30%, 1.595 Gene) der Gesamtanzahl aus. Demnach war der Anteil pneumokokkenspezifisch regulierter proteinkodierender Gene 16 h nach Infektion deutlich erhöht. Hier wurden 3.258 Gene als differentiell reguliert detektiert. Dies stellte einen Anteil von 62% dar.

Folglich wurde anhand der PCA eine deutliche Strukturierung der unterschiedlichen Datensätze erreicht. Weiterhin wurde beobachtet, dass nach 9 h Behandlung der größte Anteil an mRNAs TLR2-abhängig durch LP und *S. pneumoniae* und nach 16 h überwiegend pneumokokkenspezifische mRNAs differentiell reguliert waren. Dieser Unterschied wurde daraufhin in Analysen der angereicherten Signalwege (*pathway enrichment analysis*, PEA) mittels der Datenbank *consensuspath* (www.consensuspathdb.org, Version 32) untersucht (Kamburov *et al.* 2013). Es wurden die Datenbanken KEGG, wikipathways und Reactome mit einbezogen. Dafür wurden die nach LP- und *S. pneumoniae*-Behandlung differentiell regulierten mRNAs als unspezifische, TLR2-abhängig regulierte Gruppe zusammengefasst (LP/Sp) und so von den *S. pneumoniae*-spezifischen Regulationen (Sp) unterschieden. Die

Tabelle 2-1 listet jeweils die ersten 10 adressierten Signalwege basierend auf den höchsten Signifikanzen auf.

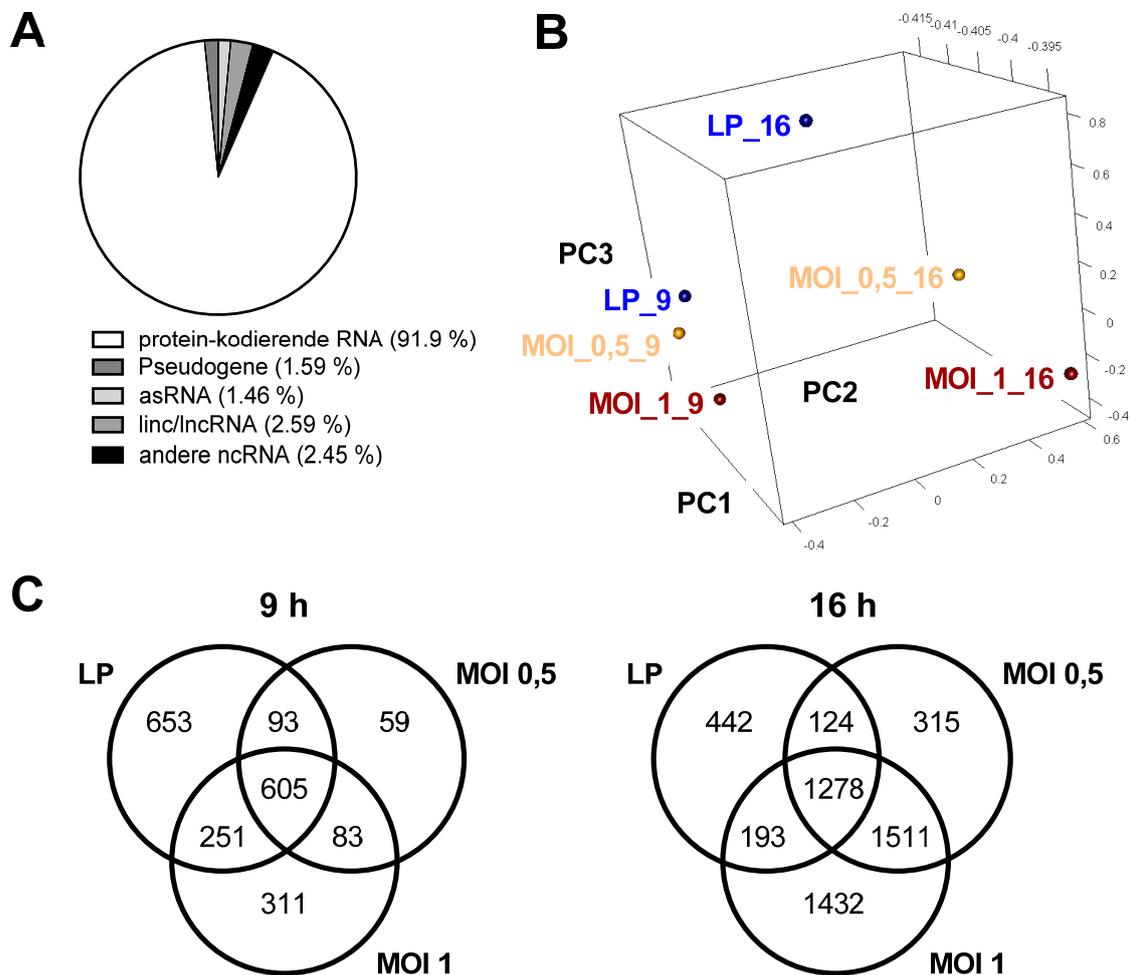


Abbildung 2-4: Biotypen, Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Venn-Diagramme der *Microarray*-Analyse von BEAS-2B Zellen nach LP-Stimulation oder *S. pneumoniae*-Infektion. Die BEAS-2B Zellen wurden für 9 h und 16 h mit LP (1 μ g/ml) behandelt oder mit *S. pneumoniae* (MOI 0,5 oder 1) infiziert. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Transkriptomanalyse erfolgte mittels *Microarray*. **A)** Tortendiagramm der 9.993 exprimierten Sequenzen in BEAS-2B Zellen aufgeteilt nach Biotypen (asRNA = Antisense-RNA, linc/lnc = lange (intergenische) nicht-kodierende RNA; ncRNA = nicht-kodierende RNA). **B)** PCA der 9.993 exprimierten Sequenzen. Die PCA-Kartierung betrug 96,4%. Jede Kugel repräsentiert eine Behandlung zu einem Zeitpunkt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (LP = blau, *S. pneumoniae* MOI 0,5 = gelb, *S. pneumoniae* MOI 1 = rot). **C)** Die Venn-Diagramme der signifikant regulierten mRNAs in BEAS-2B Zellen aufgeteilt nach den Zeitpunkten 9 h (links) und 16 h (rechts). Es wurden die durchschnittlichen Expressionen der Sequenzen gegenüber der unbehandelten Kontrolle analysiert. Dargestellt sind signifikant ($p \leq 0,05$) und differentiell ($FC \leq 0,8$ oder $\geq 1,2$) regulierten mRNAs. LP = Lipoprotein. n = 3.

Tabelle 2-1: Adressierte Signalwege der Transkriptom-Analyse mit Signifikanzen (q-Werten), geordnet nach Signifikanzniveau bei 16 h *S. pneumoniae*-Infektion (Sp 16 h)

Signalweg	Datenbank	LP/Sp 9 h	Sp 9 h	LP/Sp 16 h	Sp 16 h
Zellzyklus	Reactome	-	-	0,0005	1,93E-34
Zellzyklus, mitotisch	Reactome	-	-	0,063 ¹	9,92E-32
Genexpression	Reactome	-	-	-	9,24E-18
M Phase	Reactome	-	-	-	4,59E-16
Zelluläre Antwort auf Stress	Reactome	-	-	-	8,97E-15
Mitotische Prometaphase	Reactome	-	-	0,007 ¹	2,29E-13
Mitotische Metaphase und Anaphase	Reactome	-	-	0,04 ¹	2,29E-13
Mitotische Anaphase	Reactome	-	-	0,04 ¹	4,77E-13
Trennung der Schwester Chromatiden	Reactome	-	-	0,03 ¹	1,20E-12
Auflösung der Schwester Chromatiden Kohäsion	Reactome	-	-	0,003 ¹	1,20E-12
Apoptose Regulierung und Signalisierung	Wikipathways	6,1E-06 ¹	7,89E-06	4,69E-05	5,53E-07 ¹
TNF Signalweg	KEGG	1,68E-13	3,41E-10	6,16E-08	5,48E-06 ¹
Oncostatin M Signalweg	Wikipathways	1,52E-10	3,41E-10	3,34E-05	4,75E-05 ¹
Glucocorticoide Rezeptor Signalweg	Wikipathways	4,9E-06	7,8E-05	1,42E-05	0,0004 ¹
Photodynamische Therapie-induzierter NF-κB Überleben Signalweg	Wikipathways	7,95E-10	1,39E-08	3,45E-07	0,001 ¹
Photodynamische Therapie-induzierter HIF-1 Überleben Signalweg	Wikipathways	1,20E-06	1,46E-06	0,0002 ¹	0,002 ¹
HIF-1 Signalweg	KEGG	7,55E-09	1,01E-07	1,57E-05	0,005 ¹
Hepatitis B	KEGG	-	9,53E-06	0,008 ¹	0,013 ¹
Vitamin B12 Metabolismus	Wikipathways	1,73E-06	2,01E-05 ¹	0,0005 ¹	0,015 ¹
AGE-RAGE Signalweg in diabetischen Komplikationen	KEGG	1,23E-07	1,24E-06	3,26E-05	0,019 ¹
kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)	KEGG	0,0004 ¹	0,0007 ¹	4,69E-05	0,043 ¹
Signalwege in Krebserkrankungen	KEGG	6,1E-06 ¹	0,0004 ¹	9,80E-06	0,043 ¹
Thymus stromal Lymphopietin (TSLP) Signalweg	Wikipathways	1,01E-07	1,61E-06	0,007 ¹	-
Organisation der extrazellulären Matrix	Reactome	1,17E-06	8,4E-05 ¹	4,81E-05 ¹	-
Rheumatoide Arthritis	KEGG	1,37E-06	1,6E-05 ¹	0,0005 ¹	-

Amöbiasis	KEGG	4,8E-06 ¹	1,8E-05 ¹	1,57E-05	-
Pertussis	KEGG	-	6,17E-06	0,003 ¹	-

¹ q-Werte der Signalwege, welche nicht zu den jeweiligen ersten 10 adressierten Signalwegen gehören

Die Analyse zeigte auf, dass viele TLR2-abhängig adressierte Signalwege (LP/Sp) zu beiden Zeitpunkten hohe Signifikanzen aufwiesen. Diese Signalwege wurde nur zum frühen 9 h Zeitpunkt der *S. pneumoniae*-Infektion signifikant adressiert, nach 16 h jedoch nicht mehr gelistet oder nur mit schwachem Signifikanzniveau. Interessanterweise sind zum späten Infektionszeitpunkt Zellzyklus, Genexpression und Stressantwort die höchst-gelisteten Signalwege, welche *S. pneumoniae*-spezifisch gelistet werden.

Zur Bestätigung der Transkriptomdaten wurden die Expressionen von IL-6, SOD2 und CXCL2 mittels qPCR analysiert. Die Expression von IL-6 wurde nach 9 h LP-Behandlung um das 125-fache signifikant induziert (Abbildung 2-5 A). Diese Induktion fiel zum 16 h Zeitpunkt auf 45-fach ab. Nach Infektion mit *S. pneumoniae* betrug die Expression nach 9 h etwa 70 bis 80-fach gegenüber der Kontrolle. Auch 16 h nach Infektion wurde eine erhöhte IL-6-Expression von bis zu 65-fach nachgewiesen. SOD2 wurde ebenfalls in allen Bedingungen gegenüber der Kontrolle induziert (Abbildung 2-5 B). Zum 9 h Zeitpunkt wurde nach LP-Stimulation eine signifikante, 30-fache Erhöhung der Expression gemessen. Diese Expression fiel nach 16 h Behandlung auf das etwa 20-fache ab. Nach den *S. pneumoniae*-Infektionen wurde zum 9 h Zeitwert eine signifikante, etwa 16-fach erhöhte Expression gemessen, welche zum 16 h Zeitpunkt auf über 20-fach anstieg. Die Expression von CXCL2 wurde nach Stimulation mit LP signifikant um das 27-fache nach 9 h und das 19-fache nach 16 h erhöht (Abbildung 2-5 C). In den 9 h *S. pneumoniae*-Infektionen wurden 20-fache Expressionserhöhungen gegenüber der Kontrolle verzeichnet. Diese sanken zum 16 h Zeitwert beide auf 15-fach (MOI 0,5) bzw. 18-fach (MOI 1) ab.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Analyse des Transkriptoms von BEAS-2B Zellen spezifische Regulationen nach *S. pneumoniae*-Infektion zum 16 h Zeitpunkt aufzeigt. Die Expressionen von proinflammatorischen Genen wie IL-6 oder CXCL2 wiesen in allen Bedingungen erhöhte, oftmals signifikante Expressionen auf, welche jedoch nach LP-Behandlung häufig deutlich stärker ausfiel.

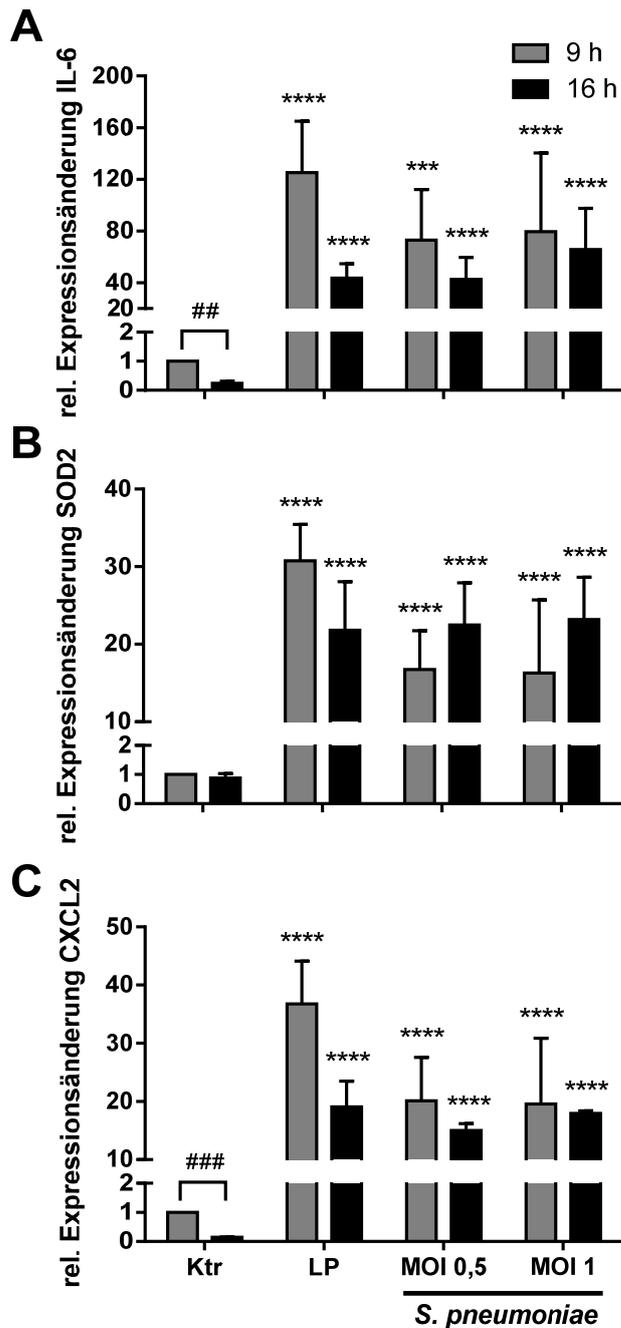


Abbildung 2-5: Balkendiagramme signifikant regulierter mRNAs in BEAS-2B Zellen nach LP-Behandlung oder *S. pneumoniae*-Infektion. BEAS-2B Zellen wurden für 9 h oder 16 h mit LP (1 µg/ml) behandelt oder mit *S. pneumoniae* infiziert (MOI 0,5 oder 1). Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Expressionen von **A**) IL-6, **B**) SOD2 und **C**) CXCL2 wurden durch qPCR ermittelt und gegen RPS18 und die 9 h Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. n=3. ##p<0,01; ***/#p<0,001; ****p<0,0001 (2way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test). * Signifikanz zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. # Signifikanz über die Zeit innerhalb einer Behandlung.

2.3.2 Untersuchung des Proteoms von BEAS-2B Zellen nach

S. pneumoniae-Infektion

Die Untersuchung des Proteoms der BEAS-2B Zellen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Völker (Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald) mittels SILAC Analyse und nanoLC-MS/MS (Surmann *et al.* 2015). Dafür wurden die Zellen mit *S. pneumoniae* und einer MOI 0,5 infiziert. Eine Stimulation mit LP erfolgte in diesem

Experimentaufbau nicht. Durch die unter 4.3.2.1 beschriebenen Bedingungen wurden 2.315 Proteine in mindestens zwei der drei biologischen Replikate in BEAS-2B Zellen identifiziert. Zum Filtern der Daten wurde das Signifikanzniveau ($\leq 0,05$) sowie die Stärke der Expressionsänderung ($\leq/\geq 1,5$ -fach) verwendet. Mit diesen Kriterien verblieben 38 Proteine, welche zum Zeitpunkt 9 h oder 16 h nach Infektion oder in beiden Zeitpunkten differentiell reguliert wurden (Abbildung 2-6).

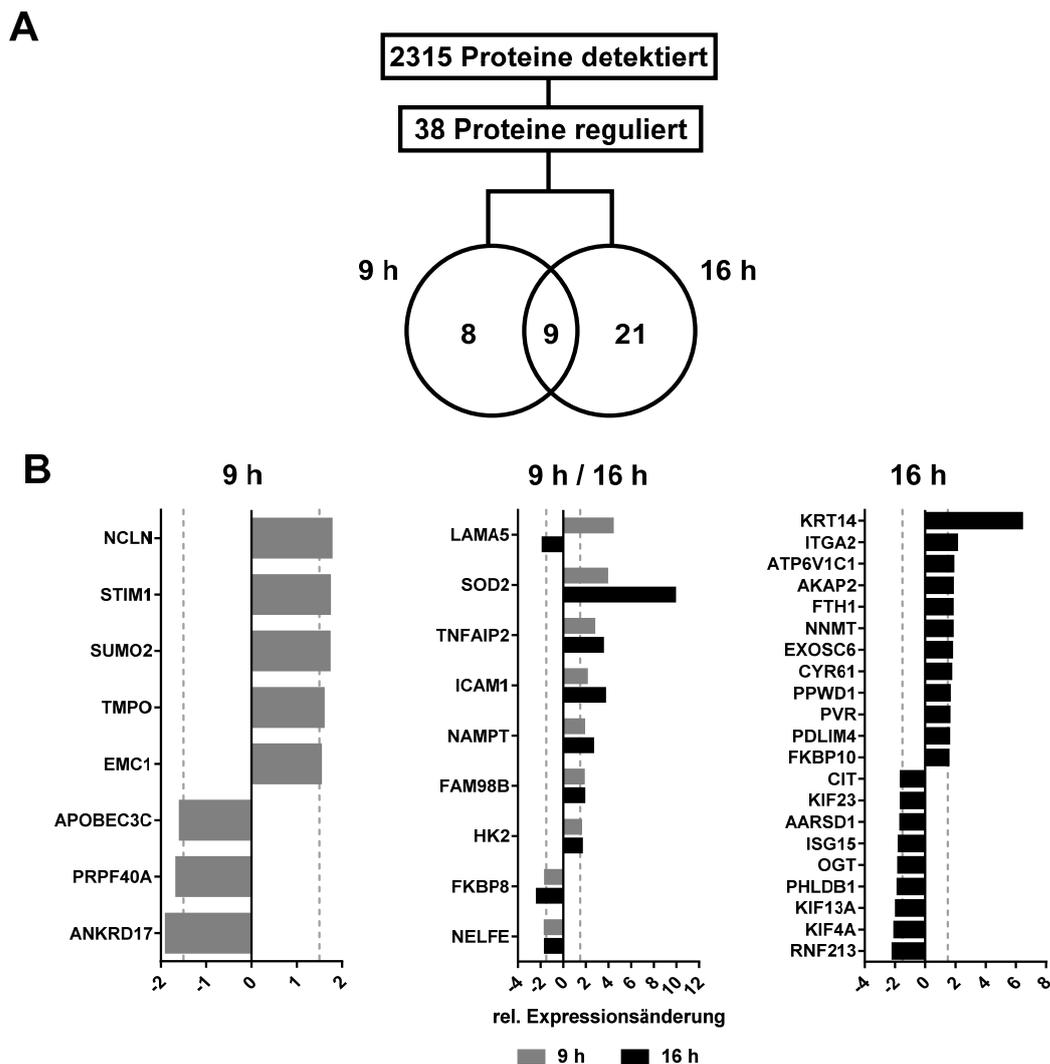


Abbildung 2-6: Proteomanalyse von *S. pneumoniae*-infizierten BEAS-2B Zellen. BEAS-2B Zellen wurden für 9 h und 16 h mit *S. pneumoniae* (MOI 0,5) infiziert oder blieben unbehandelt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels SILAC und nanoLC-MS/MS (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Völker). **A)** Zusammenfassung der nachweisbaren Proteine sowie die Filterung nach der Signifikanz ($p \leq 0,05$) und der Änderung der Expressionsstärke ($\leq/\geq 1,5$). Die 38 am stärksten regulierten Proteine sind im Venn-Diagramm gemäß des Zeitpunktes der Regulation gegenübergestellt. **B)** Wasserfalldiagramme der signifikant regulierten Proteine aufgeteilt nach dem Zeitpunkt ihrer Regulation. Graue Balken geben den 9 h Zeitpunkt an, schwarze Balken den 16 h Zeitpunkt. Dargestellt sind die linearen Expressionsänderungen. Referenzlinien geben die 1,5-fache Änderung der Expression an. $n = 3$.

Diese 38 signifikant regulierten Proteine wurden für eine Analyse angereicherter Signalwege (PEA) verwendet. Diese wurde, wie bereits unter 2.3.1 beschrieben, unter Verwendung der Datenbanken Reactome, KEGG, INOH, PID, SMPDB und wikipathways durchgeführt. Die Tabelle 2-2 gibt die angereicherten Signalwege mit den höchsten Signifikanzen zusammen mit den regulierten Proteinen an.

Tabelle 2-2: Darstellung der angereicherten Signalwege der Proteom-Analyse, basierend auf den 38 signifikant regulierten Proteinen

Signalweg	Datenbank	Regulierte Proteine des Signalweges	q-Wert
Nicotinamide Wiederverwertung	Reactome	NNMT; NAMPT	0.01635
Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus	SMPDB	NNMT; NAMPT	0.01635
Glukokortikoid Rezeptor regulatorisches Netzwerk	PID	SUMO2; KRT14; ICAM1	0.01635
MET aktiviert PTK2 Signalweg	Reactome	ITGA2; LAMA5	0.01635
Nicotinat Metabolismus	Reactome	NNMT; NAMPT	0.01635
Nicotinat Nicotinamid Metabolismus	INOH	NNMT; NAMPT	0.01635
Humanes Komplementsystem	Wikipathways	ITGA2; LAMA5; ICAM1	0.01635
Laminin Interaktionen	Reactome	ITGA2; LAMA5	0.01635
MET reguliert Zellmotilität	Reactome	ITGA2; LAMA5	0.01711
Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus	KEGG	NNMT; NAMPT	0.01711
Beta2 Integrin Zelloberflächen Interaktionen	PID	CYR61; ICAM1	0.01711
Type II Interferon Signalweg (IFNG)	Wikipathways	ISG15; ICAM1	0.02375
Beta3 Integrin Zelloberflächen Interaktionen	PID	PVR; CYR61	0.02502
Kinesine	Reactome	KIF4A; KIF23	0.02502
Eisenaufnahme und Transport	Reactome	ATP6V1C1; FTH1	0.02502
Interleukin-11 Signalweg	Wikipathways	ITGA2; ICAM1	0.02502
Nicht-Integrin Membran-EZM Interaktionen	Reactome	ITGA2; LAMA5	0.02530
RhoA Signalweg	PID	CYR61; CIT	0.02530
miRNA-Zielgene in Lymphozyten (TarBase)	Wikipathways	ITGA2; CYR61; ATP6V1C1; PRPF40A; TNFAIP2	0.02669
Vitamin B12 Metabolismus	Wikipathways	SOD2; ICAM1	0.02669
ECM Proteoglykane	Reactome	ITGA2; LAMA5	0.03046

Das Protein NAMPT, welches ein zentrales Enzym des Nicotinamidstoffwechselweges und bereits als in Erkrankungen reguliert bekannt ist (Garten *et al.* 2009), wurde in der Proteomanalyse signifikant durch die *S. pneumoniae*-Infektion zu beiden Zeitpunkten induziert.

Im Folgenden wurden daher BEAS-2B Zellen erneut mit *S. pneumoniae* (MOI 0,5 und 1) infiziert oder als Kontrolle mit LP stimuliert, um die Induktion von NAMPT mittels Western Blot Analyse zu bestätigen.

In den behandelten Proben wurde, im Vergleich zur Kontrolle, eine gesteigerte Expression des Proteins NAMPT im Western Blot detektiert, welche mit der Proteomanalyse übereinstimmt. Die Expression von NAMPT wurde sowohl durch die Infektion als auch durch die LP-Stimulation erhöht, während die Expression der endogenen Kontrolle Aktin unverändert blieb (Abbildung 2-7 A). Die Quantifizierung der Banden zeigte nach LP-Behandlung der Zellen eine 50% bis 70%ige Steigerung der NAMPT Proteinmenge über die Zeit des Experimentes von 9 h auf 16 h (Abbildung 2-7 B). Nach Infektion mit *S. pneumoniae* wurde eine Expressionssteigerung nach 9 h Infektion um 20% detektiert. Diese erhöhte sich auf eine fast 50%ige Steigerung bei MOI 0,5 deutlich zum 16 h Zeitpunkt, während bei den Zellen, welche mit MOI 1 infiziert waren, sogar eine signifikante Steigerung auf 200% gemessen wurde.

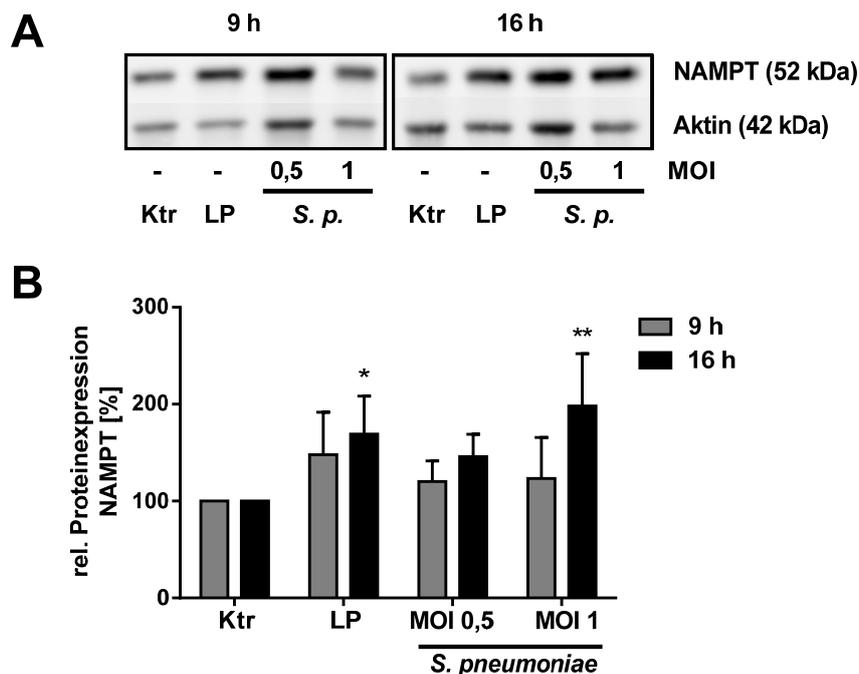


Abbildung 2-7: Validierung der Proteomanalyse am Beispiel von NAMPT. BEAS-2B Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit *S. pneumoniae* (*S. p.*) mit den MOIs 0,5 oder 1 infiziert oder als Positivkontrolle mit LP stimuliert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. **A)** Repräsentative Darstellung der Expression von NAMPT in der Western Blot Analyse. Von jeder Probe wurden 25 µg unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Als Kontrolle diente der Nachweis des Proteins Aktin. Größe in kDa wurde anhand des Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder zugewiesen. **B)** Balkendiagramm zur Quantifizierung des NAMPT Proteins mittels Software Lab Image 1D aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Angegeben ist das prozentuale, relative Expressionslevel von NAMPT, normalisiert auf Aktin und auf die unbehandelten Zellen (Ktr). Dargestellt sind Mittelwerte

mit Standardabweichungen. n = 3. *p≤0,05; **p≤0,01 (2way ANOVA mit Sidak's *multiple comparison test*).

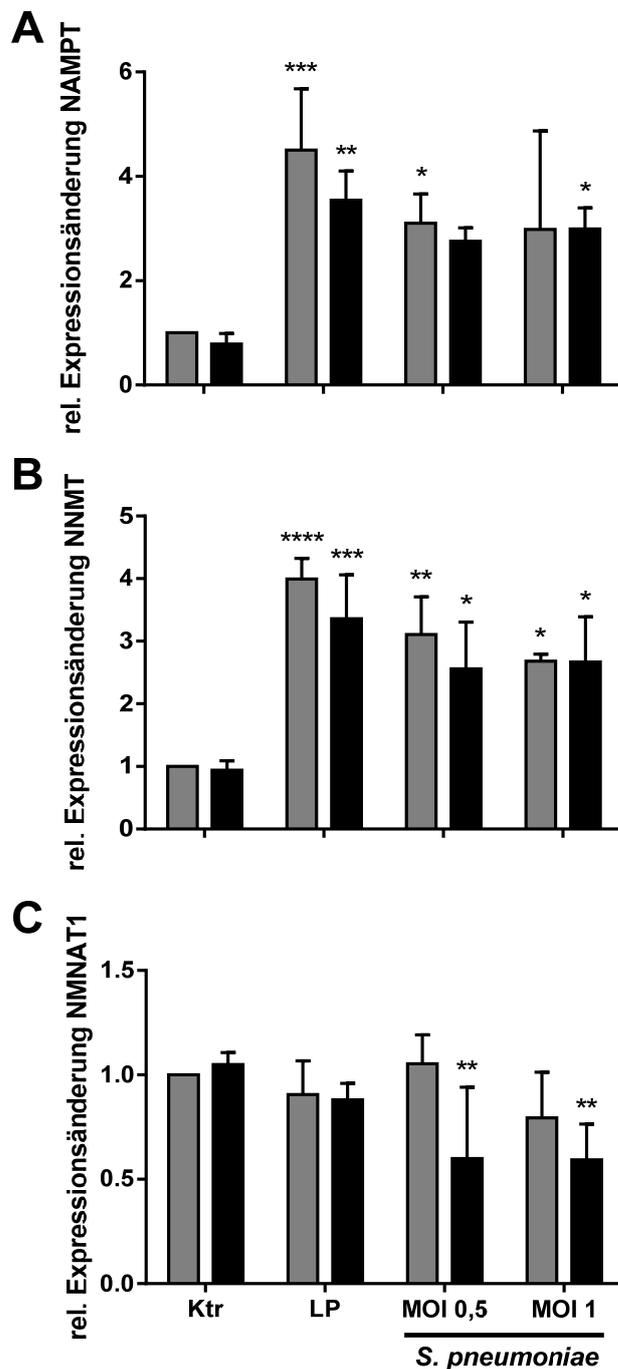


Abbildung 2-8: Balkendiagramme signifikant regulierter mRNAs in BEAS-2B Zellen nach LP-Behandlung oder S. pneumoniae-Infektion. BEAS-2B Zellen wurden für 9 h oder 16 h mit LP (1 µg/ml) behandelt oder mit S. pneumoniae infiziert (MOI 0,5 oder 1). Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Expressionen von **A**) NAMPT, **B**) NNMT und **C**) NMNAT1 wurden durch qPCR ermittelt und gegen RPS18 und die 9 h Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. n=3-6. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001 (2way ANOVA mit Sidak's *multiple comparison test*).

Da in den *Microarray* Analysen ebenfalls Gene des Nicotinamidstoffwechselweges, wie NAMPT (FC=3,76 nach 16 h Infektion) oder NNMT (FC=2,51 nach 16 h Infektion) signifikant erhöhte Expressionen aufwiesen, wurden diese zur Verbindung der Proteomdaten mit den Transkriptomdaten mittels qPCR analysiert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Expression von NMNAT1 (FC=0,49 nach 16 h Infektion), welches signifikant nach S. pneumoniae-Infektion

reduziert war, da dieses Enzym ebenso eine wichtige Rolle in diesem Stoffwechselweg wie NAMPT und NNMT besitzt.

In der qPCR wurde die Expression von NAMPT nach LP-Stimulation signifikant um das etwa 4-fache induziert (Abbildung 2-8 A). Die Infektionen mit *S. pneumoniae* ergaben ebenfalls erhöhte, teils signifikante Expressionen um das 3-fache gegenüber der Kontrolle. Die Expressionsrate von NNMT wurde durch die LP-Stimulation signifikant um das 3,5- bis 4-fache erhöht (Abbildung 2-8 B). Auch die Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu signifikanten Induktionen der NNMT mRNA um das 2,5- bis 3-fache gegenüber der Kontrolle. Die Expression von NMNAT1 zeigte nach LP Behandlung nur geringe, nicht signifikante Reduktionen (Abbildung 2-8 C). Nach Infektion mit *S. pneumoniae* wurde nach 9 h eine geringe Reduktion ermittelt. Zum 16 h Zeitpunkt zeigten die NMNAT1-Expressionswerte signifikante Reduktionen auf das 0,6-fache.

Somit wurden Regulationen von NAMPT auf Protein- und mRNA-Ebene als auch von den NNMT und NMNAT1 mRNAs bestätigt. Interessanterweise zeigte nur NMNAT1 eine *S. pneumoniae*-spezifische Regulation. Damit scheint der NAD-Stoffwechselweg wichtig bei der Pneumokokken-Infektion von Bronchialepithelzellen zu sein.

2.3.3 Untersuchung des miRNA-Profiles von BEAS-2B Zellen nach

***S. pneumoniae*-Infektion**

Um ein Netzwerk für posttranskriptionelle Regulation von mRNAs der Transkriptomanalyse durch miRNAs zu erstellen, wurde das unter 2.3.1 beschriebene experimentelle Setup für die Sequenzierung der miRNAs verwendet. Weiterhin sollten im Rahmen der infektionsbedingten Expressionsprofil-Analyse mögliche pneumokokkenspezifische miRNAs detektiert werden.

In der Sequenzierung wurden 1.438 exprimierte miRNAs in den BEAS-2B Zellen unabhängig ihrer Behandlung detektiert. Von diesen wurden 99 miRNAs mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ als signifikant regulierte miRNAs im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle klassifiziert. Eine vollständige Liste dieser miRNAs mit Angaben zur relativen Expressionsänderung und der Signifikanz ist auf der Daten-CD dieser Arbeit zu finden. Diese 99 miRNAs wurden daraufhin mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA, beschrieben unter 4.3.2.4) verglichen (Abbildung 2-9 A), wodurch Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Behandlungen anhand der miRNA Expressionen visualisiert wurden. So akkumulierten die Daten der LP-behandelten Zellen aus beiden Zeitpunkten in Distanz zu den Daten der *S. pneumoniae*-

infizierten Zellen. Die miRNA Daten der Pneumokokken-infizierten BEAS-2B Zellen zeigten eine räumliche Ansammlung abhängig von den Zeitpunkten 9 h oder 16 h nach Infektion. Das Muster, welches die Kugeln in dem dreidimensionalen Raum der PCA erzeugten, zeigte folglich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen auf. Es bildeten sich drei Gruppen bedingt durch die Behandlung oder die Zeitpunkte.

Als nächstes sollten die in der PCA deutlich gewordenen Unterschiede mittels einer sogenannten *heatmap* näher betrachtet werden. In dieser analytischen Darstellungsform werden die normalisierten Sequenzanzahlen farblich differenziert abgebildet, sodass die Disparitäten der einzelnen miRNAs nach unterschiedlichen Behandlungen sichtbar werden. Die *heatmaps* wurden mit dem internetbasierten Tool ClustVis erstellt (Metsalu & Vilo, 2015; verwendete Einstellungen siehe 4.3.2.5). Schließlich wurden spezifische Cluster durch die *heatmaps* deutlich, welche auf bestimmte Behandlungen zurückzuführen sind. Daraufhin wurden *heatmaps* gemäß der spezifischen, stärkeren Veränderung der Sequenzanzahlen erstellt (Abbildung 2-9 B-D). Die Gruppe der TLR2-abhängig (LP und *S. pneumoniae*) regulierten miRNAs umfasst 50 miRNAs, welche nach Behandlung oder in den Kontrollzellen verändert vorlagen. Die spezifisch nach LP-Behandlung regulierten miRNAs bildeten eine Gruppe aus 16 miRNAs, wovon die meisten zum 9 h Zeitpunkt vermehrt dereguliert waren. Die Gruppe der *S. pneumoniae*-spezifischen miRNAs umfasst 25 Kandidaten, welche alle zum 16 h Zeitpunkt stark verändert in den BEAS-2B Zellen exprimiert wurden.

Aus diesen Gruppen regulierter miRNAs wurden jeweils zwei ausgewählt, deren Expressionsmuster mittels qPCR bestätigt wurden. Die TLR2-abhängig regulierte miRNA-92a-1 zeigte in den Kontrollzellen zum 16 h Zeitpunkt eine 0,6-fache Reduktion der Transkriptmenge im Vergleich zum 9 h Zeitpunkt (Abbildung 2-10 A). Die Stimulation mit LP führte zu 1,2- bis 1,4-fachen Erhöhungen. Durch die *S. pneumoniae*-Infektionen wurde die Expression der miRNA-92a-1 nach 9 h auf das 1,5-fache erhöht, während nach 16 h eine Reduzierung auf bis zu 0,8-fach detektiert wurde. In der qPCR wurde die miRNA-21 zum späteren Zeitpunkt in den unbehandelten Kontrollzellen nur gering reduziert. Die Stimulation mit LP führte zu beiden Zeitpunkten zu einer 2-fachen Induktion der miRNA. Ebenfalls wurde eine 2-fache Erhöhung der Expression 9 h nach *S. pneumoniae*-Infektion gemessen, welche zum 16 h Zeitpunkt auf das 1,2- bis 1,6-fache abfiel. Beide Expressionsmuster entsprachen weitgehend den *heatmap* Daten mit vermehrten, behandlungsunabhängigen Transkriptmengen zum 9 h Zeitpunkt.

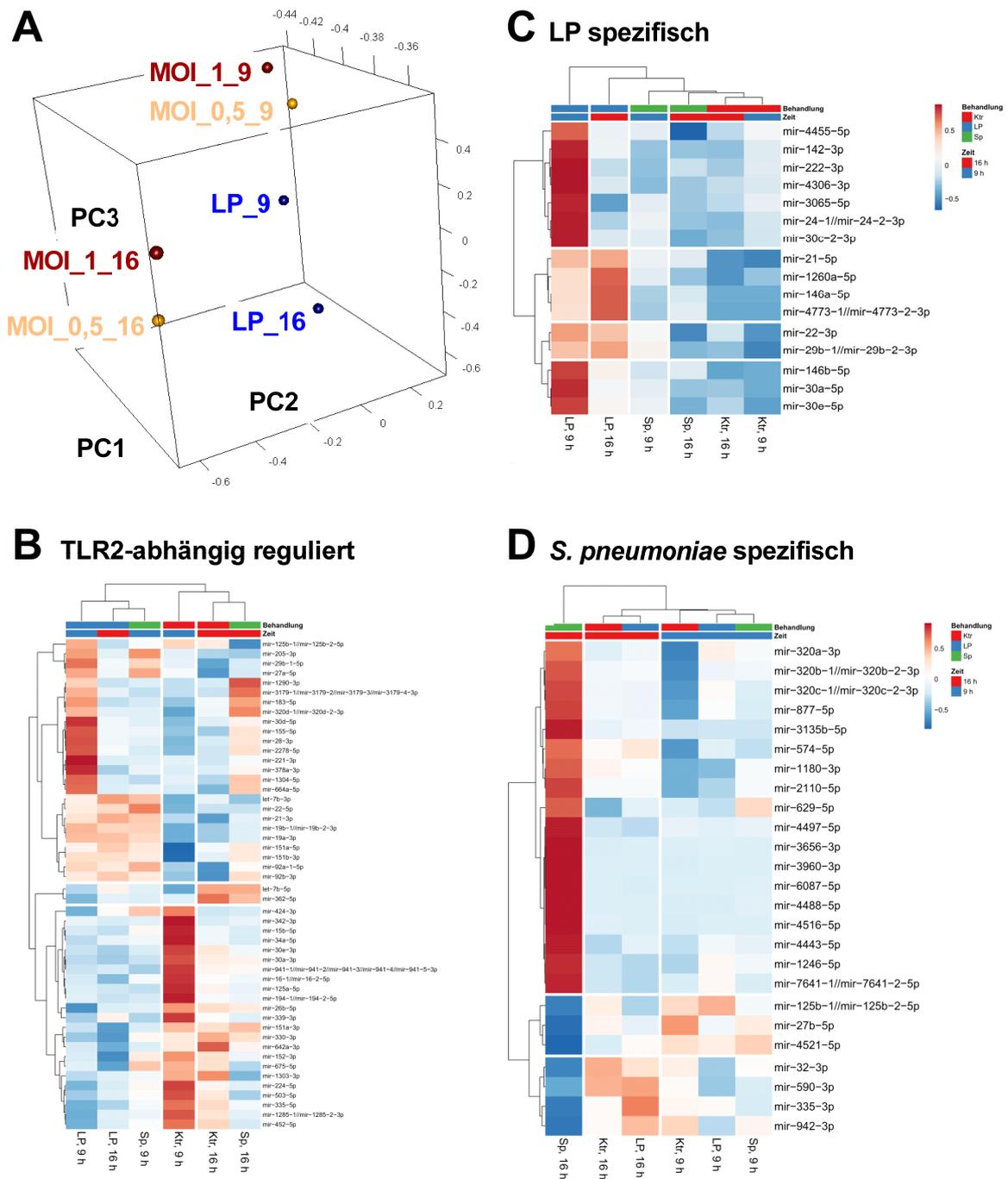


Abbildung 2-9: Hauptkomponentenanalyse (PCA) und heatmaps signifikant regulierter miRNAs von BEAS-2B Zellen nach LP- oder *S. pneumoniae*-Behandlung. Die BEAS-2B Zellen wurden für 9 h oder 16 h mit LP (1 µg/ml) stimuliert oder mit *S. pneumoniae* infiziert (MOI 0,5 oder 1). Kontrollzellen blieben unbehandelt. **A)** Die PCA-Kartierung betrug 94,4% unter Verwendung aller 99 signifikant regulierter miRNAs. Jede Kugel repräsentiert eine Behandlung zu einem Zeitpunkt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (LP = blau, *S. pneumoniae* MOI 0,5 = gelb, *S. pneumoniae* MOI 1 = rot). Zur Darstellung wurden die Mittelwerte der normalisierten Sequenzanzahlen (*normalized counts*) verwendet. **B-D)** Heatmaps der mittleren Sequenzanzahlen von den 91 signifikant regulierten miRNAs in BEAS-2B Zellen, welche einem Muster zugeordnet wurden. Heatmaps unterteilt in **B)** TLR2-abhängig **C)** LP-spezifisch und **D)** *S. pneumoniae*-spezifisch regulierte miRNAs gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Es wurde das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt. $n = 3$.

Für die miRNA-146a aus der LP-spezifischen Gruppe wurde eine stabile Expression in den unbehandelten Kontrolle über die Zeit festgestellt (Abbildung 2-10 B). Nach der Behandlung mit LP wurde eine über 100-fache, signifikant erhöhte Expression in beiden Zeitpunkten nachgewiesen. Diese Erhöhung der Transkriptmenge war durch die *heatmap* Analyse erwartet. Weiterhin führte die Infektion mit *S. pneumoniae* zu signifikant erhöhten Expressionen, welche zirka 30-fach nach 9 h und bis zu 50-fach nach 16 h waren. Die Expression der miRNA-4455 sank zum 16 h Zeitpunkt auf etwa 0,8-fach ab. Die Behandlung mit LP führte nach 9 h zu einer 1,4-fachen Erhöhung, welche zum späteren Zeitpunkt nicht mehr messbar war. Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte bei der MOI 0,5 zu einer gering erhöhten Expression der miRNA-4455 nach 9 h. Zum Zeitpunkt 16 h nach Infektion wurde in beiden MOIs eine deutliche, aber nicht signifikante Reduktion der Expression auf das 0,5-fache detektiert.

Aus der Gruppe der pneumokokkenspezifisch regulierten miRNAs wurden die miRNA-3135b und die miRNA-4521 analysiert. Die Expression der miRNA-3135b war sowohl in den Kontrollen als auch nach LP-Stimulation in beiden Zeitwerten unverändert (Abbildung 2-10 C). Ferner wurden kaum Regulationen nach 9 h Infektion mit *S. pneumoniae* festgestellt. Zum Zeitpunkt 16 h nach Infektion wurde eine signifikante 6-fache Erhöhung der Expression dieser miRNA detektiert, welche bereits in der *heatmap* deutlich wurde. Die Expression der miRNA-4521 wurde in der unbehandelten Kontrolle zum 16 h Zeitpunkt auf das 0,6-fache reduziert. Nach der Behandlung mit LP wurden geringe Änderungen der Expression sichtbar. Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte 9 h nach Infektion zu gering erhöhten Expressionen, welche zum späteren Zeitpunkt allerdings deutlich auf unter das 0,4-fache reduziert wurde. Diese Expressionsmuster bestätigten die Analysen aus der *heatmap*.

Die Verknüpfung der miRNA Daten mit den *Microarray* Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Xin Lai aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Julio Vera (*Laboratory of Systems Tumor Immunology*, Bioinformatik am Universitätsklinikum Erlangen). Für diese Analyse wurden experimentell bestätigte miRNA-mRNA Interaktionen der Datenbank miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>, Version 6.0) genutzt und auf die Datensätze dieser Arbeit angewendet. Dabei wurden nur signifikant regulierte miRNAs und mRNAs in die Analyse mit einbezogen. Die Untersuchung zeigte nur wenige Interaktionen zwischen miRNAs und antagonistisch regulierten mRNAs, welche in über 85% der Fälle auf Hochdurchsatzdaten wie *Microarray* oder Quervernetzung und Immunpräzipitation mit photoaktivierbaren Ribonukleotiden (PAR-CLIP) beruhten. Weiterhin wurden lediglich für 38 miRNAs dieser Arbeit mindestens eine entsprechend regulierte mRNAs verteilt über die verschiedenen Infektionsbedingungen in dieser Analyse gefunden.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass es signifikante, behandlungsabhängig regulierte miRNAs gab, die mittels qPCR bestätigt wurden. Die Analyse der miRNA-mRNA-Interaktion lieferte für diese Arbeit nur wenige, bereits bekannte Verknüpfungen und wurde somit nicht weiter verfolgt. Daraufhin wurde die *S. pneumoniae*-spezifisch, spät induzierte miRNA-3135b mittels Überexpression in BEAS-2B Zellen näher untersucht.

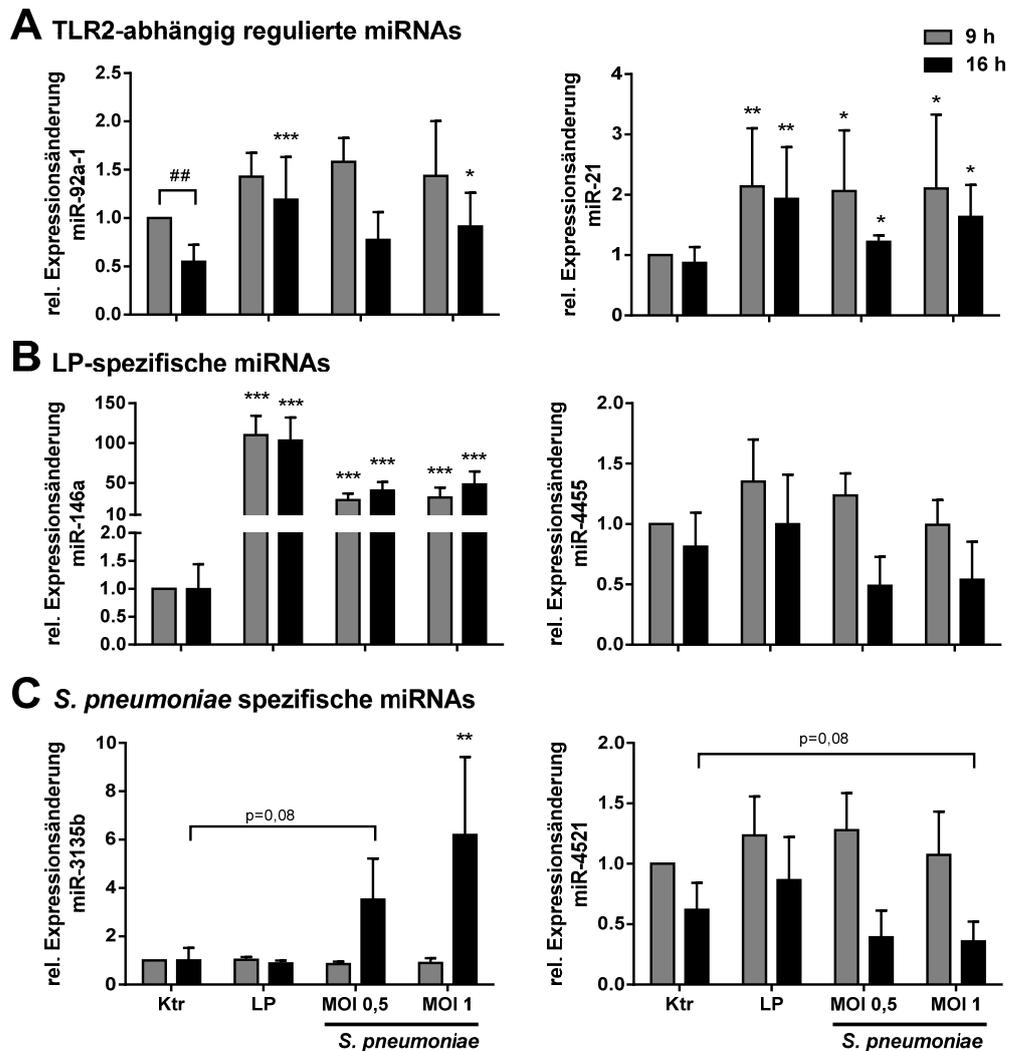


Abbildung 2-10: Balkendiagramme zum Nachweis spezifisch regulierter miRNAs in BEAS-2B Zellen nach LP-Behandlung oder *S. pneumoniae*-Infektion. Die BEAS-2B Zellen wurden für 9 h oder 16 h mit LP (1 μ g/ml) behandelt oder mit *S. pneumoniae* infiziert (MOI 0,5 oder 1). Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Expressionen der miRNAs **A**) -92a-1 **B**) -21 **C**) -146a **D**) -4455 **E**) -3135b **F**) -4521 wurden mit Hilfe der qPCR ermittelt. Es wurde zur 9 h Kontrolle sowie zur endogenen Kontrolle RNU48 normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. n=3-6. Signifikanzen sind gegenüber der entsprechenden Zeitkontrolle angegeben. * $p \leq 0,05$; **/### $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (2way ANOVA Typ II mit Tukey's *HSD multiple comparison test*).

2.4 Überexpression der miRNA-3135b in BEAS-2B Zellen und der Einfluss auf *S. pneumoniae*

In den Daten des miRNA-Profiles von BEAS-2B Zellen (siehe 2.3.3) war ersichtlich, dass die miRNA-3135b spezifisch nach 16 h Infektion mit *S. pneumoniae* hochreguliert wurde. Jedoch wurde nach Stimulation mit LP keine Expressionsänderung dieser miRNA verzeichnet. Dies, in Kombination mit den PEAs der *Microarray* Daten, deutet auf eine *S. pneumoniae*-spezifische Regulation zum späteren Infektionszeitpunkt in den BEAS-2B Zellen hin. Daraufhin wurde die miRNA-3135b weiter untersucht, um putative Effekte dieser miRNA auf das *S. pneumoniae* Wachstum oder den Wirt zu untersuchen. Hierfür wurde die miRNA-3135b mittels Transfektion (beschrieben unter 4.2.1.2) in den BEAS-2B Zellen überexprimiert. Dafür wurden die Zellen mit einer *mimic*-Kontrolle (20 nM) oder der miRNA-3135b *mimic* in den Konzentrationen 10 nM und 20 nM für 4 h vorbehandelt, um anschließend für 4 h mit *S. pneumoniae* (MOI 10) infiziert zu werden.

2.4.1 Erfolgreiche Überexpression der miRNA-3135b hemmt das Wachstum von *S. pneumoniae*

Zunächst wurde die inflammatorische Reaktion der Zellen auf die Überexpression der miRNA-3135b mittels CXCL8-ELISA überprüft. Dadurch sollte sowohl eine erfolgreiche Infektion verifiziert, als auch mögliche Änderungen der inflammatorischen Antwort durch die Überexpression ermittelt werden. Die mikroskopische Analyse der Zellen ergab keine morphologischen Veränderungen, die auf eine Abnahme der Zellviabilität durch die Behandlung hingewiesen hätten (Daten nicht gezeigt).

Die Sekretion von CXCL8 lag nach *mimic*-Ktr-Transfektion bei ca. 330 pg/ml (Abbildung 2-11 A). Die Behandlung mit 10 nM oder 20 nM miRNA-3135b *mimic* führte zu keiner signifikanten Änderung dieser Sekretion im Vergleich zur *mimic*-Ktr. Nach Infektion mit *S. pneumoniae* erhöhte sich die Menge an CXCL8 im Überstand der *mimic*-kontrollbehandelten Zellen signifikant auf etwa 1.500 pg/ml. Die Transfektion mit der miRNA-3135b *mimic* führte in den infizierten BEAS-2B Zellen zu einer Sekretion von zirka 1.200 pg/ml. Dies stellt eine nicht signifikante Verminderung der CXCL8 Menge im Vergleich zur *mimic*-Kontrolle dar.

Des Weiteren wurde die Effizienz der Überexpression in infizierten und uninfizierten BEAS-2B Zellen mittels qPCR überprüft. Die miRNA-3135b wurde in den uninfizierten, *mimic*-transfizierten Zellen um das ca. $4 \cdot 10^5$ -fache gegenüber den kontrolltransfizierten Zellen

überexprimiert (Abbildung 2-11 B). Nach Infektion mit *S. pneumoniae* wurde in den *mimic*-Ktr-Zellen eine etwa 4-fache Erhöhung der Expression der miRNA gegenüber der nicht infizierten Kontrolle verzeichnet. In den Zellen, welche die miRNA-3135b überexprimierten, blieb die Expression dieser miRNA auch nach Infektion auf einem deutlich erhöhten Level und wurde nicht signifikant durch die Infektion beeinflusst.

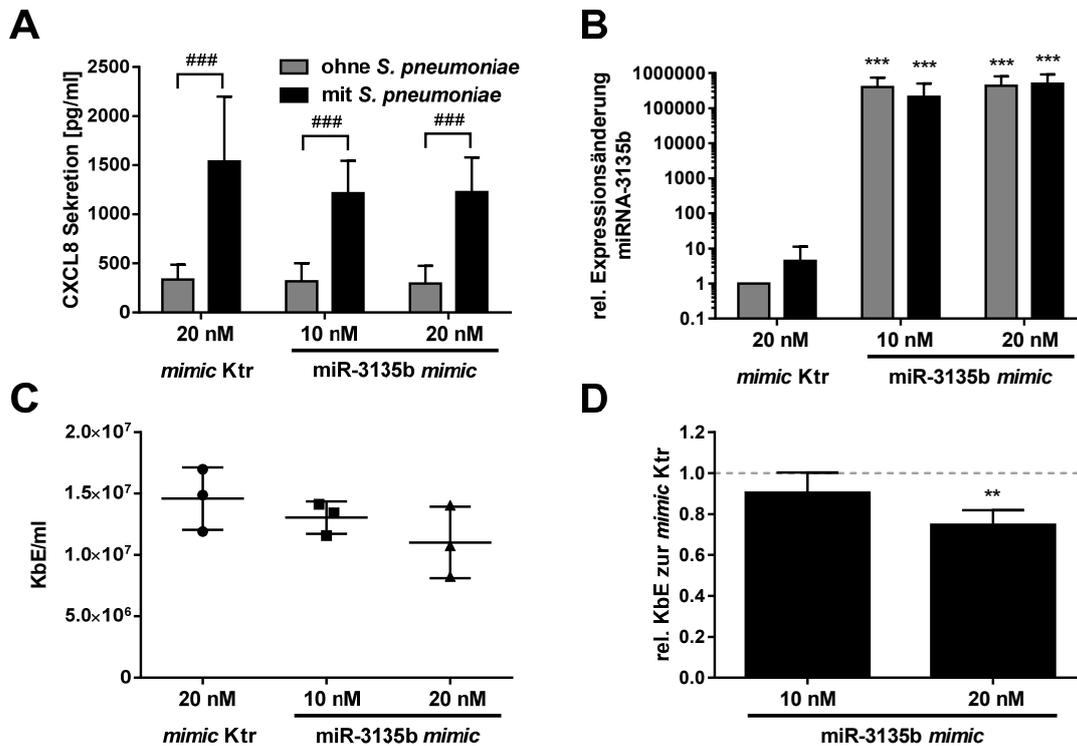


Abbildung 2-11: CXCL8-Sekretion und Effizienz der miRNA-3135b Überexpression von BEAS-2B Zellen mit und ohne Infektion sowie KbE-Bestimmung von *S. pneumoniae* im Überstand von BEAS-2B Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der *mimic*-Kontrolle oder der miRNA-3135b *mimic* mittels Lipofectamine für 4 h transfiziert und anschließend für weitere 4 h mit *S. pneumoniae* (MOI 10) infiziert. **A**) Die Messung der sekretierten CXCL8-Menge erfolgte via ELISA. **B**) Die Bestimmung der miRNA Expressionsrate erfolgte mittels qPCR, normalisiert zur endogenen Kontrolle RNU48 und zur uninfizierten *mimic*-Kontrolle. **C**) und **D**) Ermittlung der Bakterienlast durch Zählung der kolonienbildenden Einheiten (KbE) im Überstand der transfizierten Zellen. **C**) KbE-Bestimmung von *S. pneumoniae* dargestellt als absolute Werte als KbE/ml. **D**) Werte der KbE-Bestimmung aus **C**) normalisiert zur *mimic*-Kontrolle und dargestellt als KbE relativ zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. n=3. ***/#### p<0,001 (2way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test für ELISA und qPCR Daten). **p<0,01 (ungepaarter t-test für KbE Daten). * Signifikanz zur *mimic*-transfizierter Kontrolle. # Signifikanz zur uninfizierter Kontrolle.

Schließlich wurde die Anzahl an Kolonien-bildenden Einheiten (KbE) im Überstand der BEAS-2B Zellen nach Transfektion bestimmt. Diese wurden einerseits als absolute KbE/ml dargestellt und andererseits zur besseren Vergleichbarkeit, auf die KbE der überexprimierenden Zellen zu den KbE der *mimic*-kontrolltransfizierten Zellen normalisiert.

Die *mimic*-kontrolltransfizierten Zellen wiesen eine Pneumokokkenkonzentration von $1,5 \cdot 10^7$ KbE/ml nach 4 h Infektion im Überstand auf (Abbildung 2-11 C). Diese Menge an *S. pneumoniae* war in den Überständen der miRNA-3135b überexprimierenden Zellen auf etwa $1,3 \cdot 10^7$ bei 10 nM *mimic* reduziert. Nach der Transfektion mit 20 nM der miRNA *mimic* wurde ein Rückgang auf $1,1 \cdot 10^7$ KbE/ml detektiert. Deutlicher wurde der Effekt bei der Normalisierung der KbE nach Überexpression zu den KbE nach *mimic*-Ktr-Transfektion. So wurde hier eine 10%ige Reduktion nach der Transfektion mit 10 nM *mimic* detektiert (Abbildung 2-11 D). Ferner wurde nach der Transfektion mit 20 nM miRNA *mimic* ein signifikanter Rückgang der Bakterienlast um 25% ermittelt.

Somit konnte nach Überexpression der miRNA-3135b in BEAS-2B Zellen eine geringe, jedoch keine signifikante Veränderung der Immunantwort der Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus führte die miRNA-3135b Überexpression zu einem signifikanten Rückgang der *S. pneumoniae*-Last von über 25% im Überstand der Zellen.

2.4.2 Nicotinamidstoffwechsel-Genexpression nach miRNA-3135b

Überexpression nicht beeinflusst

Da sich die Überexpression einer miRNA auch auf die Expression der adressierten mRNAs auswirkt, wurde als nächstes nach putativen Ziel-mRNAs gesucht, welche mutmaßlich für den Effekt des Rückganges der *S. pneumoniae*-Last verantwortlich sind. Die bioinformatische Vorhersage von Ziel-mRNAs (via www.targetscan.org/vert_71/) der miRNA-3135b (Agarwal *et al.* 2015), welche in Tabelle 2-3 zusammengefasst wurde, beinhaltete auch drei Gene des Nicotinamidstoffwechselweges.

Die Enzyme NMNAT1, NNMT und NAMPT wurden bereits in den Hochdurchsatzdaten als durch die *S. pneumoniae*-Infektion reguliert erkannt (beschrieben unter 2.3.). Basierend auf dem *context score* (-0,28) und den drei Bindestellen wurde die beste bioinformatische Vorhersage dieser mRNAs für NMNAT1 getroffen.

Die Überexpression der miRNA-3135b führte in den uninfizierten BEAS-2B Zellen zu keiner Expressionsänderung von NMNAT1 (Abbildung 2-12 A). Weiterhin bewirkte die Infektion mit *S. pneumoniae* eine geringe, nicht signifikante Reduktion auf das 0,92-fache. Die Expression von NAMPT wurde in den uninfizierten Zellen durch die Überexpression der miRNA nur gering auf das 0,93-fache reduziert (Abbildung 2-12 B). Nach Infektion wurde in den kontrolltransfizierten Zellen eine signifikante, 2,3-fache Induktion von NAMPT ermittelt. Nach

Überexpression der miRNA wurde in den infizierten Zellen eine signifikante, bis zu 2,6-fache Erhöhung der NAMPT Expression nachgewiesen. Die Expression von NNMT war in den uninfizierten Zellen durch die miRNA Überexpression im Vergleich zur *mimic*-Kontrolle nicht verändert (Abbildung 2-12 C). Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu einer signifikanten 2-fachen Erhöhung der NNMT Expression sowohl in den kontrolltransfizierten als auch den überexprimierenden Zellen.

Tabelle 2-3: Transkripte der bioinformatischen Vorhersage von Ziel-mRNAs der miRNA-3135b mit den niedrigsten *context scores* und den in dieser Arbeit untersuchten mRNAs

mRNA Name	Anzahl Bindestellen im 3'UTR	<i>context score</i>	Microarray Expression ¹ (MOI 0,5 / MOI 1, 16 h)
CDR1as	8	-6,54	-
ORAI2	15	-1,62	-
AGO2 ²	2	-1,38	1,53 / 1,84
DNAH10OS	6	-1,23	-
SLC35E3 ²	3	-1,21	0,79 / 0,84
GIPC3	2	-1,08	-
LRPAP1	3	-1,06	1,05 / 1,05
HMOX2	4	-1,03	1,06 / 1,09
UBE2L6 ²	3	-0,9	1,39 / 1,51
S100A7A	4	-0,88	-
IER3 ²	2	-0,85	9,25 / 11,55
TSPAN14	8	-0,84	1,25 / 1,21
RARRES3 ²	4	-0,84	1,3 / 1,41
FAM222B ²	3	-0,83	0,53 / 0,73
TPD52L1	2	-0,83	1,03 / 1,0
TMEM38A	2	-0,82	0,81 / 0,88
NMNAT1 ^{2,3}	3	-0,28	0,5 / 0,49
NAMPT ^{2,3}	1	-0,1	4,35 / 3,76
NNMT ^{2,3}	2	-0,06	2,87 / 2,51

¹ mRNAs, welche in der *Microarray*-Analyse als in BEAS-2B Zellen exprimiert identifiziert wurden

² signifikante Regulationen mit $p \leq 0,05$ und Expressionsänderungen von $\leq 0,8$ und $\geq 1,2$

³ aufgrund des Fokus dieser Arbeit in qPCR Analysen untersuchte mRNAs

Folglich ergab die Überexpression der miRNA-3135b keine Änderungen in den Expressionen der hier analysierten mRNA der Nicotinamidstoffwechselgene NMNAT1, NAMPT und NNMT.

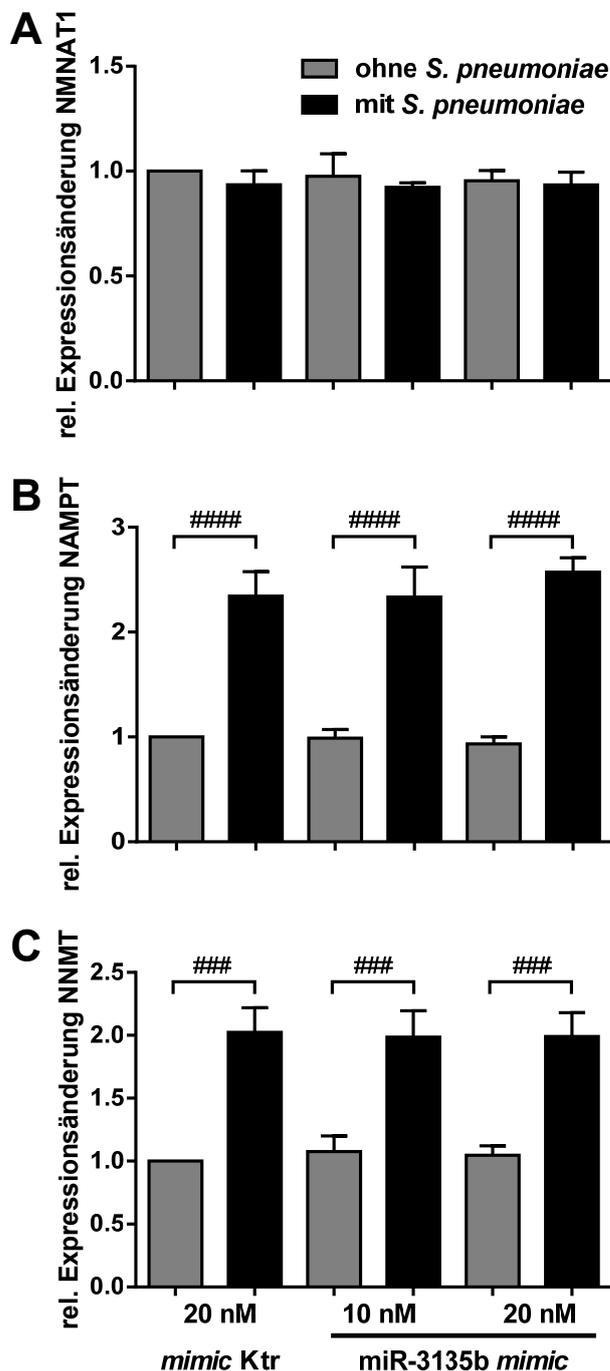


Abbildung 2-12: Analyse der Expressionsänderungen von mRNAs des Nicotinamidstoffwechselweges in BEAS-2B Zellen nach miRNA-3135b Überexpression und *S. pneumoniae*-Infektion. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der *mimic*-Kontrolle oder der miRNA-3135b *mimic* mittels Lipofectamine für 4 h transfiziert und anschließend für weitere 4 h mit *S. pneumoniae* (MOI 10) infiziert. Die Expressionen von **A**) NMNAT1, **B**) NAMPT und **C**) NNMT wurden mittels qPCR ermittelt. Es wurde gegen die endogene Kontrolle RPS18 und die uninfizierte *mimic*-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. n = 3. ### $p \leq 0.001$; #### $p \leq 0,0001$ (2way ANOVA mit Sidak's *multiple comparison test*). Signifikanz zur entsprechenden uninfizierten Kontrolle.

2.4.3 Ziel-mRNA-Identifizierung nach miRNA-3135b Überexpression

Zur Identifizierung von Ziel-mRNAs, welche für die Reduktion der *S. pneumoniae*-Last verantwortlich sind, wurde eine mRNA-Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurden sowohl uninfizierte als auch infizierte Zellen verwendet, welche mit der *mimic*-Kontrolle oder der miRNA-3135b *mimic* transfiziert waren.

Insgesamt ergab die Sequenzierung fast 30.000 Sequenzen. Zur Auswahl geeigneter Kandidaten wurde entschieden, dass diese Sequenzen einen *baseMean* (normalisierte Sequenzanzahl aller verwendeten Proben) ≥ 100 aufweisen müssen, wodurch sichergestellt werden sollte, dass diese Sequenzen in ausreichenden Mengen in den Zellen vorhanden sein sollten. Weiterhin wurde eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ festgelegt, wie auch eine Änderung der Expressionsstärke von $\leq 0,8$ oder $\geq 1,5$. Diese Auswahlkriterien ergaben 60 potentielle Kandidaten nach der Überexpression der miRNA ohne Infektion und 59 Kandidaten mit nachfolgender Infektion. Diese wurden in einem Venn-Diagramm gegenübergestellt (Abbildung 2-13).

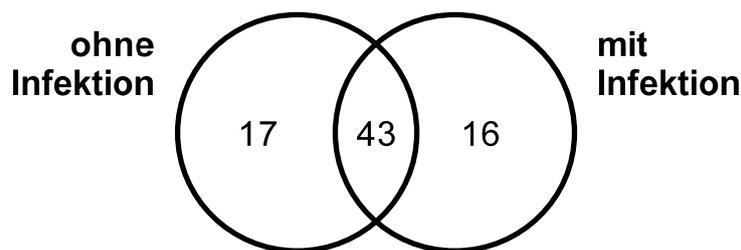


Abbildung 2-13: Venn-Diagramm der signifikant deregulierten Sequenzen nach Überexpression der miRNA-3135b in BEAS-2B Zellen mit und ohne *S. pneumoniae*-Infektion. Die Zellen wurden mit 20 nM miRNA-3135b *mimic* oder der *mimic*-Kontrolle mittels RNAiMAX für 4 h transfiziert und anschließend für weitere 4 h mit *S. pneumoniae* (MOI 10) infiziert. Die Ermittlung der Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ und eine Expressionsänderung von $\leq 0,8$ oder $\geq 1,5$ festgelegt. Der *baseMean* der Sequenzen wurde auf ≥ 100 festgelegt.

Die Tabelle 2-4 fasst die Ergebnisse des Venn-Diagramms (Abbildung 2-13) zusammen und gibt ferner Auskunft über die bioinformatische Vorhersage dieser Sequenz als Ziel-mRNAs für die miRNA-3135b in Form von der Anzahl an Bindestellen im 3'UTR. Weiterhin sind die Informationen zur Expressionsänderung dieser Sequenzen hinzugefügt, sowohl aus der Sequenzierung als auch dem *Microarray*, sofern diese als exprimiert definiert wurden (Signalstärke hat den Schwellenwert überschritten). Die Tabelle ist unterteilt in die drei Abschnitte „ohne Infektion“, „Schnittmenge“ und „mit Infektion“.

Tabelle 2-4: Sequenzen aus dem Venn-Diagramm (Abbildung 2-13)

mRNA Name	Anzahl Bindestellen	Expressionsänderungen			
		Sequenzierung nach Überexpression		Microarrays 16 h	
		Ohne Infektion	mit Infektion	MOI 0,5	MOI 1
Signifikante Regulation ohne Infektion					
SNRPN	-	3.62	0.57	0.93	0.80
RP11-302B13.5	1	2.17	0.92	n.e. ¹	n.e. ¹
H1FX	-	1.65	1.35	1.14	1.21
ARL4D	-	1.61	1.51	0.63	0.44
MEX3D	-	1.58	1.48	1.06	1.66
PDCD6	-	1.57	1.47	1.01	1.02
TCEB3	1	1.54	1.44	0.85	0.77
SRPR	-	1.54	1.44	1.12	1.05
ESYT2	2	1.51	1.35	0.77	0.70
GRWD1	1	1.50	1.48	1.26	1.22
SLC43A3	-	0.80	0.85	2.14	2.14
SAMD1	3	0.78	0.79	0.87	1.08
KLC2	2	0.77	0.78	0.84	0.95
MLXIP	4	0.76	0.79	0.71	0.91
ELL2	2	0.71	0.77	2.03	1.78
PIK3CB	1	0.69	0.79	n.e. ¹	n.e. ¹
RP11-603J24.9	-	0.12	0.43	n.e. ¹	n.e. ¹
Signifikante Regulation in Schnittmenge					
PTPMT1	-	2.35	2.43	0.70	0.67
CCND3	1	2.35	2.35	1.20	1.26
MET	-	2.03	1.94	1.24	1.29
RBPJ	-	1.93	2.16	1.32	1.39
MSRB3	5	1.93	1.93	0.91	0.89
TOMM20	-	1.89	1.89	1.45	1.55
MAOB	1	1.82	1.78	n.e. ¹	n.e. ¹
PPP2R1B	1	1.81	1.86	0.69	0.55
PTPN14	2	1.79	1.57	1.18	1.25
NRBF2	1	1.76	1.86	1.54	1.41
CALU	1	1.71	1.68	1.15	1.13
SLC36A1	2	1.68	1.64	0.80	0.93
SLC45A4	-	1.68	1.51	n.e. ¹	n.e. ¹
FAM49B	-	1.68	1.91	1.10	0.99
OPN1SW	-	1.67	1.94	n.e. ¹	n.e. ¹
BOD1	-	1.67	1.62	1.24	1.32
RFK	-	1.67	1.80	1.15	1.14
PTPN1	-	1.67	1.63	1.24	1.25
TAPT1	-	1.64	1.83	0.59	0.57
ZNHIT6	-	1.61	1.67	0.93	0.79

PIP4K2A	-	1.61	1.61	0.81	0.91
ISOC1	-	1.60	1.51	1.05	1.06
DNMT3B	-	1.59	1.54	0.47	0.42
ERCC5	-	1.56	1.59	0.76	0.67
LZTFL1	-	1.54	1.70	n.e. ¹	n.e. ¹
SMAP1	-	1.54	1.64	1.01	0.88
CLDN1	-	1.52	1.62	5.62	6.15
AL034548.1	-	1.50	1.55	n.e. ¹	n.e. ¹
NFYC	1	0.76	0.74	1.00	0.90
PPARD	3	0.75	0.76	1.02	1.16
MAML1	-	0.75	0.73	0.76	1.10
COG2	2	0.72	0.69	0.67	0.59
FLOT1	1	0.72	0.70	1.24	1.09
ATXN7L3B	2	0.72	0.71	0.80	0.59
FAM222B	3	0.71	0.70	0.53	0.73
TBC1D13	-	0.71	0.72	0.67	0.67
CIZ1	-	0.70	0.70	0.77	0.87
SRCAP	1	0.67	0.69	n.e. ¹	n.e. ¹
ELF4	3	0.66	0.64	0.79	0.85
C15orf39	1	0.65	0.75	1.44	1.77
DNAJC30	-	0.61	0.52	0.65	0.59
RMND5A	2	0.59	0.70	1.47	2.06
TMEM109	1	0.58	0.61	1.04	0.99
Signifikante Regulation mit Infektion					
DDX3Y	-	1.68	1.89	1.54	1.48
SSFA2	-	1.47	1.57	1.05	1.01
CCNC	1	1.36	1.55	1.20	1.01
RHOB	-	1.40	1.53	2.69	4.11
SEL1L	-	1.37	1.52	1.27	1.12
MAP2K4	-	1.44	1.52	1.04	0.79
DDX10	1	1.42	1.51	1.13	0.97
STX12	-	1.35	1.51	0.75	0.74
C11orf24	-	0.84	0.78	0.81	0.85
CNN2	1	0.81	0.77	n.e. ¹	n.e. ¹
TGFBR2	1	0.81	0.77	1.05	0.93
TLN1	2	0.78	0.75	0.88	1.02
IL6R	3	0.81	0.74	0.80	0.85
MAP2K3	1	0.80	0.72	1.79	2.45
ZNF213	2	0.75	0.67	n.e. ¹	n.e. ¹
C1orf131 ¹	1	0.78	0.66	0.68	0.46

¹ nicht exprimiert in den *Micorarray* Analysen

Die mRNAs wurden zur Netzwerkbildung mit Hilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)–Software verwendet. Dabei wurden die mRNAs, mit Informationen zur Regulation aus der Sequenzierung und den *Microarray*-Analysen, direkt oder über Zwischenmoleküle (grau) miteinander in Verbindung gebracht (Abbildung 2-14 A). Ebenfalls wurde in dieser Analyse zwischen Ziel-mRNAs mit (fett gedruckt) und ohne vorhergesagter Bindestelle der miRNA-3135b unterschieden. Weiterhin wurden in dieser Analyse putative primäre Ziel-mRNAs durch ihre antagonistisch zur miRNA-3135b Regulation verminderte Expression (grün) markiert. Demzufolge stellen mRNAs mit erhöhter Expression (rot) putative sekundäre Ziel-mRNAs der miRNA-3135b dar.

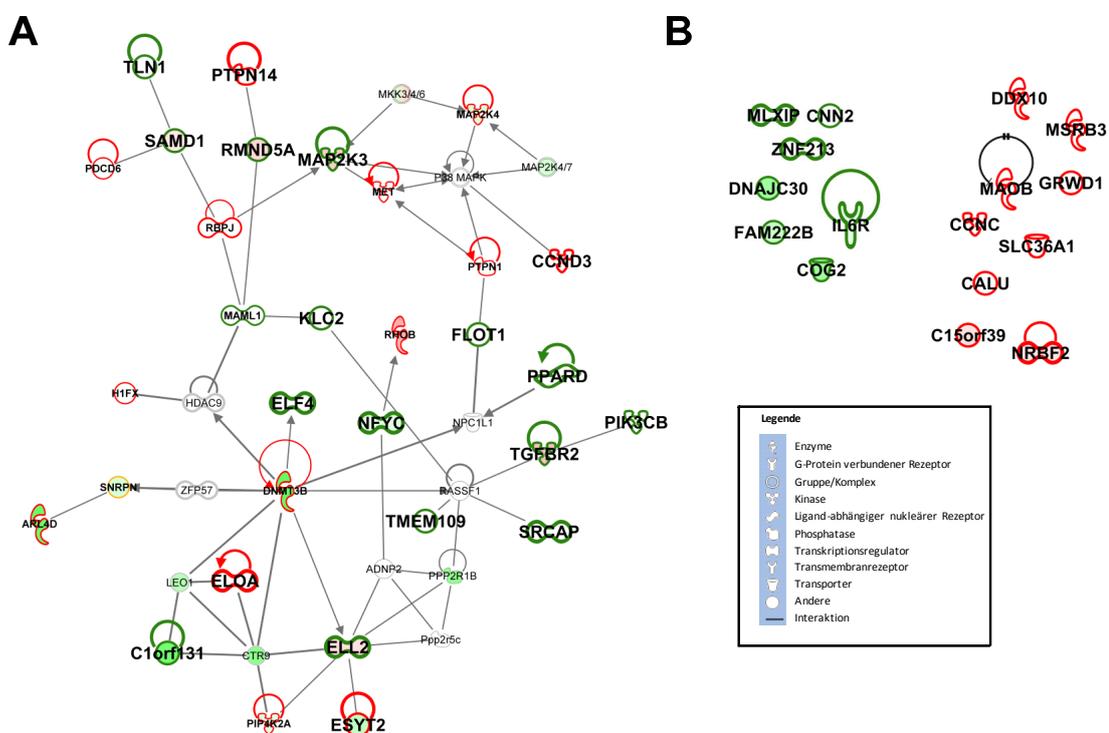


Abbildung 2-14: Netzwerkbildung zur Veranschaulichung putativer Interaktionen der mRNAs aus dem Venn Diagramm (Abb. 2-13). Fett gedruckte Gennamen besitzen mindestens eine Bindestelle für die miRNA-3135b im 3`UTR der jeweiligen mRNA. Äußere Farbgebung spiegelt Expressionsänderung aus der Sequenzierung wider, innere Farbe repräsentiert Expression aus den *Microarray* Analysen (16 h *S. pneumoniae*-Infektion MOI 1). Erhöhte Expression in rot, verminderte Expression in grün. Nicht in der Sequenzierung aufgetretene mRNAs sind in grau dargestellt. Es wurden nur experimentell bestätigte oder Interaktionen mit hoher Zuversicht berücksichtigt. **A)** Netzwerk mit mRNAs (mit und ohne Bindestelle) aus der miRNA-3135b Überexpression wurde mittels IPA erstellt. Pfeile zeigen direkte Beeinflussung eines Moleküls an, während direkte Interaktionen zwischen Molekülen durch Linien gekennzeichnet sind. **B)** Durch Überexpression der miRNA-3135b deregulierte putative Ziel-mRNAs, welche nicht in das Netzwerk **A)** integriert werden konnten. Molekülklassen sind als Symbole in der Legende zusammengefasst.

Durch diese Analyse wurden mRNAs identifiziert, die für Proteine des *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweges wie auch der Regulation der Zellmorphologie (bspw. TLN1 und PTPN14) kodieren, welche im oberen Teil der Abbildung dargestellt sind. Im unteren Teil der Abbildung sind die Interaktionen von mRNAs zur Regulation der Genexpression mittels Transkriptions- und Elongationsfaktoren zu finden. Hier wurden ebenfalls mögliche regulatorische Zentren wie die DNA Methyltransferase 3 Beta (DNMT3B) oder der *Elongation Factor For RNA Polymerase II 2* (ELL2) identifiziert. In Abbildung 2-14 B sind diejenigen Sequenzen zusammengefasst, welche nicht in das Netzwerk unter 2-14 A integriert werden konnten. Auch diese wurden in putative primäre und sekundäre Ziel-mRNAs unterteilt.

Somit wurde festgestellt, dass viele der signifikant deregulierten Sequenzen nach miRNA-3135b Überexpression in einem Netzwerk miteinander in Verbindung gebracht werden konnten. Dabei zeigten sich mögliche Regulationszentren, deren Auswirkungen in einer *S. pneumoniae*-Infektion zu untersuchen sind.

2.5 Beeinflussung der *S. pneumoniae*-Replikation durch Änderungen im Nicotinamidstoffwechsel von BEAS-2B Zellen

In der Publikation von Johnson und Kollegen wird die Theorie aufgestellt, dass NAD Vorgängermoleküle durch *S. pneumoniae* aufgenommen werden können (Johnson *et al.* 2015). Das Enzym NAMPT spielt eine zentrale Rolle unter anderem bei der Bildung von NAD in humanen Zellen (Garten *et al.* 2009). Im Folgenden sollte daher ein möglicher Einfluss von NAMPT durch Depletion dieses Gens mittels siRNA-Transfektion auf das Bakterienwachstum untersucht werden. Dafür wurden die BEAS-2B Zellen für 42 h bzw. 66 h mit siNAMPT oder siKtr transfiziert und anschließend für 4 h mit *S. pneumoniae* (MOI 10) infiziert. Die Effizienz der Depletion wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene geprüft. Zuvor wurden die Zellen nach Depletion des Zielgens auf eine mögliche, durch den *knockdown* hervorgerufene, Zytotoxizität geprüft. Zunächst erfolgte die Untersuchung der bereits analysierten mRNAs des Nicotinamidstoffwechsels (siehe auch Klappenbroschur hinten) in den infizierten Lungenstücken.

2.5.1 Regulationen der mRNAs des Nicotinamidstoffwechsels im Lungenmodell

Im Folgenden wurden die zuvor bereits in den BEAS-2B Zellen untersuchten Gene des Nicotinamidmetabolismus hinsichtlich ihrer Expression im Lungengewebe mittels qPCR analysiert. Es sollte geprüft werden, ob ähnliche Änderungen der jeweiligen Expressionen auch im *ex vivo* Lungengewebe erkennbar waren. Zusätzlich wurde die Proteinexpression von NAMPT ebenfalls im Lungengewebe untersucht. Zunächst erfolgen die Untersuchungen der *S. pneumoniae*-Zeitreihen, gefolgt von den Resultaten des Koinfektionsmodells.

In den Kontrollgeweben war die Expression der mRNA von NMNAT1 über die Zeit leichten Schwankungen unterworfen, blieb aber annähernd auf dem 0 h Basallevel (Abbildung 2-15 A). Eine deutliche Verringerung der NMNAT1-Expression wurde in den infizierten Lungengeweben nachgewiesen. Während die Expression nach 6 h noch etwa auf dem Niveau der 0 h Kontrolle war, sank die Expression nach Infektion zum 24 h Zeitpunkt schließlich auf das 0,3-fache ab und war damit signifikant niedriger als die Kontrolleexpression.

Die Expression der mRNA von NNMT wurde in den uninfizierten Proben als auch in den infizierten Proben über die Zeit auf das 0,7-fache bzw. 0,5-fache reduziert (Abbildung 2-15 B).

Die Expression der NAMPT mRNA schwankte in den Kontrollgewebestücken über die Zeit auf bis zu 1,6-fach im Vergleich zur 0 h Kontrolle (Abbildung 2-15 C). Eine deutliche Erhöhung der Expression wurde in den infizierten Proben nach 12 h detektiert. Die Expressionsrate stieg hier auf bis zu 2,6-fach an und fiel zum 24 h Zeitpunkt wieder auf 1-fach ab.

Die relative Expression für das Protein NAMPT schwankte stark in den uninfizierten Kontrollgeweben auf bis über 194% (Abbildung 2-15 E). Im Vergleich dazu zeigten die infizierten Gewebestücke einen kontinuierlichen Anstieg der Proteinexpression von NAMPT von 110% zum 6 h Zeitpunkt auf 160% nach 24 h, welcher jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgewebestücken darstellte.

In den koinfizierten Lungengeweben zeigte die mRNA von NMNAT1 in den Kontrollgeweben zunächst eine 1,4-fache Erhöhung nach 8 h, bevor nach 24 h erneut etwa die Basalexpression des 1 h Zeitpunktes gemessen wurde (Abbildung 2-16 A). Die viralen Infektionen bewirkten zum 1 h und 8 h Zeitpunkt keine Expressionsunterschiede zu den entsprechenden Zeitkontrollen. Zum 24 h Zeitpunkt wurde in allen Infektionen eine verminderte NMNAT1 mRNA-Expression nachgewiesen, welche sowohl nach *S. pneumoniae*- als auch nach Koinfektionen signifikante Reduktionen auf bis zu unter 0,5-fach darstellte.

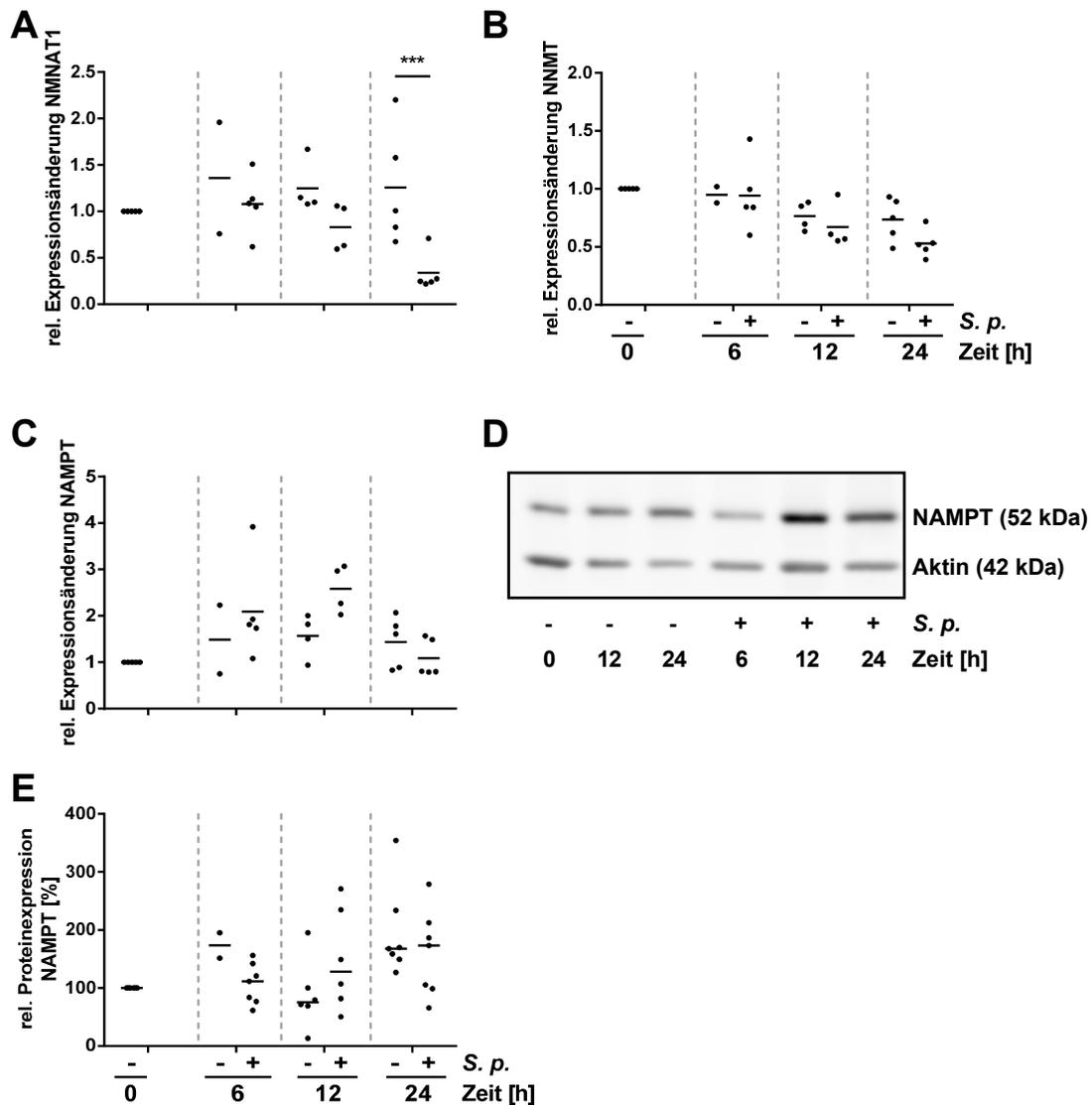


Abbildung 2-15: Analyse der Expressionsänderungen von mRNAs des Nicotinamidstoffwechselweges und die relative Proteinexpressionsrate von NAMPT in humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit *S. pneumoniae* (*S. p.*). Das Gewebe wurde per Injektion mit *S. pneumoniae* infiziert oder zur Kontrolle mit Medium gespritzt. Es wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. **A-C)** Analysen der Expressionen von **(A)** NINAT1, **(B)** NNMT und **(C)** NAMPT mittels qPCR. Es wurde zur endogenen Kontrolle RPS18 und zur 0 h Kontrolle normalisiert. **D)** Repräsentative Darstellung der Expression von NAMPT in der Western Blot Analyse. Von jeder Probe wurden 25 µg unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Als Kontrolle diente der Nachweis des Proteins Aktin. Größe in kDa wurde anhand des Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder zugewiesen. **E)** Streudiagramm zur Quantifizierung des NAMPT Proteins mittels Software Lab Image 1D aus unabhängigen biologischen Replikaten. Angegeben ist das prozentuale, relative Expressionslevel von NAMPT, normalisiert auf Aktin und auf die 0 h Kontrolle. Dargestellt sind Streudiagramme mit Mittelwerte. n = 2-7. *** $p \leq 0,001$ (2way ANOVA Typ II mit Tukey's *HSD multiple comparison test*).

Für die mRNA-Expression von NNMT wurde eine tendenzielle Reduktion über die Zeit sowohl in den Kontrollgeweben als auch in den infizierten Geweben nachgewiesen (Abbildung 2-16 B). Die geringste Expressionsrate von unter 0,5-fach wurde nach *S. pneumoniae*-Infektion

gemessen. Keine Expressionsänderung stellte einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle dar.

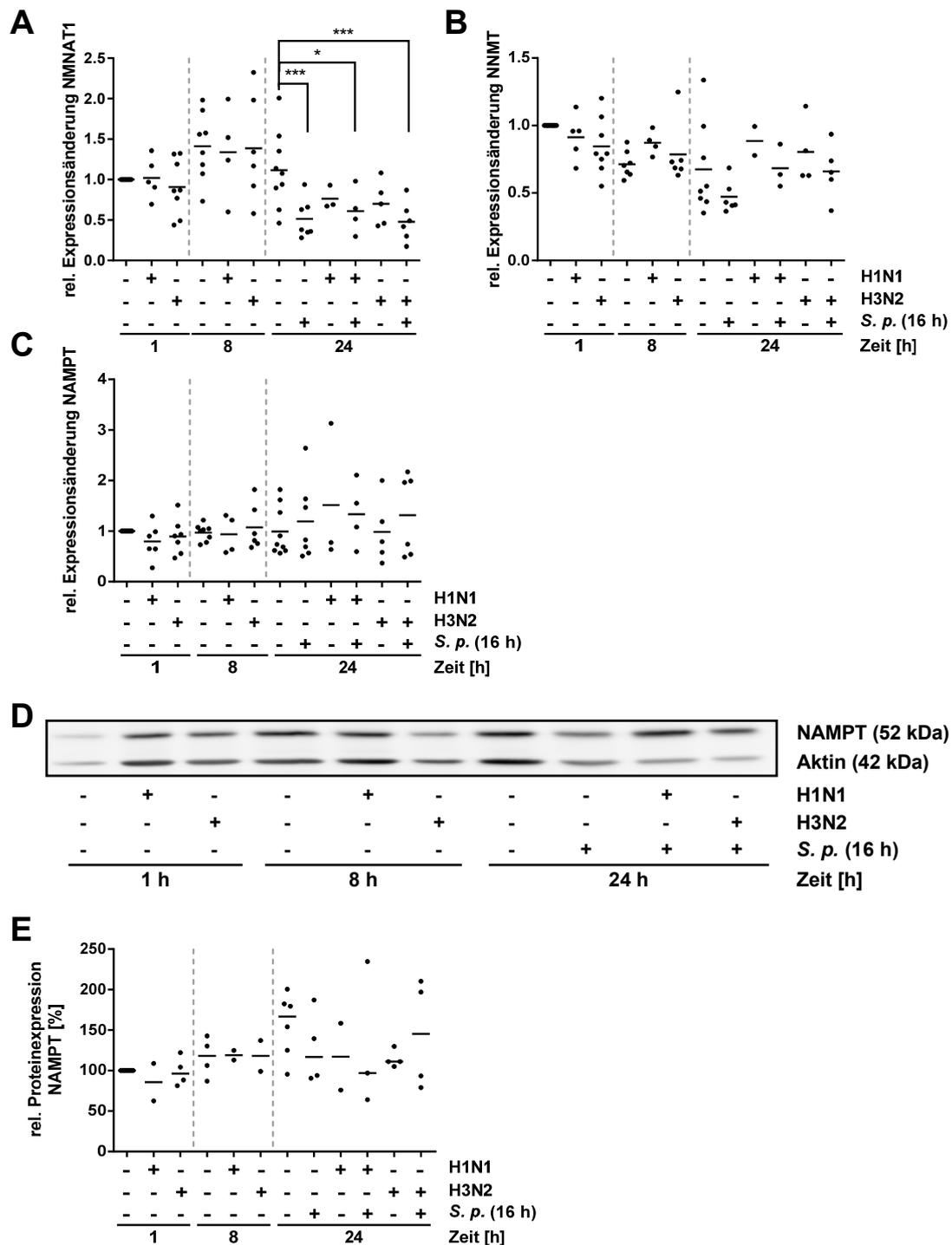


Abbildung 2-16: Analyse der Expressionsänderung von mRNAs des Nicotinamidstoffwechselweges und die relative Proteinexpressionsrate von NAMPT in humanen Lungengewebestücken nach Infektion mit Influenza A Viren (H1N1 oder H3N2) und/oder *S. pneumoniae* (*S. p.*). Das Gewebe wurde durch Zugabe des Virus oder per Injektion der Bakterien infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. **A-C)** Analysen der Expressionen von **(A)** NMNAT1, **(B)** NNMT und **(C)** NAMPT mittels qPCR. Es wurde zur

endogenen Kontrolle RPS18 und zur 1 h Kontrolle normalisiert. **D)** Repräsentative Darstellung der Expression von NAMPT in der Western Blot Analyse. Von jeder Probe wurden 25 µg unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Als Kontrolle diente der Nachweis des Proteins Aktin. Größe in kDa wurde anhand des Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder zugewiesen. **E)** Streudiagramm zur Quantifizierung des NAMPT Proteins mittels Software Lab Image 1D aus unabhängigen biologischen Replikaten. Angegeben ist das prozentuale, relative Expressionslevel von NAMPT, normalisiert auf Aktin und auf die 0 h Kontrolle. Dargestellt sind Streudiagramme mit Mittelwerte. n = 2-11. *p<0,05, ***p<0,001 (2way ANOVA Typ II mit Tukey's *HSD multiple comparison test*).

Die Expression der NAMPT mRNA zeigte geringe Schwankungen in den Kontrollproben und den infizierten Gewebeproben über die Zeit und erreichte mit der 1,5-fachen Erhöhung der Expression nach 24 h H1N1 Infektion die größte Abweichung (Abbildung 2-16 C). Es wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt.

Die Proteinexpression von NAMPT war ebenfalls starken Schwankungen unterworfen (Abbildung 2-16 E). Dabei wurden nur geringe Unterschiede zur entsprechenden Zeitkontrolle detektiert, welche keine signifikanten Regulationen präsentierten.

Zusammenfassend zeigen die Gene des Nicotinamidmetabolismus sowohl in den *S. pneumoniae*-Infektionen als auch im Koinfektionsmodell diverse Expressionen. Für NMNAT1 wurde eine signifikante Reduktion der Expression nach 24 h in der *S. pneumoniae*-Einzelfektion und in den Lungen des Koinfektionsmodells detektiert. Die mRNA Expressionen von NNMT und NAMPT zeigten nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zu den Kontrollen. Weiterhin schwankten die Proteinexpressionen von NAMPT deutlich und wiesen zu allen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen auf.

2.5.2 Erfolgreiche Depletion von NAMPT bewirkt keinen Vitalitätsverlust in BEAS-2B Zellen

Bevor ein möglicher Einfluss des NAMPT *knockdowns* auf das Pneumokokkenwachstum untersucht wurde, erfolgte die Messung der Vitalität der Zellen nach siRNA-Transfektion mittels Durchflusszytometrie. In den si-Kontrollzellen wurden sowohl nach 42 h als auch nach 66 h über 97% lebende Zellen festgestellt (Abbildung 2-17 A). Die Unterschiede zu den siNAMPT behandelten Zellen waren mit 1% nur gering. Nach Infektion mit *S. pneumoniae* wurden weniger als 5% apoptotische oder tote Zellen nach 42 h detektiert. Ferner wurde keine gravierende Änderung der Zytotoxizität in den infizierten Proben zwischen 42 h und 66 h Transfektion festgestellt.

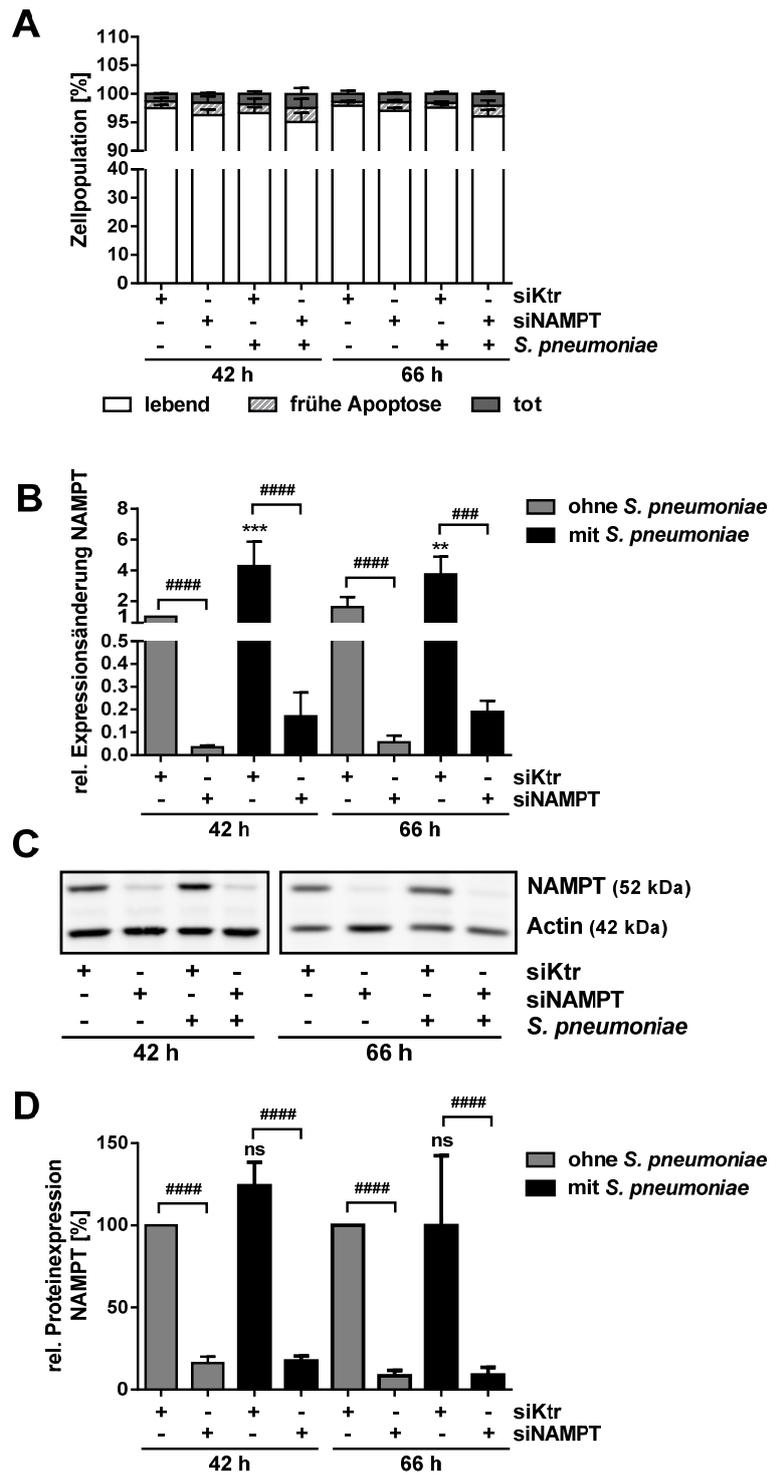


Abbildung 2-17: Effekt des NAMPT knockdowns auf die Zytotoxizität von BEAS-2B Zellen und Nachweis der knockdown Effizienz auf RNA- und Proteinebene. BEAS-2B Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit siNAMPT oder siKtr mittels Lipofectamine transfiziert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *S. pneumoniae* (MOI 10) für 4 h. **A**) Zusammenfassung der Messungen unabhängiger biologischer Replikate mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil an der Gesamtzellpopulation. Die Zellen aus der Phase der späten Apoptose wurden mit den abgestorbenen Zellen in der Population „tot“ zusammengefasst. **B**) Die Bestimmung der Expressionsrate des Genes NAMPT erfolgte mittels qPCR normalisiert zu RPS18 und zur siKtr 42 h. **C**) Repräsentative

Darstellung der Western Blots 42 h (links) oder 66 h (rechts) nach Transfektion. Von jeder Probe wurden 25 µg mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Als Kontrolle diente der Nachweis der Proteins Aktin. **D)** Die prozentuale relative Proteinexpression von NAMPT wurde mittels Western Blot und anschließender Quantifizierung der Banden ermittelt. Die Expressionsrate des Proteins wurde dabei durch Normalisierung zur jeweiligen endogenen Kontrolle Aktin ermittelt. Es wurde zum jeweiligen Zeitpunkt auf die uninfizierte siKtr normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n = 4. **p≤0,01, ***/####p≤0,001, #####p≤0,0001 (2way ANOVA mit Tukey's *multiple comparison test*). * Signifikanz zur jeweiligen unbehandelte Kontrolle. # Signifikanz über die Zeit innerhalb einer Behandlung. ns = nicht signifikant.

Als nächstes wurde die Effizienz des *knockdowns* von NAMPT sowohl auf mRNA-Ebene mittels qPCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot verifiziert und quantifiziert. Nach 42 h siNAMPT-Transfektion wurde eine signifikante Reduktion der NAMPT-Expression auf unter 4% beobachtet, welche zum 66 h Zeitpunkt auf unter 6% anstieg (Abbildung 2-17 B). Nach Infektion mit *S. pneumoniae* wurde in den kontrolltransfizierten Zellen zum 42 h Zeitpunkt eine signifikante 4,3-fache NAMPT-Induktion nachgewiesen. Nach Infektion der NAMPT depletierten Zellen wurde eine Steigerung auf 17% im Vergleich zu siNAMPT-transfizierten Zellen ohne *S. pneumoniae*-Infektion gemessen. In den 66 h Proben wurde nach Infektion in den Kontrollzellen eine 3,7-fache Induktion der mRNA ermittelt. In den NAMPT depletierten Zellen wurde zu diesem Zeitpunkt eine Reduktion auf 19% beobachtet. Damit waren die NAMPT-Expression auch nach Infektion zu beiden Zeitpunkten signifikant reduziert.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die in der qPCR gemessene Reduktion der NAMPT mRNA auch zu einer Reduktion der Proteinexpression von NAMPT führt. Zum Zeitpunkt 42 h nach der Transfektion mit siNAMPT war in den uninfizierten Zellen eine Expression von ca. 16% gegenüber den siKtr-Zellen zu verzeichnen (Abbildung 2-17 D). In den infizierten Proben zu diesem Zeitpunkt ging die relative Expression des NAMPT Proteins von ca. 120% auf 17% zurück. Nach 66 h siNAMPT-Transfektion wurde ebenfalls eine deutliche Reduktion von über 90% gemessen. Dabei war die Stärke des Expressionsrückgangs unabhängig von der Infektion.

Somit rief die Depletion von NAMPT keine Zytotoxizität in uninfizierten als auch in infizierten BEAS-2B Zellen hervor. Weiterhin reduzierte die Transfektion mit der siNAMPT nicht nur die endogene Expression von NAMPT, sondern es wurde auch der durch die Infektion hervorgerufenen Hochregulation entgegengewirkt.

2.5.3 Depletion von NAMPT führt zu signifikanten Expressionsänderungen weiterer Gene des Nicotinamidmetabolismus

Nach Feststellung einer erfolgreichen Depletion von NAMPT, wurde nachfolgend untersucht, ob dadurch andere Gene des Nicotinamidmetabolismus in ihrer Expression beeinflusst werden. Hierfür wurden die Expressionen der mRNAs der Enzyme NNMT und NMNAT1 mittels qPCR untersucht.

Die Expression der NNMT mRNA war in den uninfizierten Zellen 42 h nach dem NAMPT *knockdown* auf das 0,9-fache gegenüber der si-Kontrolle gesunken (Abbildung 2-18 A). Nach Infektion wurde in den Kontrollzellen eine signifikant 2-fach erhöhte Expression von NNMT detektiert. In den infizierten NAMPT depletierten Zellen fiel die relative Expression signifikant auf das 1,5-fache ab. Nach 66 h Transfektion wurde kein Unterschied der NNMT mRNA Expression in siKtr und siNAMPT-transfizierten Zellen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurde nach Infektion eine Hochregulation von 3,3 in den si-Kontrollzellen bzw. von 2,6 in den *knockdown*-Zellen gemessen. Die NNMT-Expression wurde in infizierten siNAMPT-transfizierten Zellen signifikant zu den dazugehörigen si-Kontrollzellen zu beiden Zeitpunkten reduziert.

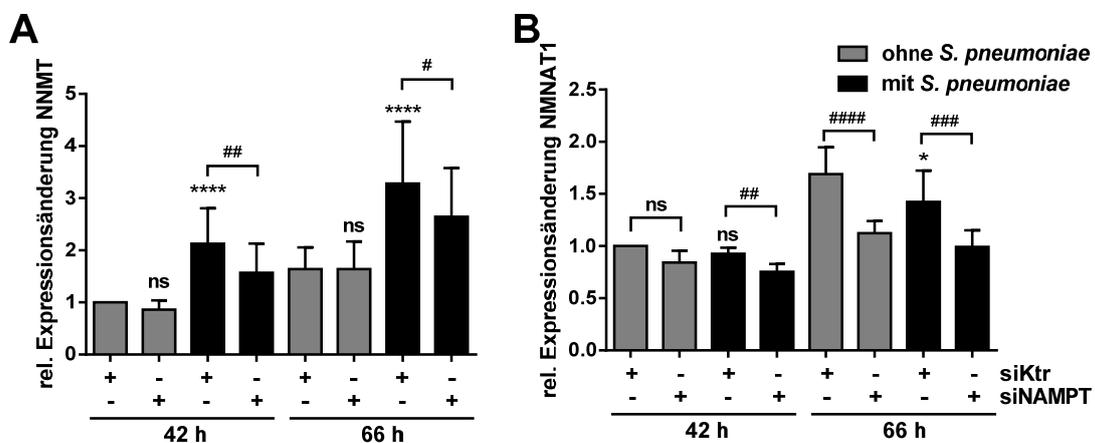


Abbildung 2-18: Effekt des NAMPT *knockdowns* auf mRNAs des Nicotinamidstoffwechsels. Die BEAS-2B Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit siNAMPT oder siKtr mittels Lipofectamine transfiziert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *S. pneumoniae* (MOI 10) für 4 h. Die Bestimmung der Expressionsraten erfolgte mittels qPCR normalisiert zu RPS18 und zur uninfizierten 42 h si-Kontrolle. Die relativen Expressionsraten von **A)** NNMT und **B)** NMNAT1 sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichungen. n = 4. */#p≤0,05, ##p≤0,01, ###p≤0,001, ****/#####p≤0,0001 (2way ANOVA mit Sidak's *multiple comparison test*). * Signifikanz zur jeweiligen unbehandelte Kontrolle. # Signifikanz über die Zeit innerhalb einer Behandlung. ns = nicht signifikant.

Die Expression der mRNA von NMNAT1 wurde durch den NAMPT *knockdown* 42 h nach Transfektion um etwa 15% reduziert (Abbildung 2-18 B). Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu diesem Zeitpunkt in den NAMPT depletierten Zellen zu einer signifikanten Verringerungen der Expression auf bis zu 0,75-fach im Vergleich zu den infizierten si-Kontrollzellen. Zum späteren Zeitpunkt des Experimentes wurde eine 1,7-fach erhöhte NMNAT1-Expression in den uninfizierten siKtr verzeichnet, welche signifikant auf 1,1-fach in den siNAMPT-transfizierten Zellen abnahm. Durch die Infektion mit *S. pneumoniae* zeigte sich nach 66 h eine Reduktion dieser Expression auf 1,4-fach in den Kontrollzellen und 1-fach in den *knockdown* Zellen. Die siNAMPT-Transfektion führte hier zu einer signifikanten Verringerung der NMNAT1-Expression nach der Infektion.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Depletion von NAMPT in BEAS-2B Zellen geringe, aber oftmals signifikante Auswirkungen auf die Expressionen der mRNAs von NMNAT1 und NNMT zu beiden Zeitpunkten des Experimentes hatte.

2.5.4 Reduziertes Wachstum von *S. pneumoniae* nach Depletion von NAMPT in BEAS-2B Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die Depletion von NAMPT in BEAS-2B Zellen einen Einfluss auf die Replikation von infizierenden Pneumokokken hat. Dafür wurden die Kolonien-bildende Einheiten (KbE) im Überstand transfizierter Zellen bestimmt. Es wurden die absoluten KbE-Werte ermittelt (Abbildung 2-19 A), sowie, zur besseren Vergleichbarkeit, die relativen KbE-Werte als KbE im Vergleich zur si-Kontrolle angegeben (Abbildung 2-19 B).

In den 42 h si-kontrolltransfizierten Zellen wurden etwa $2 \cdot 10^7$ KbE/ml ermittelt. Dies sank zum 66 h Zeitwert auf $1,7 \cdot 10^7$ KbE/ml ab. In den NAMPT depletierten Zellen wurden 42 h nach Transfektion $1,8 \cdot 10^7$ KbE/ml gezählt. Auch nach 66 h siNAMPT-Transfektion nahm die Menge an *S. pneumoniae* ab. Hier wurden noch etwa $1,6 \cdot 10^7$ KbE/ml ermittelt. Diese Reduktionen wurden ebenfalls in der normalisierten Darstellung deutlich. Hier konnten sowohl für den 42 h als auch für den 66 h Zeitwert signifikante Rückgänge der *S. pneumoniae*-Konzentration von bis zu 16% gemessen werden.

Zusammenfassend führt eine Depletion von NAMPT zu einer signifikanten Verringerung der *S. pneumoniae*-Last. NAMPT oder Metabolite dieses Stoffwechselweges scheinen somit die Infektionsstärke beeinflussen zu können. Ob dieser Einfluss sich auf die inflammatorische Antwort der Zellen auswirkt, sollte im Weiteren genauer geprüft werden.

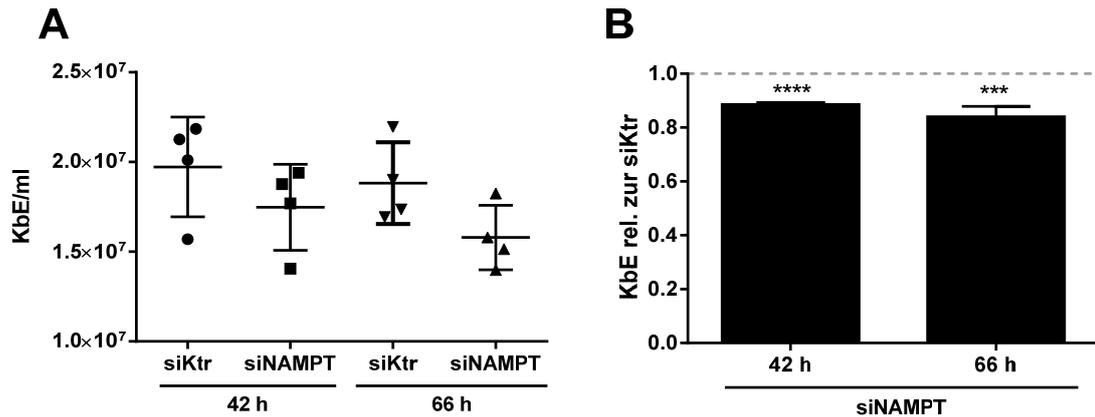


Abbildung 2-19: Effekt des NAMPT knockdowns auf die Replikation von *S. pneumoniae*. Die BEAS-2B Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit siNAMPT oder siKtr mittels Lipofectamin transfiziert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *S. pneumoniae* (MOI 10) für 4 h. Die Bestimmung der Bakterienlast erfolgte zum jeweiligen Zeitpunkt mittels KbE-Zählung. **A)** Darstellung der absoluten Werte als KbE/ml. **B)** Die gezählten Kolonien wurden zur siKtr des jeweiligen Zeitpunktes normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n = 4. ***p≤0,001; ****p≤0,0001 (ungepaarter t-test).

2.5.5 Depletion von NAMPT reduziert die inflammatorische Antwort der BEAS-2B Zellen

Zur Ermittlung der inflammatorischen Antwort der BEAS-2B Zellen nach NAMPT Depletion und *S. pneumoniae*-Infektion wurde die Sekretion von CXCL8 mittels ELISA gemessen. Die Sekretion von CXCL8 lag sowohl nach siKtr- als auch nach siNAMPT-Transfektion nach 42 h bei ca. 90 pg/ml (Abbildung 2-20). Nach der Infektion erhöhte sich die Konzentration an sekretiertem CXCL8 in siKtr-transfizierten Zellen signifikant auf etwa 2.300 pg/ml, während in den siNAMPT transfizierten Zellen nach Infektion 970 pg/ml zu messen waren. Dies entspricht einem signifikanten Rückgang von 58%. In den 66 h Proben betrug die sekretierte CXCL8 Menge 50 pg/ml (siKtr) bzw. 70 pg/ml (siNAMPT) in nicht infizierten BEAS-2B Zellen. Nach Infektion mit *S. pneumoniae* wurden über 1.000 pg/ml nach siKtr- bzw. 390 pg/ml nach siNAMPT-Transfektion sekretiert. Dies entspricht einem signifikanten Rückgang von zirka 60%.

Folglich beeinflusst die NAMPT Depletion drastisch die inflammatorische Antwort der BEAS-2B Zellen nach Infektion, welches möglicherweise auf das 10% verminderte Wachstum von *S. pneumoniae* zurückzuführen sein könnte. Jedoch stellte sich die Frage, ob eine verminderte Bakterienlast von 10% einen Rückgang der CXCL8-Sekretion von über 50% hervorrufen kann. Um dies zu testen, wurden verschiedene Stimuli verwendet, welche ebenfalls eine inflammatorische Antwort in den BEAS-2B Zellen hervorrufen.

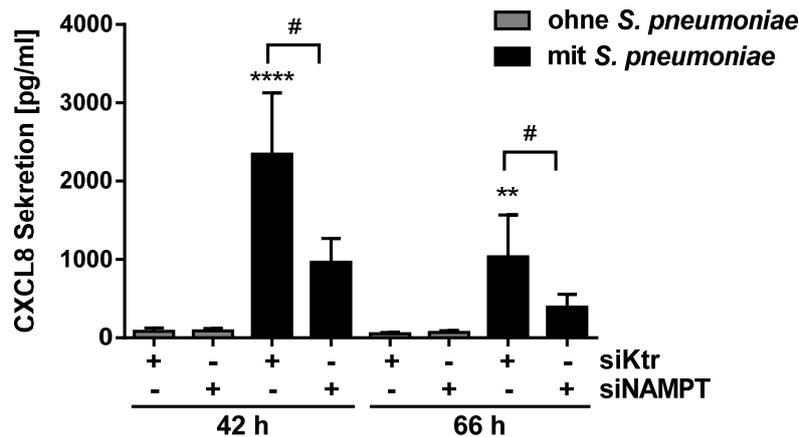


Abbildung 2-20: Effekt des NAMPT *knockdowns* auf die inflammatorische Antwort von BEAS-2B Zellen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit siNAMPT mittels Lipofectamine transfiziert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *S. pneumoniae* (MOI 10) für 4 h. Abgebildet ist die mittels ELISA gemessene CXCL8-Sekretion in pg/ml. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n = 4. #p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 (2way ANOVA mit Tukey's *multiple comparison test*). * Signifikanz zur jeweiligen unbehandelte Kontrolle. # Signifikanz über die Zeit innerhalb einer Behandlung.

2.5.6 Auswirkungen der NAMPT Depletion nach inflammatorischen

Stimuli

Zur Untersuchung, ob die CXCL8-Sekretion in NAMPT-depletierten BEAS-2B Zellen ebenfalls nach Behandlung mit inflammatorischen Stimuli reduziert ist, wurden die Zellen erneut für 42 h bzw. 66 h mit der siKtr oder siNAMPT transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit LP (TLR2-Ligand) bzw. poly(I:C) (TLR3-Ligand) für 4 h. Es wurde die CXCL8-Sekretion mittels ELISA sowie Expressionsanalysen durch qPCR von den zuvor untersuchten Genen (NAMPT, NNMT und NMNAT1) des Nicotinamidstoffwechsels durchgeführt.

Die unstimulierte si-Kontrolle zeigte nach 42 h Transfektion eine geringe CXCL8-Sekretion von 60 pg/ml (Abbildung 2-21 A). Mit etwa 50 pg/ml war die sekretierte CXCL8-Menge in den unstimulierten NAMPT-depletierten Zellen zu diesem Zeitpunkt ähnlich stark. Nach Stimulation mit LP oder poly(I:C) wurden in den 42 h si-kontrolltransfizierten Zellen signifikant erhöhte CXCL8-Sekretionen von etwa 700 pg/ml gemessen. Dieser Wert sank in den siNAMPT-transfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt deutlich, aber nicht signifikant auf zirka 500 pg/ml ab. Zum Zeitpunkt 66 h nach Transfektion wurde in den si-Kontrollzellen eine CXCL8-Sekretion von 30 pg/ml gemessen, welche nach Zugabe der Stimulanzen signifikant auf bis zu 400 pg/ml anstieg. Ebenso stieg die Menge an freigesetztem CXCL8 in den NAMPT-depletierten Zellen von ca. 40 pg/ml auf bis zu 480 pg/ml nach den Stimulationen an.

Die Expression der mRNA von NAMPT wurde durch die 42 h Transfektion mit siNAMPT signifikant auf 7% reduziert (Abbildung 2-21 B). Die Stimulation mit LP oder poly(I:C) führte in den si-Kontrollzellen zu einem signifikanten 3-fachen Anstieg der NAMPT-Expression. Nach der signifikanten Depletion des Genes bewirkte eine Stimulation mit LP bzw. poly(I:C) eine gering erhöhte Expression im Vergleich zur unstimulierten siNAMPT-Kontrolle. Diese Werte stellen signifikante Reduktionen im Vergleich zu den Werten der stimulierten, si-Kontrollzellen dar. Zum 66 h Zeitpunkt der Transfektion wurde eine signifikante Reduktion der NAMPT-Expression auf 4% ermittelt. Die Stimulation mit LP bzw. poly(I:C) führte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu einer signifikanten 2,4- bis 3,4-fachen Erhöhung der NAMPT-Expression in den si-kontrolltransfizierten Zellen. Die NAMPT-Expression stieg in den *knockdown* Zellen nach Zugabe von LP bzw. poly(I:C) zu diesem Zeitpunkt gering an und stellte auch hier im Vergleich zu den stimulierten, si-kontrolltransfizierten Proben signifikante Reduktionen dar.

NNMT wurde in den unstimulierten siNAMPT-transfizierten Zellen nach 42 h nicht reguliert (Abbildung 2-21 C). Nach Stimulation sowohl mit LP als auch mit poly(I:C) wurde die NNMT-Expression in den siKtr Zellen wie auch in den *knockdown* Zellen etwa 2-fach erhöht. Zum späteren Zeitpunkt wurde in den siKtr Zellen eine signifikante, bis zu 3-fache Erhöhung der NNMT-Expressionsrate nach Stimulation ermittelt. In den siNAMPT-transfizierten Zellen war die NNMT-Expression nach Stimulation mit LP oder poly(I:C) erhöht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der NNMT-Expression den si-kontrolltransfizierten Zellen und den NAMPT depletierten Zellen festgestellt.

Die Expression von NMNAT1 war in den 42 h si-NAMPT-transfizierten Zellen auf das 0,8-fache vermindert (Abbildung 2-21 D). Weiterhin führte die Stimulation mit LP oder poly(I:C) in den kontrolltransfizierten Zellen zu einer geringen Reduktion der NMNAT1-Expression. Ebenfalls wurde nach NAMPT *knockdown* eine verminderte NMNAT1-Expression ermittelt, welche nach LP-Stimulation einen signifikanten Unterschied zu entsprechenden siKtr darstellte. Die si-Kontrolle wies 66 h nach Transfektion eine 1,3-fach erhöhte NMNAT1-Expression im Vergleich zum 42 h Zeitwert auf. Auch nach 66 h Transfektion führten sowohl der NAMPT *knockdown* als auch die Stimulationen mit LP oder poly(I:C) zu Verminderungen der NMNAT1-Expressionen. Nach LP- und poly(I:C)-Stimulation in den NAMPT-depletierten Zellen wurde eine signifikant Reduktion der NMNAT1-Expression im Vergleich zu den entsprechenden siKtr ermittelt.

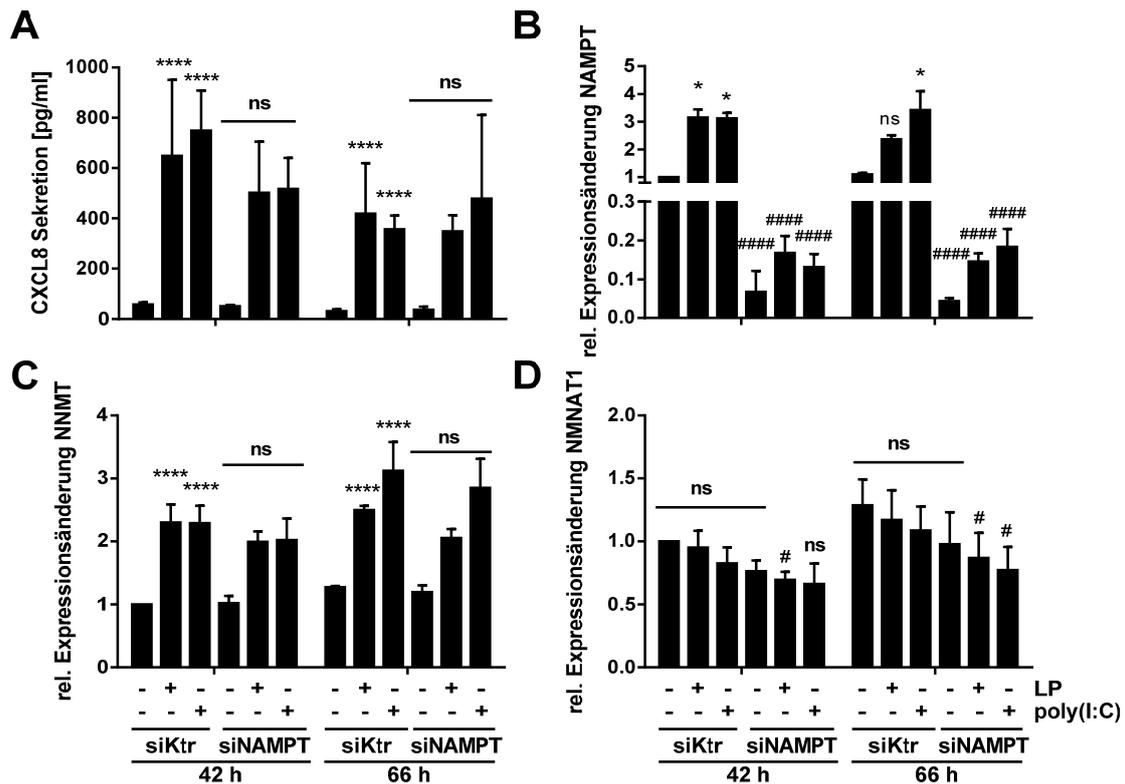


Abbildung 2-21: Auswirkungen des NAMPT *knockdowns* auf Regulationen von BEAS-2B Zellen nach Behandlung mit inflammatorischen Stimuli. Die BEAS-2B Zellen wurden für 42 h oder 66 h mit der si-Kontrolle oder der siNAMPT transfiziert. Anschließend erfolgten Stimulationen mit LP (1 µg/ml) oder poly(I:C) (1 µg/ml) für 4 h. Es wurde die CXCL8-Sekretion sowie die Expressionen der Gene NAMPT, NNMT und NMNAT1 untersucht. **A**) Die im ELISA ermittelte CXCL8-Sekretion in pg/ml. **B-D**) Relative Expressionsraten der NAD-Gene **(B)** NAMPT, **(C)** NNMT und **(D)** NMNAT1 ermittelt via qPCR. Es wurde jeweils zu RPS18 und zur siKtr 42 h normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n = 3. */#p≤0,05, ****/####p≤0,0001 (2way ANOVA mit Tukey's *multiple comparison test*) * Signifikanz relative zur unbehandelten siKtr, # Signifikanz relative zur entsprechenden siKtr. ns = nicht signifikant.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von CXCL8 auch nach Zugabe von artifiziellen Stimuli wie LP oder poly(I:C) in NAMPT-depletierten BEAS-2B Zellen 42 h nach Transfektion reduziert war. Diese Reduktion wurde zum Zeitpunkt 66 h nach Transfektion nicht mehr detektiert, jedoch kann eine generelle, möglicherweise zeitabhängige Beeinflussung der inflammatorischen Antwort durch den NAMPT *knockdown* nicht ausgeschlossen werden. Die Expression von NAMPT, welche durch LP und poly(I:C) induziert wurde, war nach dem *knockdown* von NAMPT auch nach Zugabe der Stimuli weiterhin stark vermindert. Die Expressionsraten von NNMT und NMNAT1 wurden durch die Depletion von NAMPT in beiden Zeitpunkten nach Transfektion gering reduziert.

2.5.7 Nicotinamid-Mononukleotid fördert das Wachstum von

S. pneumoniae

Zuvor wurde bereits festgestellt, dass der *knockdown* des Genes NAMPT, welches für die Produktion von Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) verantwortlich ist, zu einem signifikanten Rückgang der *S. pneumoniae*-Last führt. Daher sollte nachfolgend geprüft werden, ob die NMN Konzentration im Infektionsmedium einen direkten Einfluss auf das Wachstum von *S. pneumoniae* hat.

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass in reinem Bronchialepithelzellmedium kein *S. pneumoniae*-Wachstum nachweisbar war. Daher wurden für diese Untersuchung Überstände aus sonifizierten Bronchialepithelzellen als Wachstumsmedium verwendet (siehe 4.2.1.8), um den Bakterien dadurch eine Infektion zu simulieren. Die Präsenz eukaryotischer Zellbestandteile hat metabolische Änderungen in den Bakterien zur Folge und führt dadurch zu Reaktionen, welche ohne die Anwesenheit humaner Zellkomponenten nicht messbar wären (Aprianto *et al.* 2016). Dadurch sollten die auftretenden Reaktionen vergleichbarer mit tatsächlichen Infektionen sein. *S. pneumoniae* wurde in einer Suspension aus sonifizierten BEAS-2B Zellen kultiviert, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen an NMN versetzt waren. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden KbE-Zählungen durchgeführt. Dies wurde als absolute KbE/ml dargestellt (Abbildung 2-22 A). Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen der Kontrolle, welche kein additives NMN enthielt, wurden die KbE der NMN Proben auf die KbE der Kontrollen des jeweiligen Zeitpunktes normalisiert (Abbildung 2-22 B).

Wie erwartet, wurde in der Kontrolle, welche kein zusätzliches NMN enthielt, ein Wachstum von *S. pneumoniae* nachgewiesen. Von einer Bakterienmenge von $5,4 \cdot 10^6$ KbE/ml nach 2 h stieg diese weiter auf $4,8 \cdot 10^7$ KbE/ml nach 6 h an. Im weiteren Verlauf von 21 h und 24 h nach Beginn des Experimentes fiel die Bakterienlast auf $1,5 \cdot 10^7$ KbE/ml ab. Nach der Zugabe von $0,1 \mu\text{M}$ bzw. $1 \mu\text{M}$ NMN wurde ein ähnliches Wachstumsverhalten wie in der Kontrolle beobachtet. Hier stieg die Bakterienlast bis etwa $4,5 \cdot 10^7$ KbE/ml bei 6 h an und fiel danach wieder auf $1,6 \cdot 10^7$ KbE/ml ($0,1 \mu\text{M}$) bzw. $2,5 \cdot 10^7$ KbE/ml ($1 \mu\text{M}$) ab und war somit leicht gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von $100 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ NMN führte zunächst zu einer geringeren Bakterienlast innerhalb der ersten 6 h ($4 \cdot 10^7$ KbE/ml bei $100 \mu\text{M}$ und $3,3 \cdot 10^7$ KbE/ml bei $500 \mu\text{M}$ NMN) im Vergleich zur Kontrolle. Danach stiegen die Werte weiter an und erreichten deutliche Unterschiede 21 h nach Start des Experimentes. Hier erreichte die Bakterienlast das mehr als 4-fache der Kontrollmenge. Mit einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ additivem NMN wurden zu diesem Zeitpunkt eine im Vergleich zu Kontrolle signifikant höhere

Menge an *S. pneumoniae* ermittelt. Wie auch in den Kontrollen und den Proben mit geringen NMN Konzentrationen zeigte sich auch mit den hohen NMN Konzentrationen ein Rückgang der Bakterienlast zum 24 h Zeitpunkt. Jedoch wurde zu diesem Zeitpunkt noch immer etwa die 3,8-fache Menge an lebenden Bakterien in den Suspensionen mit höheren NMN-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

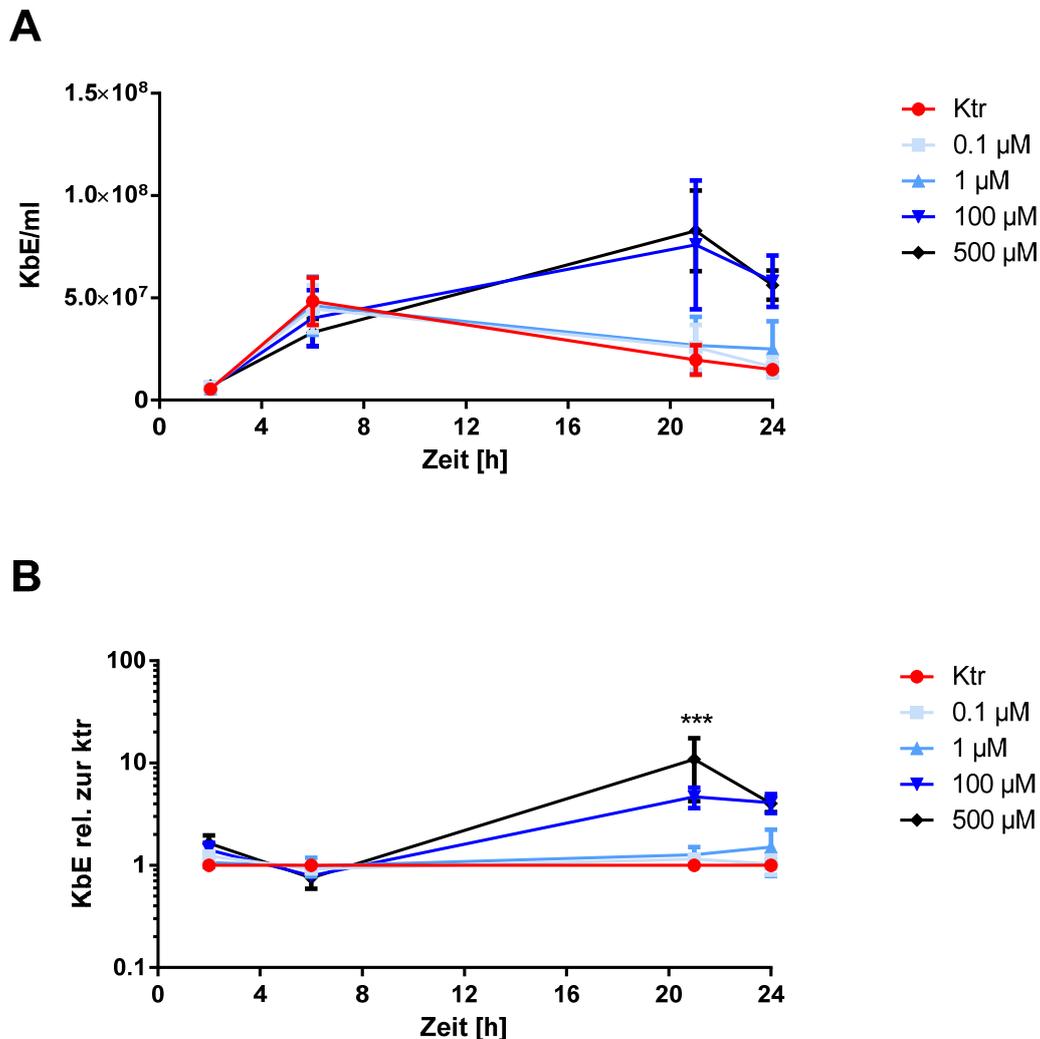


Abbildung 2-22: Wachstumsversuche von *S. pneumoniae* in Suspensionen aus sonifizierten BEAS-2B Zellen mit und ohne additivem NMN. A) KbE Bestimmung von *S. pneumoniae* dargestellt als absolute Werte als KbE/ml. **B)** Werte KbE Bestimmung aus **(A)** normalisiert zur Kontrolle und dargestellt als KbE relativ zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler. Rot = Kontrolle, helles Blau = 0,1 μ M NMN, mittlerer Blau = 1 μ M NMN, dunkles Blau = 100 μ M NMN, Schwarz = 500 μ M NMN. n=4. ***p<0,001 (2way ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).

Folglich konnten die Bakterien in der Suspension aus sonifizierten BEAS-2B Zellen zunächst sehr gut replizieren, jedoch war dieses Wachstum innerhalb weniger Stunden deutlich eingeschränkt und führte so zur Abnahme lebender *S. pneumoniae* in der Kultur. Dieser Rückgang der Konzentration an Bakterien ist wahrscheinlich auf den Verbrauch von Nährstoffen in der Suspension zurückzuführen. Additives NMN bis zu einer Konzentration von 1 μM in dieser Suspension bewirkte zwar einen leichten Wachstumsvorteil für die Pneumokokken, aber es wurde kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ohne zusätzliches NMN festgestellt. Die höheren Konzentrationen an additivem NMN in der Suspension aus sonifizierten BEAS-2B Zellen führten in den ersten 6 h des Experimentes zu einem verzögerten Wachstum der Bakterien, welches möglicherweise auf verstärkte Anpassungsvorgänge an das neue Umweltmilieu zurückzuführen ist. Die Bakterien replizierten in diesen Suspensionen allerdings über einen deutlich längeren Zeitraum, sodass die *S. pneumoniae*-Last nach 21 h signifikant höher war als in der Kontrolle ohne additives NMN. Zusammenfassend mit den Daten der NAMPT Depletion wurde in dieser Arbeit veranschaulicht, dass Nicotinamid-Mononukleotid einen signifikanten Einfluss auf die Replikation von *S. pneumoniae* hat.

3 DISKUSSION

Die Infektion mit *S. pneumoniae* ist eine der Hauptursachen für Todesfälle bei Kindern weltweit (UNICEF 2017, WHO 2016). Diese treten als reine bakterielle Infektionen oder als viral-bakterielle Superinfektionen auf (Palacios *et al.* 2009). Die Epithelzellen des humanen Respirationstraktes bilden dabei die erste Verteidigungsbarriere gegen die Infektion mit Pneumokokken. Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion humaner Epithelzellen auf die Infektion mit *S. pneumoniae* detailliert zu analysieren. Dazu wurde ein Expressionsprofil nach Pneumokokken-Infektion in humanen Bronchialepithelzellen erstellt sowie ein *ex vivo* Modell mit humanem Lungengewebe für Influenza-Pneumokokken-Koinfektionen herangezogen.

3.1 Humanes Lungengewebe als *ex vivo* Infektionsmodell

3.1.1 Präklinische Faktoren beeinflussen das Transkriptom des humanen *ex vivo* Lungengewebes erheblich

In dieser Arbeit wurde ein *ex vivo* Modell mit humanem Lungengewebe für *S. pneumoniae* Infektionen oder Koinfektionen mit Influenza A Viren (IAV) und *S. pneumoniae* verwendet. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Kirschbaum (Universitätsklinikum Marburg, Sektion Thoraxchirurgie). Für diese Studie wurden die Randbereiche des operativ entfernten Gewebes genutzt. Es wurde darauf geachtet, dass das Gewebe makroskopisch gesund sowie nicht übermäßig blutig, entzündet oder in pathologischer Weise verändert war.

Ex vivo Infektionsmodelle mit humanen Lungengewebekulturen wurden zuvor in verschiedenen bakteriellen und viralen Untersuchungen genutzt (Booth *et al.* 2004; Chakrabarty *et al.* 2007; Dromann *et al.* 2010; Rupp *et al.* 2004). Dabei konnte die Induktion von inflammatorischen Molekülen wie CXCL8, IL-6 oder TNF- α durch die Infektion mit Pneumokokken nachgewiesen werden (Fatykhova *et al.* 2015; Szymanski *et al.* 2012; Xu *et al.* 2008). Jedoch wurden vorwiegend die Proteinsekretionen dieser Moleküle ermittelt. Die Freisetzung von CXCL10 wurde neben MIP1- β oder IFN- β als Immunantwort nach Influenzainfektion in humanem *ex vivo* Lungengewebe nachgewiesen (Weinheimer *et al.* 2012), kann aber auch durch bakterielle, mykotische oder parasitäre Erreger induziert werden (Liu *et al.* 2011). Die mRNA-Expression wurde dabei nicht untersucht. Die Messung der freigesetzten Proteinmenge, wie am Beispiel von CXCL8 in der hier vorliegenden Arbeit

ebenfalls verdeutlicht, ermöglichte die Bestimmung eines klaren Anstieges der Molekülkonzentration nach Infektion, da diese ein über die Zeit akkumulierendes Summensignal im Überstand darstellt. Der Nachweis einer Expressionsänderung auf mRNA-Ebene spiegelt eher eine Momentaufnahme wider, welche viel stärker dem Einfluss verschiedener Expressionsniveaus in unterschiedlichen Zelltypen unterworfen ist. Dies wurde auch bei den in dieser Studie beobachteten, schwankenden IL-6- und SOD2-Expressionsdaten deutlich, welche keine signifikanten, infektionsabhängigen Unterschiede aufzeigten. Möglicherweise ist dies durch Komorbiditäten des hier verwendeten Lungengewebes bedingt.

Neben den generell spenderabhängigen Unterschieden lag bei den Patienten, denen dieses Gewebe entnommen wurde, eine Krebsdiagnose vor. Die meisten dieser Patienten litten an Lungenkarzinomen oder Metastasen von streuenden Kolon- oder Nierenkarzinomen, welche einen operativen Eingriff erforderten. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Lungengeweben kann jedoch eine tumorbedingte, entzündliche Veränderung des Gewebes nicht vollends ausgeschlossen werden, welche möglicherweise starke Einflüsse auf die Expressionslevel der gemessenen Transkripte hat. Weiterhin waren die Patienten eher höheren Alters und Raucher. Die Beeinflussung der Zytokine durch eine Rauchbelastung wurde in Mausstudien beschrieben (Bauer *et al.* 2010) und wäre damit ebenfalls für die in dieser Studie verwendeten Lungengewebe plausibel. Eine Veränderung von Expressionswerten kann unter Verwendung von pathologisch und operativ vorgeschädigtem Gewebe nur schwer spezifischen Behandlungen zugeordnet werden. Eine COPD-Studie zeigte, dass Gen-Expressionen durch die reduzierte Lungenfunktion verändert sein können (Zeskind *et al.* 2008). Demzufolge könnten in dieser Arbeit beobachtete, vermeintliche Regulationen ebenfalls auf Vorerkrankungen zurückzuführen und nicht infektionsspezifisch sein. Weiterhin ist dieses Gewebe mechanischem Stress ausgesetzt, welcher die Expressionen beeinträchtigen kann. Dieser tritt einerseits durch die Operation selbst und andererseits durch die Vorbereitung für die Infektionsversuche mittels Skalpell, Pinzette und Stanze auf. Ferner übt die mittels Applikation durchgeführte Infektion mit *S. pneumoniae* selbst mechanischen Stress aus, welches bei der Virus-Infektion nicht notwendig ist.

All diese Faktoren könnten die Regulationen der hier untersuchten mRNAs stark beeinflussen und würden die wenig vorhandenen Unterschiede zwischen den mediumbehandelten Kontrollen und den tatsächlich infizierten Gewebestücken erklären. Eine Beeinflussung der CXCL8 Sekretion kann dabei nicht ausgeschlossen werden, würde jedoch aufgrund des zuvor erwähnten Summensignals deutlich weniger ins Gewicht fallen. Möglicherweise beschränkten

sich frühere Studien, welche das *ex vivo* Modell verwendeten, auf sekretorische Analysen, da dort ähnliche Beobachtungen zu schwankenden mRNA Expressionen gemacht wurden.

3.1.2 Grenzen des *ex vivo* Modells und alternative Möglichkeiten

Ein Vorteil des *ex vivo* Modells gegenüber der klassischen Zellkultur stellt, aufgrund des Zelltropismus verschiedener Pathogene, die Vielfältigkeit für Infektionen dar. Weiterhin bietet das *ex vivo* Modell die Möglichkeit zu mikroskopischen Untersuchungen, wodurch bspw. Zielzellen im heterogenen Zellverband identifiziert werden können (Weinheimer *et al.* 2012). Allerdings können keine systemischen Untersuchungen nachgebildet werden. Zwar sind in diesem Lungengewebestück die verschiedenen Zelltypen zu finden, jedoch können keine Immunzellen aus dem Blut rekrutiert werden, sodass die eigentlich *in vivo* stattfindende Bekämpfung der Infektion nicht im realen Maße nachgebildet wird. Ferner ist die Zellneubildung eingeschränkt, möglicherweise bedingt durch mangelnde Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr.

Eine Alternative würden Tiermodelle darstellen. In vielen Studien werden Mäuse genutzt, welche die Vorteile der Kosteneffizienz sowie die Möglichkeit zu genetischen Manipulation besitzen (Baron *et al.* 2012; Thangavel & Bouvier 2014). Allerdings werfen Tierversuche ethische Fragen auf (Festing & Wilkinson 2007) und stellen oftmals nur bedingt physiologische und genetische Vergleichsmodelle zum Menschen dar (Mak *et al.* 2014; Seok *et al.* 2013; Shanks *et al.* 2009). Da das hier verwendete *ex vivo* Modell im Sinne der 3R-Strategie (*Replace, Reduce, Refine*) allerdings eine Alternative zu Tiermodellen bieten soll (Russell & Burch 1959), wäre die erneute Verwendung eines Tiermodells ein Rückschritt in diesem Prozess.

Ein vergleichsweise einfach umzusetzendes Modell stellen sogenannte *air-liquid-interface* (ALI)-Kulturen dar (Fulcher *et al.* 2005). Aufgrund der Differenzierung der Zellen sind Funktionen wie Zilienschlag oder die Bildung von Mucus nachweisbar, wodurch dieses System näher an der Wirtskomplexität als herkömmliche Zelllinien ist. Das ALI-Modell ist erfolgreich für diverse Infektionen genutzt worden (Krunkosky *et al.* 2007; Matrosovich *et al.* 2004) und wurde auch arbeitsgruppenintern für *S. pneumoniae* bzw. Koinfektion mit Influenza verwendet (Böhm 2017). Außerdem ist es möglich, im Gegensatz zu dem *ex vivo* Modell der vorliegenden Arbeit, gesunde Spender in einer entsprechenden Studie einzuschließen. Durch den gering-invasiven Eingriff mittels bronchialer Bürsten (*bronchial brushing*) können ebenso bei nicht-erkrankten Spendern Lungengewebezellen entnommen und in Kultur gebracht werden.

Eine weitere Möglichkeit liegt in der Verwendung des *precision-cut lung slices* Modell (Wohlsen *et al.* 2003). Die mittels eines speziellen Mikrotoms geschnittenen Scheiben können dabei bis zu 15 Tage in Kultur gehalten werden (Neuhaus *et al.* 2017). Durch die extrem geringe Dicke des Gewebes ist die Nährstoffversorgung deutlich gegenüber dem hier verwendeten Modell gesteigert. Dadurch können apoptotische Zellprozesse durch Nährstoffmangel und dadurch bedingte Regulationen vermieden oder reduziert werden. Weiterhin würden der mechanische Stress und damit einhergehende Veränderungen verringert werden, da bei einer Übertragung der Infektion auf ein *precision-cut lung slices* Modell die Injektion der Bakterien nicht stattfinden müsste.

Moderne Ansätze stellen z. B. *tissue engineering* Modelle dar, welche Organe unter Verwendung von Stammzellen künstlich nachbilden können (Kubo 2012). Die artifizielle Nachbildung von Abschnitten des menschlichen Respirationstraktes wurde schon erfolgreich am Patienten angewendet (Macchiarini *et al.* 2008; Omori *et al.* 2005) und wäre demnach ebenfalls für Infektionsexperimente denkbar. Gleiches gilt für die Methode des Bioprinting zur Erstellung von dreidimensionalen *in vitro* Gewebemodellen (Jang *et al.* 2016; Liaw & Guvendiren 2017). Inzwischen wird an sogenannten 4D-Druckmethoden gearbeitet, bei denen die biologische Funktion z. B. des Organs mit berücksichtigt wird. Diese besitzen die Möglichkeit, auf Umwelteinflüsse zu reagieren, wie für die Reaktion von Pflanzenzellen auf den Turgor gezeigt wurde (Gladman *et al.* 2016). Eine Ausweitung dieser Methode auf tierische und menschliche Zellen und Organe ist durchaus vorstellbar. Experten auf diesem Gebiet glauben, dass innerhalb der nächsten 50 Jahre das biologische Drucken von funktionstüchtigen Geweben möglich sein wird (Liaw *et al.* 2018). Eine komplexe Methode zur Untersuchung verschiedener Erkrankungen und Prozesse, welche einige Nachteile des *ex vivo* Modell ausgebessert hat, stellen die sogenannten *organs-on-chip* dar. Diese komplexe Mikroeinheiten können die Mikroumgebung und physiologische Funktion von Organen nachahmen (Huh *et al.* 2011) und werden inzwischen kommerziell vertrieben (Firma Emulate, Inc., Boston, USA). Es wäre jedoch darauf zu achten, welchen Ursprungs die verwendeten Zellen sind. Sollten Zelllinien verwendet werden, würde dieses Modell wieder einen artifiziielleren Status haben. Der Aufbau von *organs-on-chip*-Einheiten auf Basis der Stammzellerfahrung des *tissue engineering* würde wahrscheinlich eine perfekte Kombination aus diesen beiden hochentwickelten Methoden darstellen. Durch solche Neuerungen können die Nachteile des in dieser Arbeit verwendeten *ex vivo* Modells beseitigt werden. Eine verbesserte Versorgung mit Nährstoffen würde die Überlebensdauer der Zellen des Zellverbandes deutlich erhöhen und dadurch infektionsspezifische Regulationen deutlich machen.

3.1.3 Beeinflussung von Genexpressionen im Gewebeverband

Mit verbesserten *ex vivo* Modellen können Untersuchungsmöglichkeiten deutlich steigen. Bei länger überlebenden Zellen, wie im *precision-cut lung slices* Modell gezeigt (Neuhaus *et al.* 2017), würden Veränderung von Genexpressionen in einem Gewebeverband möglich sein. In Zellkulturexperimenten dieser Arbeit wurde die Expression eines Gens mittels siRNA-Transfektion unterdrückt (diskutiert in 3.4). Die scheinbar mangelnde Nährstoffversorgung und -aufnahme im *ex vivo* Modellgewebe, welche ein Absterben der Zellen zur Folge hat, lässt Analysen in dieser Form nicht zu. Es wurden jedoch verschiedene Techniken zur artifiziellen Veränderung der Genexpression in Geweben beschrieben. Verschiedene Studien verwendeten erfolgreich siRNA-vermitteltes *Gene Silencing* in Mäusen (Jin *et al.* 2017; Xia *et al.* 2002). Eine Übertragung dieser Methode auf ein verbessertes humanes *ex vivo* Gewebemodell wäre demnach plausibel. Eine weitere Möglichkeit dazu stellen sogenannte Morpholinos dar. Diese Antisense-Oligonukleotide wurden ursprünglich als antivirale Substanzen entwickelt, da sie die Replikation von Viren inhibieren können (Raviprakash *et al.* 1995). Seit dem 21. Jahrhundert wurden Morpholinos in einer Reihe von entwicklungsbiologischen Untersuchungen an Modellorganismen eingesetzt (Audic *et al.* 2001; Heasman *et al.* 2000). Morpholinos haben Vorteile gegenüber klassischen siRNAs wie bessere Stabilität gegenüber enzymatischer Degradation und wurden inzwischen in klinischen Tests verwendet (Iversen *et al.* 2012; Kinali *et al.* 2009).

Die neuere, sogenannte *genome-engineering* Technologie stellt das *clustered regulary interspaced short palindromic repeat* und *CRISPR-associated* (CRISPR/Cas) –System, eine Art RNA-basiertes, adaptives Immunsystem in Bakterien und Archaeen, dar (Horvath & Barrangou 2010; Jinek *et al.* 2012). Mit Hilfe dieser Methoden wurde in verschiedenen Studien die Inaktivierung von Zielgenen in Bakterien sowie tierischen Zellen gezeigt (Cho *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2013). Ferner konnten dadurch gewebespezifische Gendisruptionen in Zebrafischen erfolgreich durchgeführt (Ablain *et al.* 2015) und die Genexpression in Mausmodellen beeinflusst werden (Wang *et al.* 2013a; Yang *et al.* 2013).

Demzufolge könnte eine Beeinflussung von Genen ebenso in humanen *ex vivo* Geweben möglich sein, sofern die Grundvoraussetzungen bezüglich Versorgung und Überleben der Zellen sowie erfolgreicher Manipulation der Genexpression gesichert sind. Grundsätzlich hängt der Nutzen von solch einem *ex vivo* Infektionsmodell vom Fokus der Analysen ab. Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz oder immunohistochemischen Methoden können sehr gut in diesem *ex vivo* Modell durchgeführt werden (Hocke *et al.* 2013a). Jedoch deuten

die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Untersuchungen zu Stoffwechselwegen oder deren Veränderungen durch Pathogene möglicherweise nicht ideal auf Genexpressionsebene in diesem Modell zu untersuchen sind. Die Einflüsse durch die Behandlung sowie der Versorgungsmangel führen zu Abweichungen der Zellhomöostase, wodurch infektionsbedingte Auswirkungen schwerer zu erkennen sind. Ob die hier erwähnten Methoden geeignete Alternativen zur Untersuchung von Stoffwechselwegen in Infektion darstellen, bleibt zu untersuchen.

3.2 Expressionsprofil-Analysen ergaben Pneumokokken-spezifische Muster

In dieser Arbeit wurde ein globales Expressionsprofil aus Transkriptom, Proteom und miRNome nach *S. pneumoniae*-Infektion erstellt. Durch die Erstellung dieser Profile sollte nicht nur die Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und humanem Lungenepithel besser verstanden, sondern auch spezifische Pneumokokken-abhängige Regulationen identifiziert werden.

3.2.1 *S. pneumoniae*-spezifische Genregulation zum späten

Infektionszeitpunkt

Das mRNA-Profil wurde mittels eines *Microarray* untersucht, der über 46.000 Sequenzen des humanen Genoms, sowohl kodierender als auch nicht-kodierender RNAs, abdeckt (Abb. 2-4). Davon wurden etwa 10.000 Sequenzen als exprimiert detektiert. Die Definition einer exprimierten Sequenz basiert auf der Fluoreszenzintensität. Verbleibt diese unter dem Schwellenwert, wird diese RNA in dieser Bedingung als nicht exprimiert definiert. Jedoch kann, selbst wenn dieser Schwellenwert nicht erreicht wurde, diese RNA trotzdem in den Zellen vorhanden und funktionell wichtig sein. Dabei würden sich aufgrund des schwachen Signals nur schwer Aussagen über deren tatsächliche Regulation treffen lassen. Dallas und Kollegen führten auf, dass die Übereinstimmung zwischen *Microarray*-Untersuchungen und qPCR-Analysen sehr hoch ist, aber in bis zu 16% der Fälle Unterschiede auftreten können (Dallas *et al.* 2005). Ob dies hier der Fall ist, würden weitere, gezielte Untersuchungen offenlegen.

Die als exprimiert definierten Sequenzen wurden in einer PCA und Venn-Diagrammen gegenübergestellt (Abb. 2-4) und zeigten auf, dass die Regulationen zum frühen Zeitpunkt zwischen LP-Stimulation und Pneumokokken-Infektion vergleichbar waren, während zum

späteren Zeitpunkt ein *S. pneumoniae*-spezifisches Muster vorlag. Die Menge an deregulierten RNAs nahm zum späteren Zeitpunkt der Infektion deutlich zu, und die Anzahl an *S. pneumoniae*-spezifischen Regulationen war deutlich erhöht. Dass zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Expressionsmuster auftreten können, wurde schon durch Aprianto und Kollegen gezeigt (Aprianto *et al.* 2016). Jedoch wurden in dieser Studie nur frühere Zeitpunkte als in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchen sich sowohl das humane als auch das bakterielle Genom innerhalb der ersten vier Stunden der Infektion änderten (Aprianto *et al.* 2016). Dies geht einher mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in welcher ebenfalls zeitabhängige Veränderungen der Expression nachweisbar waren. In einer weiteren Studie wurde das Transkriptom von *Streptococcus pyogenes*-infizierten Epithelzellen untersucht (Nakagawa *et al.* 2004). Die Autoren beobachteten, dass die infektionsbedingte Apoptose durch mitochondriale Dysfunktion ausgelöst wurde. In dieser Studie wurde eine bewusst hohe MOI verwendet (MOI 50), um Apoptose-abhängige Regulationen der Zelle zu untersuchen. Im Gegensatz dazu war der Fokus der hier vorliegenden Studie auf Apoptose-unabhängige Regulationen der Zelle gerichtet. Im Vorfeld wurde mittels Durchflusszytometrie sichergestellt, dass der Anteil an toten oder absterbenden Zellen sehr gering ist (Abb. 2-3). Im Vergleich zur Studie von Nakagawa und Kollegen wurden die Apoptose-assoziierten Gene der Caspasen 6, 9 und 14 nicht erhöht exprimiert (Nakagawa *et al.* 2004). Durch die Induktion weiterer Caspasen (wie 4 oder 10), die *S. pneumoniae*-unabhängige Regulation des „Apoptose Regulierung und Signalisierung“-Signalweges zum frühen Zeitpunkt sowie die verstärkte Adressierung des Zellzyklus in der PEA zum späten Infektionszeitpunkt kann ein beginnender Zelltod in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise war die Apoptose in den Zellen noch nicht soweit fortgeschritten, dass morphologische Änderungen der Zellen detektierbar waren, diese aber auf transkriptioneller Ebene bereits eingeleitet wurden. Die Immortalisierung der Zellen mittels SV-40 könnte hier ebenfalls die Genexpression beeinflussen haben. Die Induktion der Apoptose durch *S. pneumoniae* wurde in verschiedenen Studien belegt (Colino & Snapper 2003; Schmeck *et al.* 2004). Diese könnte z. B. durch das Pneumokokken-freigesetzte Pneumolysin induziert worden sein, welches Poren in den Zellmembranen der Wirtszellen bildet (Alhamdi *et al.* 2015). Aufgrund des morphologischen Zustandes der Zellen kann jedoch ein infektionsbedingtes, nicht-apoptotisches Expressionsprofil in der vorliegenden Arbeit postuliert werden.

Durch die Analyse der adressierten Signalwege zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen exklusiver TLR-Aktivierung und *S. pneumoniae*-Infektion auf. Während LP-stimulierte Zellen nach frühen wie nach späten Zeitpunkten die gleichen Signalwege regulierten, veränderte die

S. pneumoniae-Infektion zum späteren Zeitpunkt des Experimentes verstärkt die Genexpressionen von Faktoren des Zellzyklus (Tabelle 2-1). Eine Möglichkeit wäre, dass der Zellzyklus zugunsten der Bekämpfung der Infektion in den Fokus rückt. Eine Studie zu bakteriellen Infektion von *Drosophila* zeigte ebenfalls vermehrt regulierte Gene des Zellzyklus zu späten Zeitpunkten auf (Buchon *et al.* 2009). Die Autoren vermuten verstärkt exprimierte Reparaturmechanismen zur Beseitigung infektionsbedingter Zellschäden. Solche Beeinflussungen des Wirtszellzyklus durch Toxine wurden bei verschiedenen Bakterien beschrieben (Oswald *et al.* 2005). DNA Doppelstrangbrüche und möglicher Zellzyklusarrest wurden ebenfalls mit dem Pneumolysin der Pneumokokken beobachtet (Rai *et al.* 2016), welches die verstärkte Adressierung von Zellzyklus-Signalwegen begründen würde.

Die in dieser Arbeit untersuchten mRNAs von IL-6, SOD2 und CXCL2 waren wie erwartet induziert und fungierten als Bestätigung der inflammatorischen Antwort im *Microarray*-Datensatz. Diese mRNAs wurden in der Studie von Aprianto und Kollegen nicht analysiert (Aprianto *et al.* 2016). Doch finden sich in deren Daten Gemeinsamkeiten mit den *Microarray*-Daten der vorliegenden Arbeit. Dementsprechend wurde in beiden Studien zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Induktion der *thioredoxin reductase 1* (TXNRD1) bzw. eine Verminderung des *dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1* (DKK1) beobachtet. Jedoch zeigten beiden Studien auch gegensätzliche Regulationen, wie für *isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic* (IDH1) und *nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1* (NOLC1). Diese Gegensätze könnten mit den untersuchten Zeitpunkten und MOIs im Sinne einer Expressionskinetik zusammenhängen oder auf die verschiedenen Zellen (BEAS-2B Zellen bzw. A549 Zellen) zurückzuführen sein. Weiterhin untersuchten Aprianto und Kollegen die Gene mit antioxidanter Funktion, welche die Zellen vor Pneumokokken-produzierten, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützen und verstärkt exprimiert waren (Aprianto *et al.* 2016). Während *glutathione peroxidase 2* (GPX2) per Definition in den *Microarray*-Daten nicht exprimiert wurde, konnte für *glutathione-disulfide reductase* (GSR) eine erhöhte Expression zum späteren Zeitpunkt der *S. pneumoniae*-Infektion detektiert werden. Da keine Expressionsänderung nach LP-Stimulation vorlag, könnte dies auf die Produktion und Freisetzung von H₂O₂ durch die Pneumokokken und den dadurch ausgelösten oxidativen Stress auf die Zellen zurückzuführen sein. Für den zeitlichen Unterschied könnten wiederum die Zellen, kinetische Abhängigkeiten oder die verwendeten MOIs ursächlich sein.

Weiterhin wurden durch die *Microarray*-Analyse die Expressionen einiger nicht-kodierender RNAs ermittelt. Es wurden 120 lange nicht-kodierende RNAs (linc/lncRNAs) als signifikant reguliert detektiert. Kürzlich wurde in einer Studie ein Zusammenhang zwischen der linc-RNA

AC011288.2 und Pneumokokken-induzierter Bakteriämie postuliert (Rautanen *et al.* 2016). Die Autoren beobachteten eine erhöhte Anfälligkeit für eine bakterielle Sepsis beim Vorkommen dieser RNA. Die Hintergründe dessen sind noch nicht vollständig geklärt, könnten jedoch auf die exklusive Expression dieser linc-RNA in Neutrophilen und dadurch bedingte Beeinflussung der Bekämpfung der Bakterien zurückzuführen sein. Diese langen nicht-kodierenden RNAs wurden im Rahmen dieser Arbeit funktionell nicht näher untersucht, sollten aber Gegenstand künftiger Studien sein. Da die Regulation von linc/linc-RNAs nach Infektion mit *S. pneumoniae* ein noch immer sehr wenig beleuchtetes Forschungsfeld ist, würden diese Analysen einen weiteren und wichtigen neuen Einblick in die Pathogenese der Pneumokokken geben.

3.2.2 Infektion mit *S. pneumoniae* führt zu wenigen Änderungen des Protein-Expressionsprofils

Das Proteinprofil wurde durch SILAC und nanoLC/MS-MS ermittelt. Diese Methode ist zuverlässig, robust und hat den Vorteil, dass eine vergleichsweise große Anzahl an Proteinen analysiert werden kann (Mann 2006). Der Fokus dieser Untersuchung in dieser Arbeit lag auf der Analyse intrazellulärer Proteine; sekretierte Moleküle wurden nicht untersucht. Der Vorzug von SILAC liegt darin, dass die markierten Isotope vor der Aufbereitung der Proben hinzugegeben werden, wodurch Einflüsse durch Unterschiede in der Bearbeitung der Proben reduziert werden (Gruhler & Kratchmarova 2008). Des Weiteren wird die Identifikation von Proteinen durch den definierten Massenunterschied erleichtert (Mann 2006). Eine Einschränkung dieser Methode ist lediglich, dass in manchen Zellsystemen Transformationen von Arginin zu Prolin erfolgen können, wodurch Fehl-Annotationen möglich sind (Mann 2006).

Der Abgleich zwischen den wenigen signifikant regulierten Proteinen, welche in dieser Arbeit identifiziert wurden, mit den *Microarray*-Daten ergab häufig gleichgerichtete Regulationen. Dabei konnten z. B. für das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM1), SOD2 und NAMPT sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erhöhte Expressionen zu beiden analysierten Zeitpunkten beobachtet werden. Ferner wurden mehrere Proteine identifiziert, welche eine Proteinregulation, jedoch keine RNA-Regulation aufwiesen. Dies traf für Proteine wie *small ubiquitin-like modifier 2* (SUMO2) oder *ring finger protein 213* (RNF213) zu. Diese Unterschiede können mit Expressions-Kinetiken oder translationelle Regulationen erklärt werden, wodurch eine Veränderung der Proteinexpression detektierbar wäre, aber die mRNA nicht mehr verstärkt exprimiert würde. Außerdem wurden in dem Proteinprofil Kandidaten identifiziert, welche laut den *Microarray*-Daten nicht in BEAS-2B Zellen exprimiert waren. Hierzu zählen z.

B. *family with sequence similarity 98 member B* (FAM98B) oder *integrin subunit alpha 2* (ITGA2), dessen Proteine erhöht exprimiert waren. Dies könnte mit Limitierungen der *Microarray*-Analyse zusammenhängen, welche eine Überschreitung eines Schwellenwertes erfordert. Eine exakte Korrelation zwischen der RNA-Expression und der Protein-Expression sind selten gegeben. Dabei spielen Faktoren wie die Translationsrate oder die Halbwertszeit der Proteine in die Analyse eine wichtige Rolle (Maier *et al.* 2009). Ein weiterer Unterschied in dieser Untersuchung waren die verwendeten Medien. Aufgrund der SILAC-Messmethode sollten Beeinflussungen durch das BEG-Medium vermieden werden. Folglich sind Unterschiede bei RNA- oder Proteinexpression bedingt durch die Nährmedien ebenfalls nicht auszuschließen. Da die hier erfolgten Analysen auf Grundlage von Regulationen aus zwei von drei biologischen Replikaten erfolgten, wäre die Erhöhung der Replikate entscheidend, um eine bessere Aussage über veränderte Protein-Expressionen zu treffen. Ferner könnten dadurch weitere schwach exprimierte Proteine als signifikant reguliert identifiziert werden.

Da nur eine geringe Anzahl signifikant veränderter Proteine identifiziert wurde, ist die Interpretationsmöglichkeit der hier durchgeführten PEA limitiert. Nichtsdestotrotz ermöglichte der Vergleich zu den mRNA-Expressionsdaten eine hypothesengetriebene Fokussierung auf den Nicotinamidmetabolismus. Das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges, NAMPT, wurde zuvor durch frühere Studien mit Erkrankungen und Infektionen in Verbindung gebracht (Garten *et al.* 2009; Imai 2009). In dieser Arbeit wurde NAMPT durch die LP-Stimulation und die *S. pneumoniae*-Infektion induziert und wird in Abschnitt 3.4 ausführlicher diskutiert.

3.2.3 *S. pneumoniae*-spezifisches miRNA-Profil mit vielen hoch-nummerierten miRNAs zum späten Infektionszeitpunkt

Im miRNA-Profil der BEAS-2B Zellen zeigten sich durch die PCA und die *heatmaps*, analog zu den mRNA-Daten, Gruppierungen nach Behandlung oder Zeitpunkt (Abb. 2-9). Hier konnten 92% der signifikant regulierten miRNAs einem spezifischen (LP oder *S. pneumoniae*) oder dem TLR2-abhängigen (LP und *S. pneumoniae*) Expressionsmuster zugeordnet werden. Durch die Infektion mit *S. pneumoniae* werden neben dem TLR2 weitere Rezeptoren der humanen Zelle angesprochen, wie *nucleotide binding oligomerization domain containing 2* (NOD2) durch Peptidoglykan, TLR4 und *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3) durch Pneumolysin oder *absent in melanoma 2* (AIM2) und TLR9 durch die DNA der Bakterien (Koppe *et al.* 2012). Ebenso wird der Typ I Interferon Signalweg durch das Pneumolysin und die DNA der Pneumokokken aktiviert (Parker *et al.* 2011). Diese und weitere Rezeptoren wurden durch

verschiedene Studien mit unterschiedlichen Infektionen und Veränderungen im miRNA-Profil des Wirtes in Verbindung gebracht. Die TLR4-vermittelten Induktionen der miRNA-146, miRNA-132 und miRNA-155 wurde nach LPS-Stimulation gezeigt (Taganov *et al.* 2006a). Die miRNA-146, welche bereits mit *S. pneumoniae*-Infektionen assoziiert wurde (Griss *et al.* 2016), wurde in der vorliegenden Studie stark exprimiert und kann als eine miRNA-Positivkontrolle für die Reaktion der Zellen angesehen werden. Konkreter wurden TLR-vermittelte miRNA-Expressionsänderungen durch Park und Kollegen, welche die Induktion der miRNA-132 durch die Aktivierung von TLR2 und -4 in *Porphyromonas gingivalis*-Infektionen beobachteten, aufgezeigt (Park *et al.* 2016b). Ein weiterer Zusammenhang zwischen der Induktion der miRNA-155 über den NOD2-Signalweg und einer Salmonellen-Infektionen konnte ebenfalls hergestellt werden (Schulte *et al.* 2013).

In dem erstellten miRNA-Profil fiel die große Anzahl an miRNAs mit hohen Bezifferungen auf. Diese bilden 52% der Pneumokokken-spezifischen miRNAs, während dieser Anteil in der LP-spezifischen (31%) und TLR2-abhängigen (LP und *S. pneumoniae*) Gruppe (12%) deutlich geringer war. Diese weniger erforschten miRNAs können zum besseren Verständnis der Pathogen-Wirts-Interaktion zwischen Pneumokokken und Epithelzelle beitragen. Eine verminderte Expression der miRNA-4455 wurde kürzlich nach viralen Infektionen beobachtet (Zhu *et al.* 2016). Interessanterweise listet diese Studie weitere vierstellige miRNAs auf, welche ebenfalls in der vorliegenden Studie identifiziert wurden (z. B. miRNA-4516, miRNA-4497 oder miRNA-4443). Dies könnte auf einen unspezifischen, infektionsbedingten Zusammenhang hindeuten. Mit Bestätigung dieser miRNAs und Untersuchung derer Ziel-mRNAs könnten mögliche neue Therapieansätze offenbart werden. Diese Aufteilung der Expressionsmuster liefert nur eine erste Einschätzung zu putativ spezifischen Regulationen. Demgemäß können miRNAs z. B. aus dem LP-spezifischen Muster ebenfalls stark durch *S. pneumoniae* induziert werden. Als *S. pneumoniae*-spezifische miRNAs wurden die induzierte miRNA-3135b, welche in Abschnitt 3.3 näher betrachtet wird, und miRNA-4521 genauer untersucht. Die miRNA-4521, welche nach *S. pneumoniae*-Infektion vermindert exprimiert war, wurde nach *Schistosoma japonicum*-Infektion mit einhergehender Leberfibrose als erhöht exprimiert identifiziert (Cabantous *et al.* 2017). Damit deutet sich eine infektionsabhängige Regulation an, welche nicht auf ein Pathogen, eine bestimmte Pathogengruppe oder auf ein bestimmtes Organ begrenzt ist.

Bei diesen in der vorliegenden Studie häufig identifizierten vierstelligen miRNAs ist zu beachten, dass die Annotation dieser Sequenzen nicht immer eindeutig abgeschlossen ist. Somit könnten einige der hier aufgeführten, vermeintlichen miRNAs tatsächlich anderen RNA-

Gruppen wie bspw. tRNA-derivierte RNAs (tRFs) angehören. Diese etwa 20 Nukleotide langen RNA-Fragmente stellen eine relativ neue Klasse kleiner nicht-kodierender RNAs dar und werden aus prä- oder reifen tRNAs generiert (Venkatesh *et al.* 2016). Je nach Herkunft werden tRFs in verschiedene Klassen unterteilt. Die tRF-5 bzw. tRF-3 – Gruppen werden vom 5'- bzw. 3'-Ende der reifen tRNA abgeleitet; die tRF-1 – Gruppe dagegen vom 3'-Ende der prä-tRNA prozessiert (Soares & Santos 2017). Die sogenannten tRF-Hälften werden nahe des Anticodons (Lee & Collins 2005) und endogene tRFs nahe interner Domänen reifer tRNAs gebildet (Goodarzi *et al.* 2015). Dabei werden nicht von allen tRNAs tRFs gebildet. Ferner wurden zell- und gewebespezifische Expressionen sowie verschiedene Lokalisationen in der Zelle nachgewiesen (Kumar *et al.* 2014). Die Generierung von tRFs soll, ähnlich wie bei miRNAs, Dicer-abhängig ablaufen (Shigematsu & Kirino 2015). Jedoch scheinen Mutationen in Dicer nicht zwangsläufig Auswirkungen auf die Bildung von tRFs zu haben (Kumar *et al.* 2014). Demzufolge liegt es nahe, dass unterschiedliche Biogenesewege existieren, welche zum Teil in Dicer-unabhängigen tRFs münden. Diese könnten ebenfalls zell- oder gewebespezifisch sein. Die Funktionen der tRFs sind noch nicht geklärt, jedoch deuten die Studien um Karaïskos an, dass miRNA-ähnliche Funktionen wie translationale Regulationen vorliegen (Karaïskos *et al.* 2015).

Neben einer Rolle in Krebserkrankungen (Dhahbi *et al.* 2014) wurden tRFs bisher mit viralen Infektionen in Verbindung gebracht (Wang *et al.* 2013b). Die Annahme, dass es sich bei der miRNA-3135b ebenfalls um ein tRF handelt, erscheint wegen der Identifikation von falsch-annotierten miRNAs möglich. Venkatesh und Kollegen listen bspw. die miRNA-4521 und die miRNA-4455 auf und identifizieren diese miRNAs als tRFs der Gruppe 1 (Venkatesh *et al.* 2016). Diese beiden miRNAs wurden mittels Sequenzierung in der vorliegenden Arbeit als durch die Infektion mit Pneumokokken bzw. durch die Stimulation mit LP reguliert identifiziert. Dies deutet auf eine Rolle von tRFs auch in bakteriellen Infektionen hin. Daher könnten einige der *S. pneumoniae*-spezifisch regulierten miRNAs, welche oftmals eine hohe Nomenklatur aufweisen, putative tRFs darstellen. In Datenbanken (wie tRFdb, <http://genome.bioch.virginia.edu/trfdb/index.php>) wurde die Sequenz der miRNA-3135b keinem bisher bekannten tRF zugeordnet (Kumar *et al.* 2015b). Jedoch sind die Datenbanken zu dieser neuen RNA-Klasse noch weit von ihrer Vollständigkeit entfernt. Die Bestätigung der Annotation sowie mögliche regulatorische Funktionen im Hinblick auf eine Pneumokokken-Infektion der hier identifizierten, putativen tRFs bleiben zu untersuchen.

3.2.4 Verknüpfung der Datensätze ergibt nur wenige Interaktionen

Für die Verknüpfung der miRNA-Daten mit den mRNA-Daten dieser Arbeit wurde vorausgesetzt, dass die Ziel-mRNA antagonistisch zur miRNA reguliert war. Diese bioinformatische Analyse ergab nur wenige Interaktionen. Dies könnte einerseits mit, wie oben beschrieben, fehl-klassifizierten miRNAs zusammenhängen, welche nicht durch die Algorithmen erfasst werden. Ferner ist die bioinformatische Vorhersage von Ziel-mRNAs nicht fehlerfrei, da Datenbanken (wie www.targetscan.org/vert_71/) in der untranslatierten Region des 3'-Endes (3'UTR) der mRNA nach Bindestellen für miRNAs suchen. Mögliche Bindestellen in der 5'UTR oder im protein-kodierenden Abschnitt der Sequenz werden nicht berücksichtigt (Thomson *et al.* 2011). Ferner sind falsch vorhergesagte Ziel-mRNAs möglich. Es wird geschätzt, dass die Falschpositivrate bei bis zu 50% liegt (Cloonan 2015). Mit verbesserten Algorithmen könnten neue miRNA-mRNA-Interaktionen identifiziert werden, welche möglicherweise spezifische Regulationen für eine Pneumokokken-Infektion aufzeigen könnten.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung der Ziel-mRNAs von miRNA stellt die Untersuchung der Proteinexpressionen dar. Es wurde gezeigt, dass von den Proteinen, welche durch die miRNA-193b beeinflusst wurden, nur 13% auf mRNA-Ebene dereguliert waren (Leivonen *et al.* 2011). Ebenfalls wären post-translationale Veränderungen durch Analyse des Proteoms erkennbar, welche durch genomische Untersuchungen nicht detektierbar wären. Jedoch könnten miRNA-bedingte Einflüsse auf die Regulation von Proteinen mit langer Halbwertszeit durch Messungen wie SILAC nicht erfasst werden (Li *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit waren zwar nur wenige Proteine als reguliert identifiziert worden, jedoch könnte der Abgleich zwischen miRNA- und Protein-Expressionen neue regulatorische Muster aufzeigen.

3.3 Die Expression der miRNA-3135b hemmt die Replikation von *S. pneumoniae*

In der miRNA-Profil-Analyse wurde die miRNA-3135b exklusiv als durch die *S. pneumoniae*-Infektion induziert identifiziert. Veränderungen von miRNA-Expressionen können entweder durch das Pathogen induziert und damit vorteilhaft für den Erreger sein, oder im Zusammenhang mit Abwehrmechanismen und Warnsignalen des Wirtes stehen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die miRNA-3135b hemmend auf die Replikation von *S. pneumoniae* wirkt. Dies spricht für eine Rolle diese miRNA in der Infektionsabwehr des Wirtes.

3.3.1 miRNAs als pro- und anti-infektiöse Faktoren

Für Pathogene vorteilhafte miRNA-Regulationen zeigten die verminderten Expressionen der miRNA-24 und der miRNA-93, welche zu einem Anstieg der Replikation des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) führten (Otsuka *et al.* 2007). Weiterhin wurde deutlich, dass eine verstärkte Anfälligkeit für VSV in Dicer1-defizienten Mäusen vorlag, welche durch die veränderten miRNA-24 und miRNA-93 Expressionen bedingt wurde. Andere Studien beschrieben effizientere virale Replikationen durch miRNAs in Infektionen mit dem Hepatitis C Virus, durch die miRNA-122, oder dem HI-Virus-1, durch Suppression der miRNA-17/92-Gruppe (Chang *et al.* 2008; Triboulet *et al.* 2007). Des Weiteren können auch Bakterien durch miRNAs positiv beeinflusst werden. Die miRNA-146a führt zu einer verminderten, durch Mykobakterien verursachten Immunantwort und unterstützt dadurch die bakterielle Replikation durch Beeinflussung von *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK-1) und *TNF receptor associated factor 6* (TRAF-6) (Li *et al.* 2013). Ferner wurde eine verminderte Expression der miRNA-15 nach Salmonellen-Infektion ermittelt, wodurch die bakterielle Replikation in den hier untersuchten HeLa-Zellen unterstützt wurde (Maudet *et al.* 2014). Ein weiteres Beispiel stellt die miRNA let-7f dar, welche durch die Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* vermindert exprimiert wird (Kumar *et al.* 2015a). Dies führt zur verstärkten Expression von A20, einem NF- κ B Inhibitor, wodurch die Bakterien in der Wirtszelle besser überleben können.

Weiterhin können miRNAs als Teil eines Defensivmechanismus der Wirtszellen gegen einen Erreger genutzt werden. Wenn Wirts-miRNAs in der Pathogen-Abwehr eingebunden werden, kann dies zu verminderten Replikationen des Erregers führen. In dieser Arbeit wurde eine signifikant verminderte Replikation von *S. pneumoniae* durch eine Überexpression der miRNA-3135b gezeigt. In der Literatur finden sich miRNA-vermittelte Reduktionen der Pathogen-Vermehrung z. B. bei der Replikation von H1N1 Influenza A Viren (A/WSN/33) in MDCK Zellen, welche aufgrund der Bindung verschiedener miRNAs (miRNA-323, miRNA-491 und miRNA-654) an das virale PB1-Gen inhibiert ist (Song *et al.* 2010). Interessanterweise führte eine Kombination dieser miRNAs zu keinem gesteigerten Effekt im Vergleich zur Einzelbehandlung. Weitere Studien zeigten suppressive Eigenschaften von miRNAs auf die Replikation des Hepatitis B Virus und des PRRS (Reproduktions- und Atemwegssyndrom der Schweine)-Virus (Guo *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2010a). Studien zur inhibitorischen Wirkung einer miRNA auf die Replikation von Bakterien hingegen sind seltener. Eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* führte zur verminderten Expression der miRNA-29 in natürlichen Killerzellen (Ma *et al.* 2011). Dies bewirkte eine gesteigerte Expression von IFN- γ , wodurch die Infektion verstärkt bekämpft wurde. Ferner wurde das intrazelluläre Überleben des Bakteriums *Brucella abortus* durch die

Expression der miRNA-125b und der Regulation des NF- κ B-Inhibitors A20 beeinflusst (Liu *et al.* 2016a). Eine weitere Studie zeigte zweiseitige Effekte der miRNA-155 in *M. tuberculosis*-Infektionen auf (Rothchild *et al.* 2016). Einerseits unterstützte die miRNA-155 das Überleben von *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagen und bildete dadurch eine verbesserte Nische für die bakterielle Replikation. Andererseits förderte diese miRNA das Überleben und die Funktion von *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen, was zu einer verbesserten Immunantwort führte. Diese Studie zeigte auf, dass eine miRNA vielfältige Auswirkungen haben kann und mögliche Nebeneffekte einer miRNA ebenso untersucht werden müssen. Dies gilt ebenfalls, wenn vornehmlich positive, anti-infektiöse Effekte, wie eine verminderte Replikation, festgestellt werden und trifft auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit zu.

In dem hier untersuchten Zeitrahmen wurde keine Abnahme der Vitalität der humanen Zellen durch die Überexpression der miRNA-3135b festgestellt, jedoch können langfristige Folgen nicht ausgeschlossen werden und bedürfen weiteren Untersuchungen. Weiterhin könnte untersucht werden, ob und wie ein Einfluss dieser miRNA auf weitere Pathogene vorliegt. Da der Mechanismus, welcher putativ für die verminderte Replikation von *S. pneumoniae* verantwortlich ist, bisher nicht bekannt ist, könnten Auswirkungen auf andere Erreger wie z. B. IAV oder *Mycoplasma pneumoniae* vorliegen. Durch die Verminderung der Pneumokokken-Last könnte z. B. die Besiedelung anderer Pathogene begünstigt werden. Damit wären möglicherweise positive Effekte durch diese miRNA in einer Koinfektion geringer oder gar nicht mehr vorhanden. Generell weisen Epithelzellen nur wenige Mechanismen zur Abwehr von Pathogenen auf. Hauptsächlich reagieren sie auf Infektionen, indem sie mittels Chemokinen wie CCL2 oder MIP-1 α dendritische Zellen oder Neutrophile rekrutieren, welche dann aktiv gegen eine Infektion vorgehen (Auray *et al.* 2007; Ohtsuka *et al.* 2001). Jedoch besitzen Epithelzellen mit antimikrobiellen Peptiden (AMPs) einen eigenständigen Abwehrmechanismus (Rivas-Santiago *et al.* 2005). Daher ist denkbar, dass die vermehrte Expression der miRNA-3135b eine in den Zellen gewöhnlich aktive Hemmung der AMP-Synthese blockiert und dadurch zu verstärkten antibakteriellen Effekten führt. Darüberhinaus könnte ein AMP sogar in bakteriell-viralen Koinfektionen gegen beide Erregertypen wirksam sein (Pinkenburg *et al.* 2016). Dies bedarf weiterer Untersuchungen

3.3.2 Die miRNA-3135b im klinischen Kontext

Durch den beobachteten Effekt der verminderten *S. pneumoniae*-Last durch die Überexpression der miRNA-3135b stellt sich die Frage nach einer möglichen therapeutischen

Verwendung dieser miRNA. Bisher wurde die miRNA-3135b mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Jedoch findet man in der Literatur nur wenige Studien, welche Auskunft über eine putative Funktion der miRNA-3135b geben. Die Möglichkeit als zirkulierende miRNA und vermeintlicher Biomarker zu fungieren, wurde in verschiedenen Studien postuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression der miRNA-3135b in diversen Herzerkrankungen wie Herzfehlern, Kardiomyopathien oder Verkalkungen der Koronararterie erhöht ist (Chen *et al.* 2017; Liu *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017a; Wang *et al.* 2017c). Eine Erweiterung dieser Studien im Hinblick auf organische Erkrankungen könnte eine weitreichende Regulation der miRNA-3135b bestätigen und nähere Hinweise auf deren Funktion liefern. Ferner wurde von Peng und Kollegen in einer kürzlich veröffentlichten Studie die miRNA-3135b erstmals mit einer Infektion in Verbindung gebracht (Peng *et al.* 2017). Sie untersuchten das Serum von Influenza-Patienten und detektierten die miRNA-3135b als signifikant erhöht exprimiert nach H7N9-Infektion. In dieser Studie wurde ein aviärer IAV-Strang verwendet, welcher pandemisches Potential besitzt. Zur weiteren Analyse der miRNA-3135b im Infektionskontext wäre ein Vergleich zwischen verschiedenen Influenza-Viren sowie anderen Pathogenen interessant. Weiterhin können Influenzainfektionen oftmals durch bakterielle Koinfektionen verkompliziert werden (Michelow *et al.* 2004). Da bei dieser Studie nicht bekannt ist, ob die untersuchten Patienten an einer bakteriellen Superinfektion litten oder gelitten haben, welche möglicherweise einen Einfluss auf das miRNA Profil und zur Induktion der miRNA-3135b geführt haben könnte, kann ein Einfluss durch einen zweiten Erreger nicht ausgeschlossen werden.

All diese Studien zeigen, dass die miRNA-3135b als zirkulierende miRNA im Menschen vorkommt, sowohl in Infektionen als auch bei verschiedenen Herzerkrankungen. Wie gut sich die miRNA-3135b bei solch diversen Krankheitsbildern dann allerdings als Biomarker eignet, muss noch weiter untersucht werden. Weiterhin kann die Frage, ob die miRNA-3135b als zirkulierende miRNA nach Infektion mit *S. pneumoniae* vorkommt, zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Auskunft darüber könnten Untersuchungen verschiedener Patientenkohorten in Biobanking Datenbanken wie *German Biobank Alliance* (GBA) oder Forschungsnetzwerken wie das Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie (CAPNETZ) geben. Diese Analysen würden das Wissen über das Vorkommen der miRNA-3135b bei verschiedenen Erkrankungen oder Infektionen z. B. in der Lunge erweitern. Die potentiellen Funktionen von zirkulierenden und extrazellulären miRNAs sind noch weitgehend ungeklärt, konnten jedoch unter anderem mit Zell-Zell-Kommunikation in Verbindung gebracht werden (Zhang *et al.* 2010b).

3.3.3 Netzwerk liefert vielversprechende Ziel-mRNAs für die miRNA-3135b

Ob es sich bei der miRNA-3135b tatsächlich um eine miRNA handelt oder ob diese fehl-annotiert wurde, wie unter 3.2.3 diskutiert, muss noch untersucht werden. Die miRNA-3135b wird in vielen Datenbanken wie targetscan (http://www.targetscan.org/vert_71/, Version 7.1) oder miRbase (<http://www.mirbase.org/>, Version 21) gelistet, jedoch deuten diese ebenfalls auf die nicht vollständig geklärte Klassifizierung hin. Laut der Datenbank ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>; Version 91) ist die Sequenz der miRNA-3135b auf Chromosom 6 zwischen den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II Genen DQA2 und DQB2 lokalisiert (Zerbino *et al.* 2018). Während DQB2 per Definition durch die *Microarray*-Daten als nicht in BEAS-2B Zellen exprimiert gefunden wurde, wurde das DQA2 Gen nicht mittels *Microarray* erfasst. Zur vollständigen Klassifizierung sollte zunächst der Biogeneseweg der miRNA-3135b geklärt werden, um zu bestimmen, ob diese kurze, nicht-kodierende RNA eine echte miRNA ist oder eine anderen Klasse wie siRNAs, welche Drosha-unabhängig prozessiert werden (Ha & Kim 2014), oder tRFs (siehe 3.2.3) zugeordnet werden muss.

Die RNA-Sequenzierung nach Überexpression der miRNA-3135b lieferte putative Ziel-mRNAs, welche für die Reduktion der Pneumokokken-Last ursächlich sein könnten. Diese möglichen Ziel-mRNAs wurden daraufhin in einem regulatorischen Netzwerk zusammengefasst. In diesem Netzwerk wurden regulatorische Gruppen zur Zellmorphologie, *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen Signalwegen und zur Genexpression durch Elongations- und Transkriptionsfaktoren identifiziert (Abb. 2-14).

In der Gruppe der Zellmorphologie zeigten sich verschiedene Kandidaten, bei denen mindestens eine Bindestelle für die miRNA-3135b vorhergesagt wurde. Zu diesen zählen z. B. Talin 1 (TLN1), welches wichtig für das Zytoskelett ist. Talin 1 wurde in den *Microarray*-Analysen nicht reguliert, wurde jedoch mit bakteriellen Infektionen in Verbindung gebracht (Truttmann *et al.* 2011). Hier ist TLN1 bei der Infiltration des Bakterium *Bartonella henselae* in die Wirtszelle beteiligt. Die MAP-Kinase MAP2K3 besitzt ebenfalls vorhergesagte Bindestellen für die miRNA-3135b. Die MAP-Kinasen wurden in *S. pneumoniae*-Infektionen nachgewiesen, wo diese TNF- α -stabilisierend wirkten (Mogensen *et al.* 2008). Außerdem wurde in einer MAP2K3-*knockout* Mausmutante gezeigt, dass dieser Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle beim Schutz gegen das Pneumokokken-Pneumolysin spielt (Lim *et al.* 2007). Die Regulationen, welche im *Microarray* ermittelt wurden, zeigte eine erhöhte Expression nach LP-Behandlung und zu den späten Infektionszeitpunkten. In der von Mogensen *et al.* durchgeführten Studie

wurden spätere Zeitpunkte von 18 h betrachtet, wodurch die Ergebnisse dieser Studie gestützt werden (Mogensen *et al.* 2008).

Die Gruppe der Regulation der Genexpression durch Elongations- und Transkriptionsfaktoren beinhaltet die meisten Kandidaten des erstellten Netzwerkes. Für den *E74 Like ETS Transcription Factor 4* (ELF4) wurden drei Bindestellen für die miRNA-3135b vorhergesagt und eine Tendenz der verminderten Expression im *Microarray* ermittelt. ELF4 steht in Verbindung mit der Aktivierung verschiedener Gene der Immunabwehr (Suico *et al.* 2017), speziell gegen virale Infektionen (You *et al.* 2013). Doch während ELF4 durch eine virale Infektion induziert wird, scheint es eher vermindert nach Pneumokokken-Infektion vorzuliegen. Der Transkriptionsfaktor Elongin A (ELOA), auch *Transcription Elongation Factor B (SIII)*, *Polypeptide 3 (110kDa, Elongin A)* (TCEB3) genannt, wurde in den späteren Zeitpunkten durch die Pneumokokken-Infektion gering reduziert exprimiert. ELOA besitzt eine vorhergesagte miRNA-3135b Bindestelle, aktiviert die RNA Polymerase II und spielt eine Rolle bei der Regulation von Stress-induzierten Genen (Kawauchi *et al.* 2013).

Neben diesen und weiteren Kandidaten, welche wichtig bei der Reduzierung der Pneumokokken-KbE sein könnten, wurden ebenfalls Kandidaten mit unbekannter Funktion wie *chromosome 1 open reading frame 131* (C1orf131) identifiziert, welcher ebenfalls eine vorhergesagte Bindestelle besitzt. C1orf131 wurde in den *Microarray*-Daten durch die *S. pneumoniae*-Infektion vermindert exprimiert, während es keine veränderte Expression nach LP-Stimulation gab. Damit stellt C1orf131 einen vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen dar, um den Mechanismus, durch welchen die Pneumokokkenlast reduziert wurde, zu ergründen.

Außerhalb des erstellten Netzwerkes finden sich weitere interessante Kandidaten, welche eine oder mehrere Bindestellen für die miRNA-3135b aufweisen. Die mRNAs von *DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C30* (DNAJC30) und *Family With Sequence Similarity 222 Member B* (FAM222B) wurden zum späteren Zeitpunkt durch die Infektion vermindert exprimiert, während keine Expressionsänderung durch LP vorlag. Zur Funktion von DNAJC30 ist bisher wenig bekannt. FAM222B ist mit zerebraler, kaverner Malformation (*cerebral cavernous malformations*, CCMs) in Verbindung gebracht worden, welches sich jedoch nicht bestätigte, sodass über die Funktion von FAM222B bisher noch nichts bekannt ist (Spiegler *et al.* 2016).

Der Mechanismus, durch welchen die BEAS-2B Zellen die Pneumokokkenlast reduzieren können, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Doch vor allem diese

Kandidaten, welche miRNA-3135b Bindestellen aufweisen und keine in der Literatur beschriebene Funktion zugewiesen bekommen haben, stellen aussichtsreiche Kandidaten für weitere Untersuchungen dar. Zur Bestätigung eines möglichen Zusammenhangs dieser Kandidaten mit der miRNA-3135b und der Abnahme der *S. pneumoniae*-KbE sollten weitere Analysen erfolgen.

3.3.4 Die miRNA-3135b als neues therapeutisches Ziel

MicroRNAs spielen eine essentielle Rolle in vielen Erkrankungen und Infektionen. Entsprechend wurden miRNAs als potentielle Angriffspunkte für Therapeutika erforscht. Zhang und Kollegen untersuchten die miRNA-128, welche in *Salmonella enterica* Infektionen vermehrt exprimiert wird und positive Auswirkungen auf das Überleben der Bakterien hat (Zhang *et al.* 2014b). Sie konnten zeigen, dass die Verabreichung einer anti-miRNA-128 diesen Effekt umkehrt und zu einer verminderten *S. enterica*-Last führt. In einer anderen Studie wurde die Expression der miRNA-328-3p in den Lungen von *Haemophilus influenzae*-infizierten Mäusen vermindert, wodurch die Phagozytose und das Abtöten der Bakterien unterstützt wurde (Tay *et al.* 2015). Eine weitere Verminderung dieser Expression durch das Verabreichen einer Antagomir, einem Oligonukleotid, welches die Funktion einer miRNA unterbindet, führte zu einem verbesserten Abtöten der Bakterien in den Mäusen. Somit könnte eine artifizielle Erhöhung der miRNA-3135b Menge *in vivo* zu einer Verminderung der Pneumokokkenlast führen. Dies könnte in den zuvor unter 3.1 diskutierten, verbesserten *ex vivo* Modellen untersucht werden und würde die Reduktion der *S. pneumoniae*-Replikation möglicherweise in einem komplexen, realitätsnäherem Modell als der Zellkultur bestätigen. Dadurch würde die Möglichkeit, diese miRNA als Therapeutikum zu verwenden, unterstützt werden.

Inzwischen gibt es erste Studien, um solche Beeinflussungen von miRNAs in Patienten zu nutzen. Ein Inhibitor der miRNA-122 namens Miravirsin wurde gut von Patienten mit HCV-Infektionen vertragen (van der Ree *et al.* 2014). Dies zeigt, dass die Ansätze und Anwendungsmöglichkeiten durch Beeinflussung bestätigter miRNAs in Erkrankungen vorhanden sind und putativ vielversprechende neue Behandlungsstrategien darstellen. Jedoch besitzt eine miRNA die Möglichkeit, verschiedene mRNAs zu adressieren (Krek *et al.* 2005). Die Datenbank targetscan (Version 7.1) listet 6.087 Transkripte mit mindestens einer miRNA-3135b-Bindestelle auf. Dadurch sind Nebeneffekte bei einer miRNA-Therapie nicht unwahrscheinlich. Aufgrund einer erhöhten Spezifität bieten Therapien mit siRNAs gegen eine spezifische Ziel-mRNA der miRNA einen Vorteil zu miRNA-Therapien, wie schon bei

verschiedenen Erkrankungen des Gehirns angewendet (Zheng *et al.* 2018). Die therapeutische Nutzung von siRNAs wurde auch bei Infektionen in Betracht gezogen. Studien mit dem HI- oder dem Ebola-Virus zeigten vielversprechende Ergebnisse durch siRNA-Behandlung bei schwer oder nicht therapierbaren Infektionen (Swamy *et al.* 2016; Thi *et al.* 2015). Bisher wurden jedoch keine Studien zu bakteriellen Infektionen durchgeführt.

3.4 Der Nicotinamid-Stoffwechselweg beeinflusst die

Replikation von *S. pneumoniae*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der mRNA- und Protein-Expressionsprofile von Bronchialepithelzellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* zeigten veränderte Regulationen von Bestandteilen des Nicotinamid-Metabolismus auf (siehe auch Klappenbroschur hinten). Dabei wurde NAMPT, das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges, als wichtiger Faktor in Pneumokokken-Infektionen identifiziert.

3.4.1 Zusammenhänge zwischen Metabolismus und Erkrankungen

Interaktionen zwischen Metabolismus und inflammatorischen Reaktionen wurden bei chronischen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes und Atherosklerose beobachtet (Chawla *et al.* 2011; Olefsky & Glass 2010). Arbeitsgruppenintern wurde ein Zusammenhang zwischen Immunantwort und der Laktat-Dehydrogenase B (LDHB) in BEAS-2B Zellen hergestellt (Burkhard 2017). Vor einigen Jahren wurde der NAD-Metabolismus durch NAMPT und Sirtuine als verbindender Stoffwechselweg beim Wechsel zwischen frühen und späten akuten Entzündungsreaktionen genannt (Liu *et al.* 2012). Da für die Bekämpfung von Entzündungen ebenso wie von Infektionen ein hoher Energieaufwand der Zellen nötig ist, ist eine Verbindung zwischen diesen beiden Prozessen des Wirtes sinnvoll. Der Zusammenhang zwischen NAMPT und inflammatorischen Reaktionen von Zellen wurde bereits früher beschrieben (Garten *et al.* 2009; Imai 2009). Zum Beispiel erhöht die Deletion des Gens des Membranproteins CD38, welches NAD als Kofaktor nutzt, die Anfälligkeit für Infektionen mit *S. pneumoniae* und *Mycobacterium avium* in Mäusen (Partida-Sanchez *et al.* 2001; Viegas *et al.* 2007). Diese Studien unterstreichen die Wichtigkeit des NAD-Metabolismus in weiteren Funktionen der Zelle wie der Immunabwehr.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bis zu 50%ige Reduktion der CXCL8-Sekretion nach *S. pneumoniae*-Infektion und NAMPT Depletion im Vergleich zur Infektion kontrolltransfizierter Zellen ermittelt (Abb. 2-20). CXCL8 fungiert als wichtiger Mediator für die Rekrutierung von

neutrophilen Granulozyten (Jose *et al.* 2015; Khair *et al.* 1996). Da keine verminderte CXCL8-Freisetzung in uninfizierten, NAMPT depletierten BEAS-2B Zellen detektiert wurde, könnte die verminderte *S. pneumoniae*-Last ursächlich für den Rückgang der CXCL8-Sekretion sein. Jedoch liegt der Rückgang der Bakterienlast bei bis zu 20%, während die CXCL8-Sekretion allerdings um bis zu 50% reduziert wird. Ferner erklärt dies nicht den Rückgang von CXCL8 nach Stimulation mit LP bzw. poly(I:C), Liganden für TLR2 bzw. TLR3. Damit wäre ein regulatorischer Einfluss wahrscheinlicher, durch welchen die TLR-vermittelte Immunantwort der Zelle zu einem gewissen Grad inhibiert wird. Möglicherweise könnte durch gezielte Prüfung von Komponenten des TLR-Signalweges die Ursache der verminderten CXCL8-Sekretion ermittelt werden. Studien verdeutlichten, dass die Inhibierung von NAMPT zur verminderten Sekretion von proinflammatorischen Molekülen wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 in Zellexperimenten wie auch in Mäusen führt (Busso *et al.* 2008; Roberts *et al.* 2013). Somit ist die Reduktion der CXCL8-Sekretion wahrscheinlich direkt mit der NAMPT Depletion zu begründen. Ob weitere Entzündungsmarker beeinflusst waren, wurde nicht untersucht. Die Ursache der hier beobachteten CXCL8-Reduktion könnte auf eine verminderte NAD-Versorgung der Zelle aufgrund des *knockdowns* zurückzuführen sein.

Eine verminderte Nährstoffversorgung könnte ebenfalls ursächlich für die eher diffusen mRNA-Expressionen der metabolischen Gene in den humanen Lungengewebestücken sein. Diese waren nicht mit den Ergebnissen der Zellkultur vergleichbar und zeigten die Limitierung dieses *ex vivo* Modells deutlich auf. Die reduzierte Expression von NNMT könnte dabei auf absterbenden Zellen des Gewebes zurückzuführen sein (Zhang *et al.* 2014a). Der Zusammenhang zwischen Versorgung und Überleben in *ex vivo* Geweben wurde gezeigt, als mit zunehmender Dicke des Gewebes eine Verminderung der Sauerstoffversorgung nachgewiesen wurde (Berndt 1976). Auch bei Geweben, welche zur Transplantation genutzt werden sollen, wird durch die Perfusion von z. B. *ex vivo* Lungen auf die Versorgung geachtet (Krueger *et al.* 2011; Steen *et al.* 2007). Aufgrund dieses Durchspülsystems werden die Funktion und die Qualität des Gewebes über einen längeren Zeitraum erhalten und teilweise sogar verbessert. Diese Studien zeigen, in Kombination mit den vorliegenden Ergebnissen, dass eine gesicherte Versorgung des *ex vivo* Gewebes zu einem Anstieg der Qualität und damit der Zellviabilität führt. Ist dies nicht in ausreichendem Maße der Fall, kann dieser Versorgungsmangel sich negativ auf die entsprechenden Analysen auswirken.

3.4.2 Wirtsveränderungen durch Pathogene

Pathogene müssen oftmals Nährstoffe vom Wirt beziehen. Diese Fähigkeit kann am Anfang der Besiedelung und bei der Ausbreitung entscheidend für das Pathogen sein (Brown *et al.* 2008). Außerdem kann dies einen essentiellen Vorteil gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen darstellen. Veränderungen des Wirtes durch ein Pathogen zu deren Gunsten wurden in der Literatur oft beschrieben. In einer bioinformatischen Studie wurde gezeigt, dass eine Reihe von Pathogenen mit Wirtsproteinen interagieren (Tekir *et al.* 2012). Bakterien haben verschiedene Möglichkeiten, Einfluss auf das genetische Programm des Wirtes zu nehmen. Sie können die Genexpression des Wirtes durch das Einbringen bakterieller DNA in das Wirtsgenom beeinflussen, wie für das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* gezeigt (Lacroix *et al.* 2006).

Veränderungen des Wirts-Metaboloms nach *S. pneumoniae*-Infektion wurden im Zusammenhang mit signifikanten Änderungen im Urin von Pneumokokken-infizierten Mäusen gezeigt (Slupsky *et al.* 2009). Humane Studien könnten ähnliche Ergebnisse liefern. Da es sich bei Metaboliten in Urin-Proben wahrscheinlich um extrazelluläre Substanzen handelt, wären einerseits Untersuchungen weiterer Körperflüssigkeiten interessant, ebenso wie die Analyse dieser veränderten Metabolite im intrazellulären Umfeld.

Eine weitere Möglichkeit zur Wirtsbeeinflussung stellen bakterielle Virulenzfaktoren dar, indem diese bspw. Signalwege regulieren, welches zur veränderten Transkription proinflammatorischer Gene führt. Dieses wurde durch den *Yersinia*-Faktor YopJ/YopP, welcher die Aktivierung von NF- κ B inhibiert, gezeigt (Zhou *et al.* 2005). Ferner können von Bakterien freigesetzte Toxine, wie Pneumolysin bei *S. pneumoniae* oder Listeriolysin O bei *Listeria monocytogenes*, die Genexpression des Wirtes beeinflussen und zwar selbst dann, wenn diese Zellen nicht direkt infiziert sind. Durch die Toxine beider Bakterien wird das Histon H3 dephosphoryliert, während durch die Listerien-Infektion zusätzlich eine Deacetylierung des Histons H4 stattfindet. Diese Modifikationen führen schließlich zur reduzierten Transkription von Immungenen in HeLa-Zellen (Hamon *et al.* 2007). Bakterielle Toxine können ebenfalls einen Stopp des Zellzyklus bewirken, wodurch die bakterielle Kolonisation begünstigt oder die Integrität der Zellbarriere des Epithels beeinträchtigt wäre. Dieser Stopp des Zellzyklus kann durch Schäden an der DNA oder dem Chromatin erfolgen (Smith & Bayles 2006). Die verstärkte Adressierung des Zellzyklus zum späteren Zeitpunkt der Infektion, welche in der PEA dieser Arbeit beobachtet wurde, könnte demzufolge ebenfalls auf Pneumokokken-Toxine zurückzuführen sein. Außerdem würde *S. pneumoniae* dadurch auf die freiwerdenden NAD-

Metabolite der absterbenden Wirtszellen Zugriff haben, wodurch die bakterielle Replikation und Besiedelung unterstützt werden würde.

Der NAD Metabolismus spielt in Infektionen eine wichtige Rolle. Einige Mikroorganismen sind dazu befähigt, das NAD des infizierten Wirtes zu nutzen. Der Pilz *Candida glabrata* und das Bakterium *Haemophilus influenzae* müssen NAD-Metabolite ihrer Wirte aufnehmen, da sie es selbst nicht synthetisieren können (Domergue *et al.* 2005; Kemmer *et al.* 2001). Überdies beeinflusst *Streptococcus pyogenes* den Wirts-NAD-Metabolismus durch die Injektion der eigenen NAD-Glycohydrolase in das Zytosol der Wirtszelle. Dadurch wird die NAD-Bildung unterbrochen und das gesamte zelluläre NAD und ATP depletiert, was schließlich zum Tod der Zelle führt (Michos *et al.* 2006). Weiterhin bewirkt diese Verminderung der NAD-Konzentration eine Unterbrechung in der Immunantwort der Zelle (Chandrasekaran & Caparon 2015). Dies passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in welcher eine verringerte CXCL8-Sekretion nach NAMPT-*knockdown* beobachtet wurde (Abb. 2-20).

3.4.3 Modulation der Pneumokokken-Replikation durch NAMPT und NMN

NAMPT, auch Visfatin genannt, wurde 1994 als *pre-B-cell colony-enhancing factor* (PBEF) identifiziert (Samal *et al.* 1994). Es wird ubiquitär exprimiert und kommt hauptsächlich intrazellulär im Zytoplasma und im Nucleus vor, kann aber auch als sogenanntes extrazelluläres NAMPT (eNAMPT) sekretiert werden (Kitani *et al.* 2003; Revollo *et al.* 2007). Dieses Enzym ist stark konserviert und wird mit hohen Homologien zum Menschen ebenfalls in Mäusen (95%), Metazoen (58%) und Prokaryoten (30%) exprimiert (Luk *et al.* 2008; Martin *et al.* 2001). In Mäusen ist ein homozygoter NAMPT-*knockout* letal, während heterozygote Mäuse morphologisch unauffällig sind, jedoch drastisch reduzierte NAD-Gewebekonzentrationen aufweisen (Revollo *et al.* 2007). Der *knockdown* von NAMPT, dem limitierenden Enzym für die Bildung von NAD (Dahl *et al.* 2012), wurde in dieser Arbeit mittels siRNA in den BEAS-2B Zellen durchgeführt. In dem hier untersuchten Zeitrahmen wurde kein vermehrter Zelltod festgestellt (Abb. 2-17). Die Messung der NAD-Konzentrationen in BEAS-2B Zellen wurde im Umfang dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es ist jedoch zu postulieren, dass diese durch den *knockdown* ebenfalls vermindert wird. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden.

Die Funktionen, welche NAMPT neben der Produktion von NAD zugeschrieben werden, sind vielfältig. NAMPT fungiert als Regulator von Immunsystemmolekülen wie TNF- α oder CXCL8 (Li

et al. 2008a; Luk *et al.* 2008). Auswirkungen der Depletion von NAMPT wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Veränderungen der CXCL8 Sekretion ermittelt. Ferner wurde NAMPT mit verschiedenen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes, Krebs sowie Prozessen wie Alterung assoziiert (Garten *et al.* 2015). Zudem wurde NAMPT in einen Infektionskontext gebracht, da dieses die Replikation von HI-Viren inhibiert oder verhindert (Chen *et al.* 2013; Van den Bergh *et al.* 2010) sowie mit der inflammatorischen Wirtsimmunantwort bei H1N1 Influenzainfektionen in Zusammenhang steht (Gao *et al.* 2011). Hierbei führt die Inhibierung von NAMPT zu verminderter Entzündung und Apoptosen im Lungengewebe. Daher wurde NAMPT früher als potentieller Biomarker bei akuten Lungenschäden in Betracht gezogen (Ye *et al.* 2005). Außerdem wird NAMPT durch LPS induziert (Garcia & Vinasco 2006). Die gesteigerte Expression von NAMPT nach Infektion mit *S. pneumoniae* deutet demzufolge auf keine spezifische Induktion hin und kann insofern nicht als Marker einer bestimmten Infektion dienen. Diese Studien zeigen einerseits die vielfältigen Wirkungen dieses Enzyms und andererseits die grundlegende Verbindung zwischen Metabolismus und Erkrankungen auf, welche zuvor unter 3.4.1 besprochen wurden.

Die Hauptaufgabe von NAMPT innerhalb einer Zelle ist die Produktion von NMN. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *knockdown* von NAMPT zu einer verminderten Replikation von *S. pneumoniae* führte. Dies passt zu der Vermutung, dass NAD-Vorgängermoleküle durch Pneumokokken aufgenommen werden könnten (Johnson *et al.* 2015). Die NAD-Synthese erfolgt in Bakterien entweder über Neubildung (*de novo*) oder über Wiederaufbereitung (*salvage*), wobei Lactobacillales wie z. B. Streptokokken, den *salvage*-Syntheseweg nutzen (Huang *et al.* 2009). Dabei sind die wichtigsten Importsysteme NiaX für Nicotinsäure (Niacin) oder Nicotinamid, und PnuC für Nicotinamid-Ribosid (Herbert *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2015; Rodionov *et al.* 2008; Sauer *et al.* 2004). Am Import von NMN sollen sowohl NiaX als auch PnuC beteiligt sein, oder möglicherweise ein zusätzliches Importsystem existieren (Johnson *et al.* 2015). In dieser Arbeit zeigte sich, dass NMN in Konzentrationen von 100 μ M und 500 μ M tatsächlich zu einer erhöhten Replikation der Bakterien führten. Dies bestätigt die Ergebnisse der NAMPT Depletion und unterstützt die Hypothese von Johnson und Kollegen (Johnson *et al.* 2015). Ähnliches wurde durch eine weitere Studie gezeigt, in welcher die exogene Zugabe von Nicotinamid-Vorgängermolekülen die intrazelluläre NAD-Konzentration in Parasiten der Gattung *Leishmania* erhöht (Gazanion *et al.* 2011). Die Aufnahme von NMN wurde ebenfalls für *Haemophilus influenzae* und Bakterien der Gattung *Salmonella* beschrieben (Grose *et al.* 2005; Kemmer *et al.* 2001), wobei diese das NMN vor dem Import in eine für sie verwertbare Form (Nicotinamid-Ribosid) umwandeln (Jaehme *et al.*

2014). In diesen Studien wurden die Importsysteme untersucht, jedoch keine Untersuchungen zu Wachstumsunterschieden wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Dennoch zeigte sich in Kongruenz zur vorliegenden Arbeit, dass eine Konzentration von 100 μM NMN für *Salmonella* zum Überleben benötigt wird (Grose *et al.* 2005). Die Kolonisierung der Pneumokokken erfolgt in einem umkämpften Lebensraum, in welchem sie nicht nur mit anderen Spezies um die Nährstoffe konkurrieren, sondern sich zusätzlich dazu gegen Inhibitoren anderer Bakterien und die Immunabwehr des Wirtes zur Wehr setzen müssen (Nobbs *et al.* 2015). Daher könnte die Verwendung von Wirts-Metaboliten einen entscheidenden Vorteil und eine wichtige Nährstoffquelle für die Pneumokokken darstellen. Folglich sollte dieser Wachstumsvorteil bei weiteren Streptokokken-Spezies sowie anderen Bakterien überprüft werden. Bei den Wachstumskurven der vorliegenden Arbeit ist allerdings davon auszugehen, dass das Maximum nicht bei 21 h erreicht war, sondern in der Zeit zwischen 8 h und 21 h lag. Dies trifft wahrscheinlich sowohl auf das Wachstum mit und ohne additivem NMN zu. Daher sollte dieser zeitliche Bereich in weiterführenden Untersuchungen genauer betrachtet werden.

Ob noch weitere Faktoren des NAD Stoffwechsels einen Einfluss auf das Wachstum von *S. pneumoniae* haben könnten, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Aufnahme weiterer, in der Zelle vorhandene Vorgängermoleküle wie Nicotinsäure oder Nicotinamid-Ribosid durch Pneumokokken wurde von Johnson *et al.* vermutet (Johnson *et al.* 2015). Diese Moleküle könnten dann ebenfalls zu einem verstärkten bakteriellen Wachstum führen. Weiterhin wäre ein Nutzen von Nicotinamid, bevor es durch NAMPT zu NMN transformiert wird, durch die Pneumokokken ebenfalls denkbar. Jedoch würde theoretisch die Depletion von NAMPT zu einem Anstieg von NAM führen, da der *knockdown* ebenfalls zu einer verminderten NNMT Expression führt. Daher könnte NAM nicht in der entsprechenden Rate verstoffwechselt werden und müsste demzufolge vermehrt in den *knockdown*-Zellen vorliegen. Da diese Studie aber aufgezeigt hat, dass ein NAMPT *knockdown* zu verminderten Pneumokokken-Lasten führt, ist die Möglichkeit, dass NAM von *S. pneumoniae* genutzt wird, durch diese Daten nicht gestützt. Dies könnte mit einer geringen Freisetzung von NAM in den extrazellulären Raum begründet sein, sodass NAM nicht in ausreichendem Maße als Metabolit für die Bakterien zur Verfügung steht. Aufgrund der hohen Affinität des bakteriellen NMNATs für Nicotinsäure-Mononukleotid bevorzugen viele Bakterien, wie *S. pneumoniae* oder *S. aureus*, dieses als Vorgängermolekül für die eigene NAD-Biosynthese (Begley *et al.* 2001). Dies könnte auf bestimmte Präferenzen oder Konkurrenzen für bestimmte Nicotinamid-Moleküle hindeuten (Johnson *et al.* 2015).

3.4.4 Auswirkungen auf den NAD-Haushalt der Zelle

Eine dauerhafte NAD-Versorgung ist essentiell für das Überleben der Zelle (Billington *et al.* 2008). Die Inhibierung von NAMPT hat nicht nur Auswirkungen auf die NAD-Biosynthese, sondern auch auf die Bildung von Nukleotiden sowie den Lipid-Metabolismus (Tan *et al.* 2013; Tolstikov *et al.* 2014). Fehlfunktion der NAD-Homöostase können deshalb zu einer Reihe an Pathologien wie neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes oder Krebs führen (Belenky *et al.* 2007; Magni *et al.* 2008). Bereits 2004 wurde vermutet, dass eine Aktivierung von NAMPT zu erhöhten, intrazellulären NAD-Konzentrationen führt und dadurch NAD-abhängige Moleküle wie Sirtuine und *poly(ADP-ribose) polymerases* (PARPs) reguliert werden (Revollo *et al.* 2004). Demzufolge würde eine erhöhte NAMPT-Aktivität möglicherweise ebenfalls zu verstärkten Aktivitäten NAD-metabolisierender Moleküle in BEAS-2B Zellen führen. Eine intrazelluläre Erhöhung der NAD-Konzentration würde jedoch wahrscheinlich nur kurzzeitig detektierbar sein, da NAD als Redox-Koenzym zwischen der oxidierten Form (NAD) und der reduzierten Form (NADH) wechselt, wobei die Gesamtkonzentration in der Zelle konstant bleibt (Grahert *et al.* 2011).

NMN wurde im Plasma von Mäusen und Menschen detektiert (Mills *et al.* 2016; Ramsey *et al.* 2008; Revollo *et al.* 2007) und als mögliches funktionelles und regulatorisches Molekül vermutet. Weiterhin wurde NMN mit Erkrankungen assoziiert, als in Diabetespatienten hohe NMN-Dosen zu Leberschädigungen führten (Knip *et al.* 2000). NMN wird durch NAMPT gebildet und wird wiederum durch NMNAT1 (sowie NMNAT2 und 3) zu NAD aufgebaut (Rongvaux *et al.* 2002). Dieser Prozess ist in der *S. pneumoniae*-Infektion durch eine verminderte Expression von NMNAT beeinflusst. Eine generelle NMNAT-Reduktion nach Infektion kann aufgrund der Ergebnisse weiterer Studien als wenig wahrscheinlich eingestuft werden. So zeigte die Analyse von *L. pneumophila*-infizierten A549 Zellen keine signifikante Änderungen der NMNAT1-Expression (Du Bois *et al.* 2016). Außerdem wurde in weiteren Studien der Arbeitsgruppe einerseits keine NMNAT1-Regulation in THP-1 Zellen nach Infektion mit *L. pneumophila* festgestellt (Christina Herkt, unveröffentlichte Daten), andererseits aber eine verminderte Expression in Makrophagen nach *S. pneumoniae*-Infektion detektiert (Kerstin Seidel, unveröffentlichte Daten). Diese Untersuchungen deuten, zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, auf eine Pneumokokken-spezifische Regulation von NMNAT1 hin. Diese Reduktion würde, in Kombination mit der vorangegangenen, erhöhten Expression von NAMPT, zu einer intrazellulären Anreicherung von NMN führen. Ob diese Regulationen und mögliche NMN-Anreicherung auf Infektionen mit weiteren Streptokokken übertragbar sind, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Dass neben NAD-abhängigen Molekülen, wie oben beschrieben, weitere Enzyme dieses Stoffwechselweges ebenso durch die NAMPT-Expression beeinflusst werden, ist plausibel. In dieser Arbeit führte der NAMPT *knockdown* zu verringerten Expressionen von NNMT und NMNAT1, vornehmlich zum späteren Zeitpunkt des Experimentes. Wenn durch den *knockdown* von NAMPT kein oder wenig NMN gebildet wird, wird demzufolge weniger NMNAT benötigt, sodass dessen verminderte Expression damit erklärbar wäre. Da NAM allerdings ebenfalls durch NNMT zu MNA umgebaut werden kann, könnte man eine verstärkte Expression von NNMT erwarten, da nur wenig NAMPT als Konkurrenz zur Verwertung von NAM vorhanden ist. Nun zeigen die Ergebnisse jedoch, dass NNMT vermindert exprimiert wird. Möglicherweise hängt dies mit den unterschiedlichen Affinitäten der Enzyme zu NAM zusammen. Burgos und Schramm zeigten auf, dass NAMPT eine vielfach stärkere Affinität zu NAM als NNMT besitzt (Burgos & Schramm 2008). Die nachgewiesene verminderte Expression von NNMT könnte damit erklären werden, sodass dadurch dem wenigen noch vorhandenem NAMPT eine höhere Wahrscheinlichkeit gegeben wird, NAM umzusetzen. Damit würde die Zelle im Sinne der Aufrechterhaltung der essentiellen NAD-Synthese agieren. Würde die NAD-Produktion wegfallen, würde dies früher oder später, wie erwähnt, den Tod der Zelle zur Folge haben (Billington *et al.* 2008). Es wurde die Möglichkeit postuliert, dass Zellen auf den NAD-Vorrat anderer Zellen Einfluss haben könnten, indem sie alternative Vorgängerformen für die NAD-Produktion liefern (Kulikova *et al.* 2015). Nikiforov und Kollegen zeigten, dass alle bekannten NAD-Metabolite als extrazelluläre Vorgängermoleküle von intrazellulärem NAD fungieren können (Nikiforov *et al.* 2011). Jedoch wurde in der vorliegenden Studie ein starker NAMPT *knockdown* nachgewiesen, sodass die wenigen Zellen, welche eventuell eine intakte NAD-Produktion aufweisen könnten, diesen Verlust höchstwahrscheinlich nicht kompensieren würden.

NAMPT kann neben der intrazellulären Form auch extrazellulär (eNAMPT) vorliegen. Zirkulierendes eNAMPT wurde in Mäusen und Menschen beschrieben (Korner *et al.* 2007; Revollo *et al.* 2007) und ist bei diversen Erkrankungen wie Krebs, Arthritis oder Sepsis erhöht (Busso *et al.* 2008; Jia *et al.* 2004; Tian *et al.* 2013). In der Literatur finden sich vielfältige biologische Funktionen von eNAMPT, wie anti-apoptotische Effekte auf Immunzellen und Regulation der Insulin-Sekretion von Pankreaszellen (Imai 2009; Li *et al.* 2008b). Da eNAMPT die Funktion eines Zytokins einnehmen soll (Jia *et al.* 2004; Romacho *et al.* 2009), könnte durch die Infektion von Pneumokokken ein eNAMPT-Anstieg induziert werden. Die Rolle von eNAMPT wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Daher kann zur Änderung der eNAMPT-Konzentration in dem hier verwendeten Infektionsrahmen keine Aussage getroffen werden.

Durch die erhöhte Expression von NAMPT kann allerdings eine ebenfalls erhöhte eNAMPT-Konzentration postuliert werden, welche bspw. mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs ermittelt werden könnte. Die Freisetzung von eNAMPT soll über einen nicht-klassischen Sekretionsweg erfolgen (Tanaka *et al.* 2007), ist aber noch nicht vollständig geklärt und könnte ebenso durch absterbende Zellen stattfinden (Rongvaux *et al.* 2002). Ähnliches wurde für die extrazelluläre NAD-Konzentration beschrieben, welche im submikromolaren Bereich liegt, jedoch durch Infektionen und Entzündungen und damit einhergehendem Zelltod um ein Vielfaches ansteigen kann (Adriouch *et al.* 2007; Davies *et al.* 1999). Dies würde ebenfalls für eine mögliche Erhöhung der eNAMPT-Konzentration nach Pneumokokken-Infektion sprechen. Rezeptoren für eNAMPT sind bisher noch nicht bekannt (Grolla *et al.* 2016), jedoch wurde die Induktion von inflammatorischen Reaktionen, z. B. durch die verstärkte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen aufgrund der Induktion von Zell-Adhäsionsmolekülen oder die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, durch eNAMPT beschrieben (Kim *et al.* 2008). Möglicherweise steht die Abnahme der in dieser Arbeit beobachteten CXCL8-Freisetzung nach NAMPT Depletion damit in Zusammenhang. Ferner wurden posttranslationale Modifikationen von eNAMPT und intrazellulärem NAMPT dokumentiert, wobei die physiologische Relevanz bisher ungeklärt ist (Revollo *et al.* 2004). Inwieweit eNAMPT schließlich zum NAD-Metabolismus, aufgrund der geringen ATP-Konzentration im extrazellulären Raum, beiträgt, ist ebenfalls noch unbekannt (Hara *et al.* 2011).

Wechselwirkungen zwischen eNAMPT und NMN sind plausibel. In der Pneumokokken-Infektion könnte eNAMPT zur verbesserten Aufnahme durch *S. pneumoniae* führen. Auch Johnson und Kollegen schließen ein extrazelluläres Protein nicht aus, welches NMN für die Importsysteme der Pneumokokken nutzbar macht könnte (Johnson *et al.* 2015). Kürzlich wurde in einer Mausstudie Isotopen-markiertes NMN verwendet um die Aufnahme und Umwandlung *in vivo* zu verfolgen (Mills *et al.* 2016). Die markierten Metabolite wurden schließlich vorwiegend in Muskeln und in der Leber detektiert. Die Verwendung von markiertem NMN könnte die Aufnahme durch *S. pneumoniae* bestätigen. Weiterhin könnten intrazelluläre Regulationen, welche durch eNAMPT ausgelöst werden, durch die zusätzliche Gegenwart von NMN beeinflusst sein. Das Überleben von Makrophagen nach der Stressinduktion des endoplasmatischen Retikulums wird einerseits durch eNAMPT unterstützt, wobei exogenes NMN hierbei keine Auswirkungen zeigt (Li *et al.* 2008b). Andererseits induziert eNAMPT die Stickstoffmonooxid-Synthase und aktiviert die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) und den NF- κ B Signalweg, was ebenfalls durch NMN erreicht werden kann (Romacho *et al.* 2009). Das extrazelluläre Vorkommen von zirkulierendem Nicotinsäure-

Mononukleotid wurde aufgrund der Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferase (NaPRT)-Aktivität in humanem Plasma postuliert (Zamporlini *et al.* 2014). Daher wäre das Vorkommen von NMN außerhalb humaner Zellen denkbar. Dies könnte nicht nur die Regulationen und Reaktionen von Zellen beeinflussen, sondern, bspw. im Falle einer Sepsis, auch das Wachstum von *S. pneumoniae* begünstigen.

3.4.5 Beeinflussung des NAD-Metabolismus als alternative Therapie-Strategie

Aufgrund der beschriebenen, weitreichenden Auswirkungen des NAD-Metabolismus bietet dieser sich als therapeutisches Ziel für eine Vielzahl von Erkrankungen an. Jedoch müssen dabei mögliche weitreichende Nebenwirkungen bedacht werden. NAMPT-Inhibitoren gelten z. B. als mögliches Krebstherapeutikum und wurden in *in vitro* Studien und Mausmodellen angewandt (Bi *et al.* 2011; Cea *et al.* 2009; Tan *et al.* 2013). Der spezifische NAMPT-Inhibitor FK866 kann über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus Apoptose in Tumorzellen auslösen (Hasmann & Schemainda 2003b). Einige NAMPT-Inhibitoren haben vor wenigen Jahren die erste Stufe der Erprobungsphase durchlaufen, zeigten allerdings aufgrund dosisabhängiger Ziel-Toxizität nur begrenzte Effizienz (Sampath *et al.* 2015). Eine mögliche Verwendung in der Therapie nach einer Pneumokokken-Infektion wurde bisher nicht erwogen. Die Anwendung zur Therapie einer Infektion sollte jedoch mögliche positive Auswirkungen auf das Pathogen besonders berücksichtigen, sodass keine negativen Nebeneffekte für den Patienten auftreten. Das erweiterte Wissen um spezifische Funktionen der verschiedenen NAMPT-Moleküle könnte dabei zu neuen therapeutischen Ansätzen führen.

Aufgrund positive Effekte auf physiologische Funktionen wurden ebenfalls Therapiemöglichkeiten, z. B. bei Diabetes-Erkrankungen, durch NMN untersucht (Yoshino *et al.* 2018). Versuche in Mäusen zeigten eine vermehrte NAD-Biosynthese in verschiedenen Geweben durch die systemische Verabreichung von NMN auf (Peek *et al.* 2013; Yoshino *et al.* 2011). Dabei kann das verabreichte NMN sehr schnell im Plasma und in Organen nachgewiesen werden. Langzeitversuche zur zusätzlichen Verabreichung von NMN wurden ohne schädliche Auswirkungen in Mäusen getestet (Mills *et al.* 2016). Jedoch wäre, aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, eine verstärkte Replikation von *S. pneumoniae* und möglicherweise weiterer Bakterien bei solch einer Therapie nicht ausgeschlossen. Obwohl es bisher nicht vollständig geklärt ist, ob NMN die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, deuten Mausexperimente dieses an, da die intraperitoneale Verabreichung von NMN innerhalb kurzer

Zeit zu einem Anstieg der NAD-Konzentration in bestimmten Bereichen des Hirns führte (Stein & Imai 2014; Yoon *et al.* 2015). Ferner konnte die zusätzliche Gabe von NMN neurologische Funktionen wie Kognition oder Erinnerung in Alzheimer-Tiermodellen verbessern und Neuronen vor dem Absterben schützen (Long *et al.* 2015; Park *et al.* 2016a; Wei *et al.* 2017; Yao *et al.* 2017b). Da eine Meningitis allerdings zum Krankheitsbild einer Pneumokokken-Infektion gehören kann, könnte eine therapeutische Verabreichung von NMN zu schwerwiegenden Komplikationen führen.

In vielen Fällen, in welchen NAD-Metabolite positive Auswirkungen zeigen, ist jedoch noch immer unklar, welche *downstream*-Mechanismen diese Effekte vermitteln (Yoshino *et al.* 2018). Ebenso ist die Art der Aufnahme von NMN durch Zellen und Gewebe noch immer unklar. Dabei werden zwei Möglichkeiten diskutiert: Einerseits die Aufnahme über spezifische Transporter oder andererseits die extrazelluläre Dephosphorylierung von NMN zu Nicotinamid-Ribosid vor der Aufnahme (Yoshino *et al.* 2018). Spezifische Transporter für NAD-Metabolite sind bereits, wie für *S. pneumoniae* besprochen, bei Prokaryoten bekannt. Es wäre denkbar, dass solche ebenfalls bei eukaryotischen Zellen identifiziert werden könnten. Zelltyp- oder Gewebe-abhängige Unterschiede wären möglich. Die Stabilität von NAD-Metaboliten in der Blutzirkulation genauer zu untersuchen, würde zu einem verbesserten Verständnis von Pharmakokinetik und Aufnahmemechanismen dieser Moleküle führen (Yoshino *et al.* 2018). Kürzlich wurde eine Studie zur Stabilität und Degradation von Nicotinamid-Ribosid und NMN in murinem Plasma oder FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt (Ratajczak *et al.* 2016). Dabei zeigte sich eine deutlich höhere Stabilität von NMN gegenüber Nicotinamid-Ribosid. Demzufolge müssten längerfristige Auswirkungen, z. B. durch eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, bei einer Therapie bedacht werden.

3.5 Fazit

Trotz neu entwickelter Antibiotika (Hover *et al.* 2018) stellen steigenden Resistenzraten, welche auch bei *S. pneumoniae*-Infektionen beobachtet werden (Brown & Wright 2016; WHO 2014), ein großes Problem dar. Daher sind ergänzende Behandlungsmethoden und neue Strategien zur Bekämpfung von Pathogenen von großer Bedeutung. Eine detaillierte Untersuchung der Interaktionen zwischen humanen Epithelzellen und Pneumokokken kann dabei zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

In dieser Arbeit wurden Pneumokokken-spezifische Regulationen der Epithelzellen zum späten Zeitpunkt im Expressionsprofil nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die Expression der miRNA-3135b die Replikation der Pneumokokken hemmen kann. Ferner wurde das Molekül NAMPT des Nicotinamid-Metabolismus als die *S. pneumoniae*-Replikation beeinflussend beobachtet. Einerseits wurde durch den NAMPT *knockdown* einer Verringerung und andererseits durch die Zugabe von NMN einer Erhöhung der Replikation der Bakterien festgestellt. Durch diese Ergebnisse kann NMN als wichtige Nährstoffquelle für Pneumokokken postuliert werden.

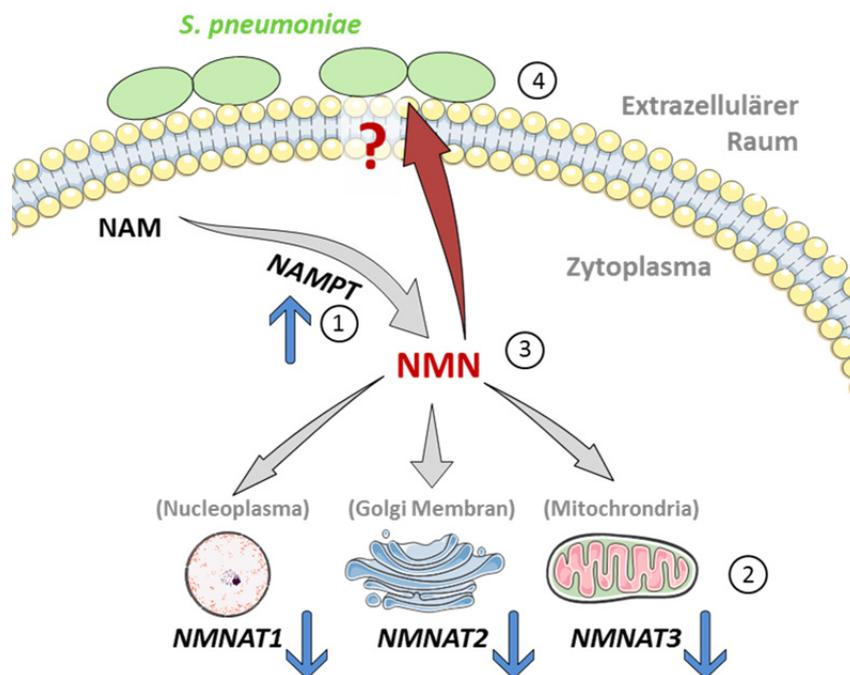


Abbildung 3-1: Schematisches Modell zum Einfluss von Nicotinamid-Mononukleotid auf *S. pneumoniae*. NAM wird vermehrt über NAMPT zu NMN aufgebaut (1). Durch die verringerte Expression von NMNAT1-3 erfolgt eine verringerte Umsetzung von NMN zu NAD (2). NMN reichert sich in der Zelle an (3), welches von *S. pneumoniae* aufgenommen und selbst verstoffwechselt werden kann (4). NAM = Nicotinamid, NMN = Nicotinamid-Mononukleotid, NAMPT = Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase, NMNAT1 = Nicotinamid-Nukleotid-Adenyltransferasen. (Bildobjekte bereitgestellt von Sevier Medical Art).

3.6 Ausblick

Zukünftig sollten mittels verschiedener Ansätze die Ergebnisse dieser Arbeit vertieft werden. Die in dieser Arbeit identifizierten putativen Ziel-mRNAs der miRNA-3135b sollten bestätigt werden. Mittels Luziferase-Assay könnten die Verbindung dieser mRNAs zur miRNA-3135b bestätigt werden. Anschließend könnten Effekte der mRNA auf die Zellen bzw. auf die Pneumokokken untersucht werden. Durch diese Informationen könnte der Mechanismus, welcher für die Abnahme der *S. pneumoniae*-Last verantwortlich ist, ermittelt werden.

Neben der Erstellung des Metaboloms, welches einerseits die postulierte intrazelluläre Anreicherung von NMN bestätigen und andererseits Veränderungen der NAD-Konzentration während der Infektion aufzeigen könnte, sollten noch verschiedene Fragen geklärt werden. Beeinflusst NAM ebenfalls die bakterielle Replikation? Würden sich die Effekte nach Depletion von NAMPT mit anschließender Zugabe von NMN gegenseitig aufheben? Welche Rolle spielt eNAMPT während der Pneumokokken-Infektion? Schließlich wäre es sinnvoll, die in dieser Arbeit ermittelten Befunde auf weitere Streptokokken oder andere Bakterien auszuweiten, um so möglicherweise spezifische Therapieansätze entwickelt zu können.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien

In nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendete Geräte, Materialien, Chemikalien, sowie Puffer, Medien und Agenzien aufgeführt.

4.1.1 Geräte

Tabelle 4-1: Auflistung verwendeter Laborgeräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav®	H+P
Automatisches Zellzählgerät	TC-10™ Automated Cell Counter	Bio-Rad
RNA-Qualitätskontrollsystem	Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Brutschrank	HERACELL 240i	Thermo Fisher Scientific
Dispenser	Multipette® plus Multipette® Xstream	Eppendorf
Durchflusszytometer	guava easy cyte 5HT	Merck Millipore
Elektrische Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand
Gefrierschrank	-80 °C Ultra low VIP-Series	Sanyo
Geldokumentationssystem	Gel-x Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
Gelsystem	Perfect Blue Doppel Gelsystem Twin	PeqLab Biotechnologie GmbH
GentleMACS Dissociator	Gewebehomogenisator	Miltenyi Biotech
Heizblock	Thermomixer comfort Thermomixer pro	eppendorf Cell Media
Kryotank	7403	Thermo Fisher Scientific
Kühl-/Gefrierschrank	+4 °C/-20 °C	Liebherr
Mikropipetten	1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl	Gilson
Mikroskope	AXIO Vert a1; PrimoVert	Carl Zeiss AG
Photometer	Infinite® M200 PRO Ultrospec 10	TECAN GE Healthcare
Präzisionswaage	EMB 600-2	Kern & Sohn GmbH
Reagenzschüttler	Vortex-GENIE 2 Vortex-V-1 plus	Scientific Industries peQlab
Real Time PCR System	QuantStudio 3 ViiA 7	Applied Biosystems
Rollenmischer	Roller mixer SRT6D	Stuart
Spannungsquelle	peqPOWER E300	PeqLab Biotechnologie GmbH
Spektrometer	NANODROP 2000c	Thermo Fisher Scientific
Sterilwerkbank	SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	peqSTAR 2x Gradient	PeqLab Biotechnologie GmbH

Ultraschallgerät	Bioruptor® Plus	Diagenode
Wasserbad		GFL
Wet-Blot-Apparatur	PerfectBlue™ Elektroblotter Web™ S	PeqLab Biotechnologie GmbH
Zentrifugen	Multifuge X3R Centrifuge 5430 R Centrifuge 5424 R FRESCO 17	Heraeus Eppendorf Eppendorf Heraeus

4.1.2 Materialien

Tabelle 4-2: Auflistung verwendeter Materialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Abdeckfolie (qPCR)	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Biopsiestanzen	Größe 8 mm	pfm medical AG
Blotting-Papier	Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Blotting-Schwamm	Faser-Matten für Web™ S, 2 Matten 180x245 mm	PeqLab Biotechnologie GmbH
Dispenser-Tips	2,5 ml – 25 ml Combitips®Plus	Eppendorf
Einmalschutzhandschuhe	Soft Nitril white	unigloves
Einmalspritze	NORM-JECT® 1 ml, 10 ml, 12 ml	Henke Sass Wolf
Einwegimpföse		VWR
Entsorgungsbeutel	200 x 300 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Einmal-Kanülen	0,55 x 25 mm	Becton Dickinson
Instrumentenschale	Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG
Gelgießstand	Cast-it Gel CASTER	PeqLab Biotechnologie GmbH
Küvetten	Semi-micro cuvettes 10 x 4 mm	Sarstedt
Mikrotiterplatte	96 Well 96 Well, Nunc Maxisorp	Sarstedt Thermo Fisher Scientific
Nitrozellulosemembran	Amersham Protran Premium 0.2 NC	GE Healthcare Life Sciences
Parafilm	M Film	Bemis Company, Inc.
Pinzetten	Semken, gebogen Extra Fine Graefe, gebogen	Fine Science Tools GmbH
Pipettenspitzen	DIAMOND ECO. PACK D1000, D200, D10	Gilson
Pipettenspitzen	10 µl – 1000 µl Diamon® 10 µl Towerpack™	Gilson
Pipettenspitzen (Filter)	10 µl – 1000 µl	Biozym
qPCR-Platte	96 Fast PCR Platte Halbrand	Sarstedt
Reagiergefäße	Safe Seal Gefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt
Schraubröhre	15 ml, 50 ml	Sarstedt

Schraubröhren M für gentleMACS	50 ml	Miltenyi Biotech
Skalpell	Cutfix steril, Figur 23	B. Braun Melsungen AG
Stabpipetten	serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Sterile Wattestäbchen	Rotilabo®-Wattestäbchen, Holz, steril, Kopf, Ø 4-5, 5 mm	Böttger oHG
Sterilfilter (0,2 µm)	Filtropur S	Sarstedt
Zählkammer	Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	Bio-Rad
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Sarstedt
Zellkulturplatten	CELLSTAR® 12 Well, 6 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	greiner bio-one
Zellkulturschale	TC-Schale, 100, Standard	Sarstedt
Zellschaber	Disposable Cell Scraper	Sarstedt

4.1.3 Chemikalien und Agenzien

Tabelle 4-3: Auflistung verwendeter Chemikalien und Agenzien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
2-Propanol	ROTIPURAN® ≥ 99,8%, p. a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG
5x Protein-Ladepuffer	Lane Marker Reducing Sample Buffer (5x konzentriert)	Thermo Fisher Scientific
Acrylamid/Bisacrylamid	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1	Carl Roth GmbH & Co. KG
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V, ≥ 98%, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Absolute, reg. ISO, reg. Ph. Eur. ≥ 99,8% (GC)	Sigma Aldrich
Glycin	PUFFERAN® ≥ 99% p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
GlycoBlue™		Life Technologies
Hefeextrakt	pulv., für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	ROTIPURAN® ≥ 99,9%, p. a., ACS Iso.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Milchpulver	blotting grade, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumcarbonat	≥ 99,8%, p.a., ACS, ISO, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	≥ 99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat	Monohydrat, ≥ 98%, p.a., ACS	Carl Roth GmbH

		& Co. KG
Natriumfluorid	≥ 99%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumorthovanadat	BioChemica®	AppliChem
Nonidet P 40 substitue	BioChemica® (Ersatzprodukt)	AppliChem
Proteaseinhibitor Cocktail (25x)	cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Proteinmarker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific
SDS	Natriumlaurylsulfat; Pellets, ≥ 99,9%, für die Biochemie	Carl Roth GmbH & Co. KG
TEMED	Tetramethylethyldiamin; ≥ 99%, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trichlormethan	ROTIPURAN® ≥ 99%, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris	PUFFERAN® ≥ 99,9%, Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton-X 100		Carl Roth GmbH & Co. KG
Trizol	TRI Reagent®	Sigma Aldrich
Tween-20	Ph. Eur.	Carl Roth GmbH & Co. KG
UP-Wasser	Ultra-pures Wasser, steril	Merck Biochrom

4.1.4 Puffer und Medien

4.1.4.1 Medien und Agenzien in der Zellkultur und Bakteriologie

Tabelle 4-4: Auflistung verwendeter Medien in der Zellkultur, Gewebekultivierung und Bakteriologie

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
BEEM	Bronchial Epithelial Basal Medium	Lonza
BEGM	Bronchial Epithelial Growth Medium BEEM 500 ml BPE 2 ml Insulin 0,5 ml Hydrocortison 0,5 ml Retinolsäure 0,5 ml Transferrin 0,5 ml Triiodothyronin 0,5 ml Epinephrin 0,5 ml hEGF 0,5 ml	Lonza
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium Ohne Lysin und Arginin	Gibco
optiMEM	Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, no phenol red	Gibco
RPMI Medium 1640	Mit 0,3% BSA und 1% GlutaMAX	Gibco
THY	Todd-Hewitt-Bouillon 0,5% (w/v) Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG

Tabelle 4-5: Auflistung verwendeter Agenzien in der Zellkultur und Bakteriologie

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
FKS	Fetales Kälber Serum	Gibco
GlutaMAX		Gibco
HBSS	<i>Hanks-buffered Saline Solution</i>	Lonza
Lipofectamin	RNAiMax	Invitrogen
LTA (LP)	Lipoteichonsäure von <i>Staphylococcus aureus</i> Stammlösung 5 mg/ml in UP-H ₂ O	Invitrogen
NMN	B-Nicotinamid-Mononukleotid, Stammlösung 10 mM in UP-H ₂ O	Sigma Aldrich
poly(I:C)	Polyinosinisch-polycytidylische Säure Stammlösung 1 mg/ml in UP-H ₂ O	Invitrogen
PVP	Polyvinylpyrrolidon	Sigma Aldrich
T/E + 0,5% PVP	Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 100 ml Polyvinylpyrrolidone 500 µl	Lonza
TNS	<i>Trypsin-Neutralization-Solution</i>	Lonza

4.1.4.2 Puffer, Gele und Agenzien in der Molekularbiologie

Tabelle 4-6: Auflistung verwendeter Puffer, Gele und Agenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x Laufpuffer (für SDS-PAGE)	250 mM Tris 30,3 g 1,92 M Glycin 144 g ad 1 L Aqua bidest
10x TBS-Puffer	10 mM Tris 12,1 g 0,9% (w/v) NaCl 90 g ad 1 L Aqua bidest mit 37% (v/v) HCl auf pH 7,4 einstellen
10x Wet-Blot Puffer	250 mM Tris 30,3 g 1,92 M Glycin 144 g ad 1 L Aqua bidest mit 37% (v/v) HCl auf pH 8,3 einstellen
1x Laufpuffer (für SDS-PAGE)	10x Laufpuffer 100 ml 0,1% SDS 1 g ad 1 L VE-Wasser
1x TBS-T Puffer	10x TBS Puffer 500 ml 0,1% (v/v) Tween-20 5 ml ad 5 L VE-Wasser
1x Wet-Blot Puffer	10x Wet-Blot Puffer 200 ml 20% (v/v) Methanol 400 ml 0,1% (w/v) SDS 2 g ad 2 L VE-Wasser
Beschichtungspuffer	Natriumhydrogencarbonat 7,13 g (84 mM) Natriumcarbonat 1,59 g (10 mM)

	ad 1 L Aqua dest., mit 10 N NaOH auf pH 9,5 einstellen
Blockierungslösung I	5% (w/v) BSA in 1x TBS-T
Blockierungslösung II	10% (w/v) Milch und 5% (w/v) BSA in 1x TBS-T
PBS	Firma GE Healthcare
Phosphoproteinwaschpuffer	Natriumorthovanadat (100 mM, pH: 9,0) 10 ml Natriumfluorid (0,5 M) 20 ml Natriumdiphosphat (150 mM) 100 ml Aqua dest. 690 ML
Proteinlysepuffer	für 1 ml Lysepuffer: Phosphoproteinwaschpuffer 413,35 µl 0,6 M Tris-HCl pH 6,8 41,65 µl 25x Proteaseinhibitor Cocktail 20 µl 20% (v/v) NP40 25 µl
RIPA-Puffer	10 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 1% NP-40 1% Desoxycholat 1mM EDTA
Polyacrylamid-Gel (10%ig)	Für ein Trenngel (10%) In ddH ₂ O Tris-HCl pH 8,8 132 mM Acrylamid/Bisacrylamid 350 mM Glycerol 170 mM SDS 3,5 mM APS 2,2 mM TEMED 6,7 mM Für ein Sammelgel (5%) In ddH ₂ O Tris-HCl pH 6,8 87,5 mM Acrylamid/Bisacrylamid 174 mM SDS 3,5 mM APS 2,2 mM TEMED 6,7 mM
Solubilisierungspuffer	Urea (>99,5% Reinheit) 1,92 g Thiourea (>99% Reinheit) 0,61 g Aqua dest. ad 4 ml
Verdünnungspuffer für ELISA	10% FKS in 1x PBS
Waschpuffer für ELISA	0,05% Tween in 1x PBS

4.1.5 Primer (Fa. Metabion)

Tabelle 4-7: Auflistung verwendeter qPCR-Primer, konstruiert von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schmeck

Zielgen	konstruiert von	Sequenz (5' → 3')	
		fwd. Primer	rev. Primer
CXCL2	Seidel	CCTGCAGGGAATTCACCTCA	CCTTCCTTCTGGTCAGTTGG
CXCL8	Schulz	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTC

CXCL10	Vollmeister	CTGCCATTCTGATTTGCTGCC	GATGCAGGTACAGCGTACAG
IL6	Schulz	AATTCGGTACATCCTCGACGG	TTGGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCT
NAMPT	Vollmeister	GGTTACAAGTTGCTGCCACC	AGCAAACCTCCACCAGAACC
NMNAT1	Vollmeister	GTGATCTCCGGTAGCACTCG	CTTGCCAGCTCAAACAACC
NNMT	Wesener	TAAGGAGATCGTCGTCCTG	CTGCTTGACCGCCTGTCTC
RPS18	Schulz	GCGGCGGAAAATAGCCTTTG	GATCACACGTTCCACCTCATC
SOD2	Herkt	ATGTTGAGCCGGGCAGTGTG	GCGCGTTGATGTGAGGTTCC

4.1.6 TaqMan-microRNA-Sonden (Fa. Life technologies)

Tabelle 4-8: Auflistung verwendeter TaqMan-Sonden für die RT-qPCR

Bezeichnung	reife miRNA Sequenz
hsa-miRNA-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGUU
hsa-miRNA-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
hsa-miRNA-3135b-5p	GGCUGGAGCGAGUGCAGUGGUG
hsa-miRNA-4455-5p	AGGGUGUGUGUGUUUUU
hsa-miRNA-4521-5p	GCUAAGGAAGUCCUGUCUCAG
hsa-miRNA-92a-1-5p	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU
RNU48	GAUGACCCAGGUAACUCUGAGUGUCGCUAUGCCAUCACCCGACG GCUCUGACC

4.1.7 *small interfering RNAs* (siRNAs) und miRNA mimics

Tabelle 4-9: Auflistung verwendeter siRNAs und miRNA mimics

Bezeichnung	ID	Hersteller
siRNA Ctr Silencer® Select Negative Control #1 siRNA	4390843 (5 nmol)	Ambion
siRNA NAMPT SMARTpool: ON-TARGETplus	L-004581-00-0005 (5 nmol)	Dharmacon
mirVana miRNA mimic negative control #1	4464058	Ambion
hsa-miRNA-3135b mirVana miRNA mimic	MC20623	Ambion

4.1.8 Antikörper zur Western Blot Analyse

Tabelle 4-10: Auflistung verwendeter Antikörper

Bezeichnung	ID	Beschreibung	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Primäre Antikörper				
anti-NAMPT AK	PA1-1045	Kaninchen, polyklonal IgG, 1 mg/ml	Thermo Fisher	1:1000 (in 3% (w/v) BSA in 1x-TBS-T)
anti-Aktin AK	sc-1616	Ziege, polyklonal, IgG, 200 µg/ml	Santa Cruz	1:1000 (in 3% (w/v) BSA in 1x-TBS-T)

Sekundäre Antikörper				
anti-Kaninchen-HRP AK	5127 S	Maus anti-Kaninchen IgG-HRP	NEB	1:2000 (in 3% (w/v) BSA in 1x-TBS-T)
Anti-Ziege-HRP AK	Sc-2020	Esel anti-Ziege IgG-HRP	Santa Cruz	1:5000 (in 3% (w/v) BSA in 1x-TBS-T)

4.1.9 Kits

Tabelle 4-11: Auflistung der verwendeten Kits

Bezeichnung	ID	Hersteller
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	RPN2232	GE Healthcare Life Sciences
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Thermo Fisher Scientific
Human ELISA IL8 Set	555244	BD OptEIA™
Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit	MCH100105	Merck Millipore
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific
RNA 6000 Nano Kit	5067-1511	Agilent Technologies
Taqman™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	4366597	Thermo Fisher Scientific
TMB Substrate Reagent Set	555214	BD OptEIA™

4.1.10 Bakterienstämme und Influenzastränge

Tabelle 4-12: Auflistung verwendeter Erregerstämme

Erreger	Bezeichnung	Quelle
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>S. pneumoniae</i>)	D39 Wildtyp, Serotyp 2	Prof. Sven Hammerschmidt, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Influenzaviren	A/Memphis/14/96 (H1N1) A/Aichi/2/68 (H3N2)	Prof. Eva Friebertshäuser, Institut für Virologie, Philipps Universität Marburg

4.1.11 Software

Tabelle 4-13: Auflistung der verwendeten Softwares

Software	Vertreiber
2100 Expert Software B.02.08.SI648	Agilent Biotechnologies
Adobe Photoshop CS 5.1	Adobe Systems
CLC genomics workbench	Qiagen
FlowJo® 7.6.5	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.

Ingenuity pathway analysis	Qiagen
INTAS Chemostar	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
Lab Image 1D	Kapelan Bio-Imaging
Microsoft Office 2010	Microsoft
R 3.4.2	R Core Team
RStudio 1.1.383	RStudio, Inc.
QuantStudio® Design & Analysis Software	Thermo Fisher Scientific

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Für die *in vitro* Experimente dieser Arbeit wurde die Zelllinie BEAS-2B (CRL-9609, ATCC) verwendet. Diese adhärenenten humanen Bronchialepithelzellen wurden durch eine Infektion mit dem Adenovirus 12-SV40 (Ad12SV40) immortalisiert¹. Des Weiteren wurde ein *ex vivo* Model mit humanem Lungengewebe etabliert. Dafür wurden explantierte Lungenstücke nach einer Operation im Universitätsklinikum Marburg direkt bearbeitet und für Infektionsexperimente verwendet.

4.2.1.1 Kultivierung von BEAS-2B Zellen

Die Kultivierung der BEAS-2B Zellen erfolgte in BEG-Medium in T75 oder T175 Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂. Vor dem Passagieren wurden die Zellen mit 5 ml bis 10 ml vorgewärmtem HBSS gewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 2 ml in T75 und 4 ml in T175 T/E + 0,5% PVP für 5 bis 6 min bei 37 °C. Wenn sich der Zellrasen nahezu komplett von der Oberfläche der Zellkulturflaschen gelöst hatte, wurde diese Reaktion mit 4 ml TNS abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden daraufhin von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgespült und das gesamte Volumen in eine 15 ml Schraubröhre überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 8 min bei 125 x g und 22 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10 ml neuem BEGM resuspendiert. Danach wurden 10 µl dieser Suspension entnommen und in eine Zählkammer überführt, um mittels automatischem Zellzählgerät die Gesamtzellzahl zu ermitteln. Dann wurden 2*10⁴ Zellen/cm² in BEGM in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.1.2 Transfektionen

Die Transfektionsversuche wurden in BEAS-2B Zellen durchgeführt. Es wurde die siNAMPT in einer Konzentration von 20 nM in den Experimenten verwendet (Tabelle 4-14). Die Konzentrationen für die Überexpression der miRNA-3135b betrug 10 nM bzw. 20 nM (Tabelle

¹ www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx?geo_country=de

4-15). Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin RNAiMAX in einer 1:100 Verdünnung verwendet. Darüber hinaus wurden Kontrolltransfektionen durchgeführt, bei welchen die Zellen mit siKtr bzw. der miRNA *mimic* oder lediglich mit dem Transfektionsmedium optiMEM behandelt wurden, sodass mögliche unspezifische Reaktionen der Zellen auf das Transfektionsreagenz, das Mediums selbst oder zellfremde RNA erkennbar waren.

Tabelle 4-14: Transfektionsansatz zum *knockdown* von NAMPT

	siCtr (f.c. 20 nM) (Negativkontrolle)	siNAMPT (f.c. 20 nM)	optiMEM- Kontrolle
x-facher Ansatz	1x	1x	1x
optiMEM	194 µl	194 µl	198 µl
Konstrukt	siKtr (50 µM)	-	-
	siNAMPT (50 µM)	4 µl	-
RNAiMax	2 µl	2 µl	2 µl
Gesamtvolumen	200 µl	200 µl	200 µl

Tabelle 4-15: Transfektionsansatz zur Überexpression der miRNA-3135b

	<i>mimic</i> -Ktr (f.c. 20 nM) (Negativkontrolle)	miRNA-3135b <i>mimic</i> (f.c. 10 nM)	miRNA-3135b <i>mimic</i> (f.c. 20 nM)	optiMEM Kontrolle
x-facher Ansatz	1x	1x	1x	1x
optiMEM	194 µl	196 µl	194 µl	198 µl
Konstrukt	miRNA <i>mimic</i> (50 µM)	4 µl	-	-
	miRNA-3135b <i>mimic</i> (50 µM)	-	2 µl	4 µl
RNAiMax	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Gesamtvolumen	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Der jeweilige Transfektionsansatz wurde zur Bildung der Liposomen für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch zusammen mit den BEAS-2B Zellen in einer Anzahl von $4 \cdot 10^4$ Zellen/cm² für den *knockdown* bzw. $1,75 \cdot 10^5$ Zellen/cm² für die Überexpression in die Vertiefungen von 12-Well Platten gegeben und auf 1 ml mit BEGM aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 42 h bzw. 66 h bei 37 °C und 5% CO₂ in den Depletionsversuchen. Die Zellen, in welchen die miRNA-3135b überexprimiert wurde, wurden für 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch unverbrauchtes ersetzt, woraufhin die nun transfizierten Zellen mit *S. pneumoniae* D39 wt (MOI 10) für jeweils 4 h infiziert (siehe 4.2.1.4) wurden.

4.2.1.3 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Anzucht von *Streptococcus pneumoniae* wurde am Vortag der Infektion eine adäquate Menge mittels steriler Einwegimpföse aus dem Glycerol-Vorrat entnommen und auf zwei vorgewärmte Blutagarplatten in Form eines Vereinzlungsausstriches aufgetragen. Die Platten wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 9 h bis 12 h inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde eine Flüssigkultur erstellt. Dazu wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Wattestäbchen von den Blutagarplatten in vorgewärmtem THY-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ inokuliert. Die Bestimmung der Bakterienmenge erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei einer Wellenlänge (λ) von 600 nm. Nach Erreichen der Ziel-OD von 0,3 bis 0,5 wurde die Flüssigkultur bei 2095 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in BEGM resuspendiert. Eine OD₆₀₀ von 0,1 entsprach einer Bakterienkonzentration von $5 \cdot 10^7$ Kolonien bildende Einheiten (KbE)/ml. Die Bakteriensuspension wurde auf eine bestimmte Konzentration (siehe 4.2.1.4) verdünnt, auf die Zellen gegeben und mit BEGM aufgefüllt um für die angegebenen Zeiten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert zu werden.

4.2.1.4 Stimulation und Infektion von BEAS-2B Zellen

Am Vortag wurden $7,5 \cdot 10^4$ /cm² BEAS-2B Zellen in Zellkulturplatten ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂.

Direkt vor der Infektion wurde das Zellkulturmedium erneuert. Nach Bestimmung der Zellzahl, wie unter 4.2.1.1 beschrieben, wurde die Multiplizität der Infektion (*Multiplicity of infection*, MOI), das zahlenmäßige Verhältnis der Bakterienmenge zur Zellzahl, mit folgender Formel ermittelt:

$$MOI = \frac{n_{\text{Bakterien}}}{n_{\text{Zellen}}}$$

Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit LTA (*S. aureus*) mit einer Konzentration von 1 µg/ml. Die Substanz LTA ist laut Angaben des Herstellers Lipoteichonsäure aus der Zellwand des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus*. Es konnte nachgewiesen werden, dass die mit dieser Substanz behandelten Zellen über TLR2 auf das enthaltene Lipoprotein reagieren (Hashimoto *et al.* 2006). Aus diesem Grund wird diese Substanz in dieser Arbeit als LP bezeichnet.

4.2.1.5 *Ex vivo* Infektion von humanem Lungengewebe

Die für diese Studie geeigneten Spender, welche an Bronchialkarzinomen oder Metastasen litten, wurden von Prof. Dr. Andreas Kirschbaum (Universitätsklinikum Marburg, Sektion Thoraxchirurgie) gemäß dem Ethikantrag AZ 224/12 aufgeklärt. Nach der Einwilligung der Spender wurde das humane Lungengewebe von Prof. Kirschbaum operativ entnommen und in einen 100 ml Schraubbecher mit 50 ml gekühltem RPMI Medium überführt.

Im Labor des Instituts für Lungenforschung wurde das Lungengewebe unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit zwei Pinzetten unter Spannung gehalten und mittels Skalpell in Streifen geschnitten. Diese Streifen wurden dann mit Hilfe von Biopsiestanzen in etwa gleichgroße Gewebestücke gestanzt. Es war zu beachten, dass das Gewebe nicht übermäßig blutig, entzündet oder in pathologischer Weise verändert war. Die gestanzten Gewebestücke wurden nach einander in entsprechend viele Vertiefungen von 6-Well Platten gegeben. Dies wurde auf einer Präzisionswaage durchgeführt, um das Gewicht der einzelnen Stücke zu notieren. Das jeweilige Gewicht der Gewebestücke diente als Ausgangswert zur Errechnung der Menge an Erregern (*Streptococcus pneumoniae* bzw. Influenza A Virus), sodass die theoretischen Reaktionen der Lungenstücke auf die Infektion untereinander vergleichbar waren. Dabei wurden pro 160 mg Gewebe $1 \cdot 10^6$ KbE- bzw. Plaque-bildende Einheiten (PbE) zur Infektion genutzt. Die Menge an PbE spiegelt dabei die Anzahl an aktiven Viruspartikeln wider. Anschließend wurden die Kulturplatten über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ in RPMI Medium ohne Zusätze inkubiert, um mögliche Antibiosen auszuwaschen oder Kontaminationen des Gewebes zu erkennen.

Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Lungenstücke. Vor der Infektion wurde das Gewebe dreimal mit PBS gewaschen. Im Falle einer Influenza-Infektion, wurde die dem Gewicht entsprechende Menge an Virus mittels Mikropipette auf das Gewebestück gegeben. Zusätzlich wurden 1,5 ml Infektionsmedium (RPMI mit 1% GlutaMAX und 0,3% BSA) hinzugegeben. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 37 °C schüttelnd für 1 h inkubiert. Nach dieser Absorptionszeit wurde das Medium abgenommen und die Lungenstücke einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 4 ml neuem Infektionsmedium weiter inkubiert wurden. Für die Infektion mit *S. pneumoniae* wurden die Bakterien zunächst wie unter 4.2.1.3 herangezogen. Nach dem Verdünnen auf die gewünschte Menge an Bakterien pro 400 µl Volumen wurden dieses in drei Injektionspunkten mittels Einmalkanülen und Einwegspritzen direkt in das Gewebe appliziert. In die Kontrollstücke wurde auf die gleiche Weise dieselbe Menge an Medium injiziert. Zur Kontrolle der tatsächlichen Bakterienlast wurde auch hier, wie unter 4.2.1.6 beschrieben, eine *Input* Plattierung durchgeführt.

Für die Ernte wurde zunächst der Überstand in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.1.6 Ermittlung der initialen Bakterienmenge (*Input-Plattierung*)

Die *S. pneumoniae*-Infektionskultur wurde bis zu einer theoretischen Konzentration von 10^3 KbE/ml und 10^2 KbE/ml in Infektionsmedium verdünnt. Von diesen Lösungen wurden geeignete Mengen auf vorgewärmte Schafblutagarplatten mittels Einwegimpfösen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe der am folgenden Tag gezählten Kolonien wurde die initiale Bakterienlast errechnet, welche die tatsächliche MOI darstellt.

4.2.1.7 Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (*CFU-Assay*)

100 µl Bakteriensuspension wurde aus Überständen infizierter Zellen entnommen und bis zu adäquaten Verdünnungsstufen mit Infektionsmedium versetzt. Die Verdünnungen wurden dann auf vorgewärmten Schafblutagarplatten mittels Einwegimpfösen ausplattiert. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt, um die tatsächliche Kokkenlast zum jeweiligen Zeitpunkt und unter der jeweiligen Bedingung zu ermitteln. Diese wurden dann als KbE/ml dargestellt oder, zum besseren Vergleich von verschiedenen Behandlungen, als KbE relativ zur Kontrolle.

4.2.1.8 Wachstumskurven von *S. pneumoniae*

Dazu wurden zunächst $1 \cdot 10^7$ BEAS-2B Zellen in 3 ml BEGM aufgenommen und mittels Ultraschallgerät sonifiziert (20 Zyklen á 30 s). Anschließend wurde die erhaltene Suspension sterilfiltriert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Danach wurde diese Lösung auf 10 ml aufgefüllt und stellte die 100% Suspension dar. Nun wurde jeweils 900 µl dieser Lösung in die Vertiefungen einer 12-Well Platte gegeben. Anschließend wurden sowohl die aufgeführten Konzentrationen an NMN aus der 10 mM Stammlösung verdünnt sowie auch die initiale Menge *S. pneumoniae* ($1 \cdot 10^7$ KbE) hinzugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die KbE-Bestimmung (4.2.1.7) entnommen.

4.2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

4.2.2.1 RNA-Isolierung

Die gesamte RNA wurde mittels Trizol und der Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wurde der Zellrasen einer 12-Well Platte nach Abnahme des Überstandes mit 500 µl Trizol beschichtet. Nach einer 5 minütigen Inkubation konnte der Zellrasen mittels auf und ab

pipettieren abgespült und in 1,5 ml Reagiergefäße überführt werden. Nach Zugabe von jeweils 100 µl Trichlormethan wurden die Proben 15 s lang geschüttelt und anschließend für 3 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt, jeweils 300 µl Isopropanol und 1 µl GlycoBlue™ hinzugegeben und anschließend invertiert. Die RNA wurde bei -20 °C über Nacht gefällt. Am folgenden Tag wurden die Proben bei 4 °C ebenfalls für 15 min und 12.000 x g zentrifugiert. Dabei entstand ein bläulich angefärbtes Pellet, welches zweimal mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen wurde. Dies erfolgte jeweils für 5 min bei 12.000 x g und 4 °C. Nach dem zweiten Waschen der RNA wurde der Lösungsmittelüberstand gründlich entfernt und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Abschließend erfolgte die Zugabe von 15 µl RNase freiem UP-Wasser und die Inkubation bei 57 °C für 5 min im Thermoblock zum Lösen der RNA. Danach wurde die gelöste RNA auf Eis gelagert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Die RNA-Isolierung aus den humanen Lungengewebsstücken verlief ebenfalls nach dem oben genannten Protokoll. Zuvor wurde das Gewebe aufgeschlossen, um die RNA daraus extrahieren zu können. Dafür wurden die gefrorenen Gewebsstücke in gentleMACS™ M-Tubes überführt, in welche 2 ml gekühltes Trizol vorgelegt waren. Dann erfolgte die Homogenisierung mittels gentleMACS™ Dissociator mit dem vorinstallierten Programm RNA_02.01. Es wurden drei Zyklen des Programmes durchgeführt. Zwischen diesen wurden die Proben auf Eis gekühlt, um eine Erhitzung und damit einhergehende Degradation der RNA zu vermeiden. Anschließend wurde das Homogenat auf zwei 1,5 ml Reagiergefäße aufgeteilt, sodass diese unabhängig voneinander aufgearbeitet werden konnten. Daraufhin wurde das oben aufgeführte Protokoll zur RNA-Isolierung durchgeführt, wobei hier die verwendeten Chemikalien in der doppelten Menge eingesetzt wurden, da auch die Ausgangsmenge an Trizol die Doppelte war.

Qualitative Prüfung der RNA

Die isolierte RNA wurde mittels Bioanalyzer 2100 auf Degradation kontrolliert. Hierfür wurde das RNA 6000 Nano Kit verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers genutzt. Die Messung und Analyse erfolgte mit der dazugehörigen 2100 Expert Software der Firma Agilent Biotechnologies.

4.2.2.2 Reverse-Transkriptase (RT-) und qualitative PCR (qPCR)

Zur Analyse des Expressionsprofils von mRNAs und miRNAs der BEAS-2B Zellen und der humanen Lungengewebsstücke wurde die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Als Grundlage hierfür diente die sogenannte cDNA (*copy-DNA*).

Bestimmung der mRNA-Expression

Zur Generierung der cDNA wurden 500 ng der isolierten RNA (beschrieben unter 4.2.2.1) mittels RT umgeschrieben werden. Die RNA wurde mit RNase freiem UP-Wasser auf 10 µl in 0,5 ml Reagiergefäßen aufgefüllt. Anschließend wurden diesen verdünnten RNAs 10 µl des Umschreibe-Mastermixes hinzugesetzt.

Tabelle 4-16: Zusammensetzung des *high capacity-reverse transcription* (HCRT)-Mastermixes

	Ansatz pro Probe	Ansatz für RT(-)-Kontrolle
10x Reaktionspuffer (RT Puffer)	2 µl	2 µl
10x Primer (<i>Random Primer</i>)	2 µl	2 µl
dNTPs (100 mM)	0,8 µl	0,8 µl
Reverse Transkriptase (<i>Multiscribe reverse Transcriptase</i> 50 U/µl)	1 µl	-
RNase freies UP-Wasser	4,2 µl	5,2 µl

Die RT (-)-Kontrolle diente der Überprüfung, dass keine genomische DNA in den Proben vorhanden war, sowie der Gewähr der Spezifität der verwendeten qPCR Primer.

Für die Umschreibungen wurde der Thermocycler „peqSTAR 2x Gradient“ der Firma PeqLab Biotechnologie GmbH und folgendes Programm verwendet:

Tabelle 4-17: Programm zur Umschreibung der mRNAs

Schritt	Temperatur	Dauer
Primerhybridisierung	25 °C	10 min
Elongation	37 °C	2 h
Enzyminaktivierung	85 °C	5 min

Tabelle 4-18: Zusammensetzung des Mastermixes zur Analyse der mRNA-Expression

	Ansatz pro Vertiefung
FAST SYBR® Green MasterMix	10 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	0,4 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	0,4 µl
RNase freies UP-Wasser	7,7 µl

Nachdem der Mastermix vorgelegt wurde, erfolgte die Zugabe von 1,5 µl der cDNA in Triplikaten in die jeweiligen *Wells*. Schließlich wurde die Mikrotiterplatte mit einer speziellen Abdeckfolie versiegelt und nachfolgendes qPCR-Programm gestartet.

Tabelle 4-19: qPCR Programm zur Analyse der mRNA-Expression

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	20 s
Primeranlagerung + Elongation	60 °C	20 s
Denaturierung	95 °C	1 s
Schmelzkurve	60 – 95 °C	0,05 °C/s
	95 °C	15 s

} 40 Zyklen

Bestimmung der miRNA-Expression

Zur Analyse der miRNA Expression wurden 300 ng der isolierten RNA für die Umschreibung mittels RT eingesetzt. Die RNA wurde mit RNase freiem UP-Wasser auf 5 µl in 0,5 ml Reagiergefäßen aufgefüllt. Anschließend wurden den verdünnten RNAs 10 µl des nachfolgend aufgeführten Mastermixes für die Umschreibung hinzugesetzt.

Tabelle 4-20: Zusammensetzung des microRNA-reverse transcription (miR-RT)-Mastermixes nach Herstellerangaben

	Ansatz pro Probe
10x Reaktionspuffer (RT Puffer)	1,5 µl
RT-Primerpool (jeweils 0,05x)	3 µl – 4,5 µl
dNTPs (100 mM)	0,15 µl
Reverse Transkriptase (<i>Multiscribe reverse Transcriptase</i> 50 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0,19 µl
RNase freies UP-Wasser	add 15 µl

Für die Umschreibungen wurde der Thermocycler „peqSTAR 2x Gradient“ der Firma PeqLab Biotechnologie GmbH und folgendes Programm verwendet:

Tabelle 4-21: Programm zur Umschreibung der miRNAs

Schritt	Temperatur	Dauer
Primerhybridisierung	16 °C	30 min
Elongation	42 °C	30 min
Enzyminaktivierung	85 °C	5 min

Tabelle 4-22: Zusammensetzung des Mastermixes zur Analyse der miRNA-Expression

	Ansatz pro Vertiefung
Universal MasterMix II	10 µl
TaqMan-Primer (20x)	1 µl
RNase freies UP-Wasser	7,5 µl

Nachdem der entsprechende Mastermix vorgelegt wurde, erfolgte die Zugabe von 1,5 µl der cDNA in Triplikaten in die jeweiligen *Wells*. Schließlich wurde die Mikrotiterplatte mit einer speziellen Abdeckfolie versiegelt und nachfolgendes qPCR-Programm gestartet.

Tabelle 4-23: qPCR Programm zur Analyse der miRNA-Expression

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	20 s
Primeranlagerung + Elongation	60 °C	20 s
Denaturierung	95 °C	1 s

Als endogene Kontrollen dienten das ribosomale Protein S 18 (RPS18) für die mRNA- und die *small nucleolar RNA, C/D Box 48* (RNU48) für die miRNA Analysen.

Die Auswertung dieser Methode beruht auf der Mittelung der CT-Werte der Triplikate (\overline{CT}) und der anschließenden sogenannten ΔCT -Wert Errechnung.

$$\Delta CT = \overline{CT} [\text{Zielgen A, Probe X}] - \overline{CT} [\text{endogene Kontrolle, Probe X}]$$

Dann wurde auf die jeweilige Kontrolle (Ktr) des Versuchsansatzes (bspw. bei Transfektionen auf die siKtr) normalisiert. Dazu wurde der $\Delta\Delta CT$ -Wert errechnet.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT [\text{Probe}] - \Delta CT [\text{Ktr}]$$

Um die relative Genexpressionsrate zu ermitteln, wurde die unten aufgeführte Formel verwendet. Diese ermittelte Rate beschreibt die x-fache Änderung der Expression (*fold change*) gegenüber der für die Normalisierung verwendeten Kontrolle.

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Transkriptom- und miRNA-Analyse

Zur Analyse der mRNA und miRNA Profile wurden die BEAS-2B Zellen stimuliert (beschrieben unter 4.2.1.4) und deren RNA, wie unter 4.2.2.1 beschrieben, isoliert. Hierfür wurden drei unabhängigen biologischen Replikaten verwendet.

Anschließend erfolgte die qualitative Prüfung der RNA mittels Bioanalyzer (beschrieben unter 4.2.2.1). Nachdem die adäquate Qualität der RNA-Proben verifiziert wurde, wurden die Proben zur Analyse des mRNA sowie des miRNA Profils versandt.

Die Aufbereitung der Proben sowie die Untersuchung des Transkriptoms wurden durch Dr. Jochen Wilhelm (Justus-Liebig-Universität, Gießen) durchgeführt. Hierfür wurde ein

Microarray (Human G3 v2 Kit, 8x60k) der Firma Agilent Technologies verwendet. Für die Analyse des Transkriptoms wurden 200 ng RNA pro Probe verwendet.

Das miRNA-Profil wurde durch Sequenzierung ermittelt. Hierfür wurde die Firma vertis Biotechnologie AG (Freising, Deutschland) beauftragt. Zunächst wurde die rRNA in den Proben abgereichert, bevor die cDNA aus den kleinen nicht kodierenden RNAs hergestellt wurde. Zur Analyse der Sequenzteilabschnitte (*reads*) selbst wurde ein Illumina NextSeq 500 (Fa. Illumina) mit *single-read lanes*, 1*75 bp Sequenzlänge und zirka 1*130 Millionen *reads* verwendet.

Die Transkriptomanalyse der BEAS2-B Zellen nach Überexpression der miRNA-3135b wurde mittels Sequenzierung untersucht. Dafür wurde die *Genomics Core Facility* der Philipps-Universität Marburg beauftragt. Es wurde zunächst eine poly(A) Anreicherung durchgeführt und 20 Millionen *reads* mit einer Sequenzlänge von 50 bp mittels Illumina HiSeq 1500 analysiert.

4.2.2.3 Proteinisolierung

Die Effizienz des *knockdowns* von NAMPT mittels siRNA wurde auch auf Proteinebene untersucht. Zur Isolierung der Proteine wurde bei den entsprechenden *Wells* der Mediumüberstand abgenommen, die Zellkulturplatten auf Eis gelagert und 60 µl/*Well* RIPA-Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurde der Zellrasen mit Hilfe von Zellschabern entfernt und die entstandenen Suspensionen in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert

Die Proteinisolierung aus humanen Lungengewebe erfolgte durch Aufnahme der Lungengewebe in flüssigem Stickstoff und Überführung der gefrorenen Lungengewebestücke in M-Schraubröhren mit 2 ml RIPA-Lysepuffer. Die Homogenisierung wurde mit zwei Zyklen des vorinstallierten Programms Protein_01.01 mit Hilfe des gentleMACS™ durchgeführt. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Proben auf Eis gekühlt. Dies sollte eine übermäßige Erhitzung der Proben verhindern, was eine Degradation der Proteine begünstigen würde. Nach Ablauf des Programmes wurden die Proben für ca. 1 h auf Eis gelagert, sodass die Proteine wieder in die liquide Phase absinken konnten. Dann wurden die Proben auf jeweils zwei 1,5 ml Reagiergefäße aufgeteilt und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Für die weitere Aufarbeitung der Zellkultur- wie auch der Gewebeproben wurden diese zunächst schonend aufgetaut und bei 13.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues Reagiergefäß überführt und für die Proteinkonzentrationsbestimmung (beschrieben unter 4.2.2.4) verwendet.

4.2.2.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde in dieser Arbeit die Bichinonsäure (BCA)-Methode verwendet. Die Durchführung wurde nach dem Protokoll des Herstellers des Kits Pierce™ BCA Protein Assay Kit vorgenommen. Dafür wurden die zu analysierenden Proben im Vorfeld im Verhältnis 1:10 mit UP-Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Proben für eine Doppelbestimmung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (Fa. Sarstedt) aufgetragen. Die Messung erfolgte dann mittels Photometer (Infinite® M200 PRO) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

4.2.2.5 Proteinprofil-Analyse

Die Proteomanalyse wurde mittels stabiler Isotopen-Markierung durch Aminosäuren in der Zellkultur (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*, SILAC) und anschließender nanoskaliger Flüssigchromatographie mit angebundener Massenspektrometrie (*nanoscale liquid chromatography with coupled mass spectrometry*, nanoLC-MS/MS) durchgeführt. Dabei wurden BEAS-2B Zellen als globaler, markierter SILAC Standard in DMEM mit 2% FKS herangezogen und über vier Passagen kultiviert. Dieses Medium enthielt nur die ¹³C schwer markierte Isotope der Aminosäuren Lysin und Arginin. Da die in diesem Medium kultivierten Zellen die mittels schweren Isotopen markierter Aminosäuren aufnahmen, unterschieden sich die Proteine dieser Zellen zu den BEAS-2B Zellen, welche in nicht markiertem Medium herangezogen wurden, nur in der Masse um 6.02 Da und konnten so für die spätere Analyse des Proteinprofils genutzt werden. Die nicht markierten Zellen wurden für die Infektionsexperimente, wie unter 4.2.1.4 beschrieben, genutzt.

Vor der Ernte sowohl der schwer markierten SILAC Standardzellen als auch der Zellen des Infektionsexperiments wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Solubilisierungspuffer in die Vertiefungen der 6-Well Platten hinzugegeben. Für den Standard wurden mehrere Vertiefungen im 6-Well Format verwendet, sodass deutlich mehr Zellmaterial vom Standard zur Verfügung stand. Dies hat den Hintergrund, dass der Standard im späteren Verlauf mit den Zellen des Infektionsexperimentes gemischt wurde und somit deutlich mehr Material von den schwer markierten Zellen benötigt wurde. Mittels Zellschaber wurde der Zellrasen von der Oberfläche entfernt und daraufhin in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Es erfolgte das sofortige Gefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die weitere Aufarbeitung und Messung der Proben wurde in Greifswald durch Dr. Kristin Surmann, Sascha Blankenburg und Dr. Manuela Gesell Salazar (Arbeitsgruppe Prof. Uwe Völker, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung,

Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald) durchgeführt. Zusammenfassend beschrieben wurde dabei sowohl die Lyse der Zellen als auch die Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Publikation von Surmann und Kollegen durchgeführt (Surmann *et al.* 2015). Nachdem die vollständige Markierung des SILAC Standards verifiziert werden konnte, wurde dieser im Verhältnis 1:1 mit den infizierten Experimentproben (jeweils 5 µg) gemischt. Die gemischten Proben wurden daraufhin mittels 1D Gelelektrophorese (NuPAGE4-12% Acrylamid Bis-Tris Medi Gel, Novex, Fa. Life Technologies) nach Herstellerangaben aufgetrennt, um deren Komplexität zu verringern. Nachdem die Proteinbanden aus dem Gel getrennt wurden, wurde jede Bande in 10 Fraktionen aufgeteilt und die enthaltenen Proteine mit 10 µg/µl Trypsin je Bande verdaut. Die entstandenen Peptide wurden aus dem Gel extrahiert, jeweils 2 Fraktionen vereinigt und eine C₁₈ Aufreinigung (Fa. Merck Millipore) durchgeführt. Abschließend wurden 5 Fraktionen von jeder Probe in einem nanoLC System separiert (Dionex UltiMate 3000, Fa. Dionex/Thermo Fisher Scientific), mittels TriVersa NanoMate (Fa. Advion, Ltd.), ionisiert und im Massenspektrometer (Q Exactive™ Hybrid-Quadrupol-Orbitrap, Fa. Thermo Fisher Scientific) gemessen.

Zur Analyse des Proteinprofils wurden drei unabhängige biologische Replikate genutzt.

4.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die gewünschten Proteine spezifisch detektieren zu können, mussten diese zunächst aus dem isolierten Proteingemisch durch die SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die für diese Proteinauftrennung im elektrischen Feld nötige Vorbehandlung der Proben wird im Folgenden beschrieben.

Probenvorbereitung

Von jeder Probe wurde das Volumen für 25 µg in 1,5 ml Reagiergefäße vorgelegt. Anschließend wurde mittels UP-Wasser das Volumen jeder Probe angeglichen und 5-fach Ladepuffer hinzugegeben. Der Ladepuffer enthielt 2-Mercaptoethanol, welcher die Disulfidbrücken der Proteine reduziert. Anschließend wurden die Proben in einem Heizblock bei 95 °C für 5 min inkubiert. Dies führte zur Linearisierung der Proteine. Ebenfalls wurden diese, durch das im Puffer befindliche SDS, negativ geladen, wodurch die Proteine in der darauffolgenden Gelelektrophorese lediglich nach ihrer Größe [kDa] im elektrischen Feld aufgetrennt wurden.

Elektrophorese

Zunächst wurde das Polyacrylamidgel (5% Sammelgel, 10% Trenngel) in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1-fach Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden

25 µg Proteinlösung in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung der Bandengrößen wurde eine Markerkontrolle mitgeführt, in welche 5 µl Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fa. Thermo Fisher Scientific) geladen waren. Nun wurde eine Gleichspannung von 80 V für 30 min (Sammeln der Proteine zum zeitgleichen Übergang vom Sammel- in das Trenngel) und anschließend von 120 V (Auftrennung im Trenngel, ca. 90 min) angelegt.

4.2.2.7 Western Blot

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde das *Wet*-Blot-Prinzip verwendet. Dafür wurden zunächst die Blotting-Schwämme (Faser-Matten für Web™ S, 2 Matten 180×245 mm; Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH), Blotting-Papiere (Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm; Fa. Roth) und die Nitrozellulosemembran in 1x *Wet*-Blot Puffer für ca. 15 min zum äquilibrieren eingelegt. Anschließend wurden die Blotting-Kassetten (Blotting-Kassetten für Web™ S; Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH) von der Kathodenseite her aufgebaut. Das heißt, es wurden zwei Blotting-Schwämme, drei Blotting-Papiere, die Nitrozellulosemembran und das Gel in die Blotting-Kassette gelegt. Schließlich folgten drei weitere Blotting-Papiere sowie drei Blotting-Schwämme. Um eine störungsfreie Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran zu gewährleisten, wurden nach jeder neuen Schicht mögliche Luftblasen durch das Überrollen mit einer Stabpipette entfernt. Abschließend wurde die nun beladene Blotting-Kassette in die *Wet*-Blot-Kammer überführt und mit 1-fach *Wet*-Blot Puffer befüllt. Der Transfer fand gekühlt bei 4 °C auf Eis und einer angelegten Gleichspannung von 90 V für 1 h statt.

Immunochemischer Nachweis

Zunächst wurden freie Bindungsstellen durch die Blockierungslösung bei 4 °C über Nacht abgesättigt. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal mit jeweils 10 ml 1-fach TBS-T gewaschen und anschließend mit den primären Antikörpern (siehe Tabelle 4-10) für NAMPT und Aktin als Kontrolle inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das dreimalige Waschen der Membran mit je 10 ml TBS-T Puffer. Anschließend wurden die Sekundärantikörper hinzugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen wurde die Membran mit 300 µl ECL-Lösung überschichtet. Die Dokumentation des Bandenmusters erfolgte mittels Geldokumentationssystem. Die abschließende Quantifizierung der spezifischen Banden erfolgte mit der Software *Lab Image 1D*. Hierbei wurde die Intensität der NAMPT Banden gegen die dazugehörigen Aktin Banden normalisiert.

4.2.2.8 Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA)

In dieser Arbeit wurde der ELISA zur Messung von sekretiertem CXCL8 in Zell- und Gewebekulturen nachzuweisen. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Die Messung der Konzentration an CXCL8 in den Überständen erfolgte mittels Photometer (Infinite[®] M200 PRO; Fa. TECAN).

4.2.2.9 Durchflusszytometrische Zytotoxizitätsbestimmung

Um den durch *S. pneumoniae* induzierten Zelltod der Epithelzellen analysieren und quantifizieren zu können, wurde die Durchflusszytometrie mit dem Muse[®] Annexin V and Dead Cell Assay Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt

Dafür wurden die Überstände einer infizierten Zellkultur bzw. der entsprechenden Kontrollzellen abgenommen und in 2 ml Reagiergefäße überführt. Dann wurde der Zellrasen durch die Behandlung mit 300 µl T/E + 0,5% PVP pro 4 cm² und anschließender Inkubation für 4 min bei 37 °C abgelöst. Nach erfolgreicher Ablösung der Zellen wurden die Vertiefungen der Platte mit den jeweiligen Überständen gespült und in die Reagiergefäße überführt, wodurch ein möglichst geringer Verlust an Zellen gewährleistet werden sollte. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation bei 200 x g und 22 °C für 10 min um die Zellen zu pelletieren.

Anschließend wurde der entstandene Überstand verworfen und das Pellet in 1,2 ml 1% FKS in 1x PBS resuspendiert. Hiervon wurden nun 75 µl in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und mit der Färbelösung des Kits im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach der Inkubation von 20 min im Dunkeln wurden die Proben mittels Durchflusszytometer gemessen.

Die Einstellung der Messparameter erfolgte mit Hilfe einer nicht stimulierten Kontrollprobe. Dadurch wurden die Parameter Größe und Granularität mittels *Forward-* und *Side-Scatter* (FSC und SSC) der Zellpopulation festgelegt und diese von den Zelltrümmern getrennt. Die eigentliche Messung der gefärbten Zellen erfolgte nur mit dieser Zellpopulation mit Hilfe der Filter *Yellow* (583/26 nm; Annexin-V) und *Red* (680/30 nm; 7-AAD). Hierbei ergab die Verschiebung der Zellpopulation im Vergleich zu den Kontrollzellen einen Hinweis auf den Zustand der Zellen. Früh apoptotische Zellen weisen eine Verschiebung nach rechts in den Annexin-V positiven Bereich auf. Sind die Zellen bereits im Zustand der späten Apoptose, erfolgt eine Verschiebung der Population nach oben rechts, das heißt in den doppelt positiven Quadranten. Wenn sich die Population nur nach oben in den 7-AAD positiven Bereich verschob, war der vollständige Zelltod eingetreten. Vitale Zellen sind demnach komplett

ungefärbt und verbleiben in der doppelt negativen Fraktion des Rasters. In allen Messungen wurden 5000 bis 10000 Events gezählt.

Die Auswertung dieser verschiedenen Vitalitätsstadien erfolgte durch die Quantifizierung des Prozentanteils der verschiedenen Zellpopulationen mit Hilfe der Software FlowJo®. So wurde zwischen den nicht angefärbten vitalen Zellen, den Annexin-V positiven früh apoptotischen Zellen und den toten Zellen, welche sich aus den Zellpopulationen der später Apoptose und der doppeltpositiven Fraktion zusammensetzte, unterschieden.

4.3 Statistik

4.3.1 Statistische Auswertung der Zellkultur- und Gewebeanalysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den BEAS-2B und Lungengewebe-Experimenten erfolgte anhand der log₂-transformierten Daten mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 6 oder mittels der Software R unter Verwendung der Pakete „Car“ und „agricolae“. Die jeweils angewandten statistischen Tests sind in den Abbildungsunterschriften erläutert. Das Signifikanzniveau beträgt $p \leq 0,05$.

4.3.2 Statistik der Hochdurchsatzdaten

4.3.2.1 Proteinprofil-Analyse

Die statistische Auswertung der Proteinprofil-Analyse wurde durch Dr. Kristin Surmann, Sascha Blankenburg und Dr. Manuela Gesell Salazar (Arbeitsgruppe Prof. Uwe Völker, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald) durchgeführt. Dazu wurde die massenspektrometrisch gewonnenen Rohdaten (aus 4.2.2.5) mittels Proteome Discoverer™ 1.4 (Fa. Thermo Fisher Scientific) gegen eine humane Datenbank (Uniprot) abgeglichen. Für die weitere Auswertung wurden ausschließlich detektierte Proteine verwendet, welche mit mindestens zwei Peptiden oder einem Peptid, aber wenigstens 10% Sequenzabdeckung (für kleine Proteine), identifiziert wurden. Zudem mussten diese Proteine in mindestens zwei von drei biologischen Replikaten detektiert worden sein. Die *False Discovery Rate* (FDR) für die Identifikation von Peptiden wurde auf <1% definiert.

Zur Normalisierung der Daten wurden die Mittelwerte der biologischen Triplikate herangezogen. Dafür wurde der Mittelwert der SILAC Verhältnisse zwischen Standard und Experiment aller Proteine einer Probe ermittelt. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte über die leichte (infizierte Experiment-) und schwere (globaler SILAC Standard-) Version jedes Peptides. Diese Versionen unterschieden sich lediglich in ihrer Masse durch die Markierung mit

den schweren Isotopen von Lysin und Arginin. Zur Berechnung der Verhältnisse zwischen leichten und schweren Peptiden wurde das Programm Proteome Discoverer™ 1.4 (Fa. Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zusätzlich wurde die Detektion von sogenannten *ON/OFF* Proteinen vorgenommen. Diese Proteine müssen in allen drei biologischen Replikaten einer Bedingung (Kontrolle oder Infektion) vorliegen, aber in keinem Replikat der anderen Bedingung auftreten. Da hier demzufolge keine Verhältnisse berechnet werden konnten, wurden diese künstlich auf 1000 (*ON*-Proteine) bzw. 0,001 (*OFF*-Proteine) gesetzt. Als Kriterien für eine Regulation wurde sowohl eine Änderung der Expression (bzw. des Vorkommens) eines Proteins von $\leq/\geq 1,5$ gegenüber der Kontrolle, sowie ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt. Die statistische Analyse wurde mittels Genedata Analyst v9.0 software (Fa. Genedata AG) durchgeführt und die Korrektur nach Benjamini-Hochberg gewählt.

4.3.2.2 Transkriptomanalyse

Die statistische Auswertung der *Microarray*-Analysen wurde von Dr. Jochen Wilhelm (Justus-Liebig-Universität, Gießen) durchgeführt. Hierfür wurde nach der Publikation von Wolff und Kollegen vorgegangen (Wolff *et al.* 2010). Es wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ für die weiteren Analysen verwendet.

Die statistische Auswertung der mRNA Expressionsdaten nach miRNA-3135b Überexpression wurde unter Verwendung der *CLC genomics workbench* (Fa. Qiagen) von Dr. Wilhelm Bertrams durchgeführt. Es wurde *das rna seq protocol* v10.01 verwendet und gegen das humane Genom HG19 kartiert. Die für die weiteren Analysen genutzten mRNAs mussten eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ aufweisen.

4.3.2.3 miRNA-Profil-Analyse

Die statistische Auswertung der miRNA Expressionsdaten wurde unter Verwendung der *CLC genomics workbench* (Fa. Qiagen) von Dr. Wilhelm Bertrams durchgeführt. Hierfür wurde das *small rna protocol default parameter* v10.01 (Fa. Qiagen) genutzt. Die für die Analysen genutzten miRNAs mussten eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ aufweisen.

4.3.2.4 Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*)

Die Durchführung der PCA in dieser Arbeit wurde von Dr. Wilhelm Bertrams vorgenommen (Bertrams 2014).

4.3.2.5 Heatmaps des miRNA-Profiles

Die *heatmaps* in dieser Arbeit wurden mit dem internetbasierten Tool ClustVis (Metsalu & Vilo 2015) erstellt. Dabei repräsentieren die Spalten die Behandlung und die Zeilen die miRNAs. Für

diese wurde eine Vektorskalierung durchgeführt. Der Clustering-Abstand der Spalten wurde auf euklidisch, der Abstand der Reihe auf Korrelation festgelegt. Die Organisation des Dendrogramms erfolgte mit aufsteigender Distanz der einzelnen Interaktionspartner. Es wurden die normalisierten Sequenzanzahlen zur Erstellung der *heatmaps* verwendet.

5 APPENDIX

DATENVERZEICHNIS

Pdf-Datei der gesamten Arbeit

Excel-Dateien:

- **Microarray komplett:** alle Daten der Messung
- **Microarray exprimiert und protein-kodierende mRNAs:** 1. alle exprimierten Sequenzen und 2. nur alle exprimierten, protein-kodierende mRNAs
- **miRNA-Sequenzierung:** alle signifikant ($p \leq 0,05$) regulierten miRNAs
- **miRNA-3135b mRNA-Sequenzierung:** Sequenzierungsergebnisse nach Überexpression der miRNA-3135b mit 1. *mimic*-Transfektion mit *S. p.* vs. *mimic*-Transfektion; 2. miRNA-Überexpression vs. *mimic*-Transfektion; 3. miRNA-Überexpression mit *S. p.* vs. *mimic*-Transfektion mit *S. p.*; 4. miRNA-Überexpression mit *S. p.* vs. miRNA-Überexpression
- **miRNA-3135b target prediction:** vorhergesagte Ziel-mRNAs aus den Datenbanken targetscan und miRdb
- **miRNA-Sequenzierung** für die Bedingungen LP 9 h vs. Ktr 9 h; LP 16 h vs. Ktr 16 h; MOI 1 9 h vs.- Ktr 9 h; MOI 1 16 h vs. Ktr 16 h; MOI 0,5 9 h vs. Ktr 9 h, MOI 0,5 16 h vs. Ktr 16 h
- **Proteomics:** Messergebnisse und Auswertungen unterteilt in 1. alle drei biologischen Replikate und 2. zwei von drei biologischen Replikaten
- **Signifikant regulierte Signalwege auf Basis der mRNA-Daten (Microarray)** ($q \leq 0,05$)

REFERENZEN

- Aalaei-andabili SHund Rezaei N (2013). Toll like receptor (TLR)-induced differential expression of microRNAs (MiRs) promotes proper immune response against infections: a systematic review. *The Journal of infection* 67(4): 251-264. doi 10.1016/j.jinf.2013.07.016
- Ablain J, Durand EM, *et al.* (2015). A CRISPR/Cas9 Vector System for Tissue-Specific Gene Disruption in Zebrafish. *Dev Cell* 32(6): 756-764. doi 10.1016/j.devcel.2015.01.032
- Adriouch S, Hubert S, *et al.* (2007). NAD(+) released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *Journal of Immunology* 179(1): 186-194. doi DOI 10.4049/jimmunol.179.1.186
- Agarwal V, Bell GW, *et al.* (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4. doi 10.7554/eLife.05005
- Akira S, Uematsu S, *et al.* (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4): 783-801. doi 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Aksoy S, Szumlanski CL, *et al.* (1994). Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *The Journal of biological chemistry* 269(20): 14835-14840
- Albiger B, Dahlberg S, *et al.* (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular microbiology* 9(3): 633-644. doi 10.1111/j.1462-5822.2006.00814.x
- Albiger B, Sandgren A, *et al.* (2005). Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cellular microbiology* 7(11): 1603-1615. doi 10.1111/j.1462-5822.2005.00578.x
- Alhamdi Y, Neill DR, *et al.* (2015). Circulating Pneumolysin Is a Potent Inducer of Cardiac Injury during Pneumococcal Infection. *PLoS pathogens* 11(5). doi UNSP e100483610.1371/journal.ppat.1004836
- Ameres SLund Zamore PD (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology* 14(8): 475-488. doi 10.1038/nrm3611
- Aprianto R, Slager J, *et al.* (2016). Time-resolved dual RNA-seq reveals extensive rewiring of lung epithelial and pneumococcal transcriptomes during early infection. *Genome biology* 17(1): 198. doi 10.1186/s13059-016-1054-5
- Audic Y, Boyle B, *et al.* (2001). Cyclin E morpholino delays embryogenesis in Xenopus. *Genesis* 30(3): 107-109. doi Doi 10.1002/Gene.1041
- Auray G, Lacroix-Lamande S, *et al.* (2007). Involvement of intestinal epithelial cells in dendritic cell recruitment during *C. parvum* infection. *Microbes and infection* 9(5): 574-582. doi 10.1016/j.micinf.2007.01.026
- Auyeung VC, Ulitsky I, *et al.* (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152(4): 844-858. doi 10.1016/j.cell.2013.01.031
- Avery OTund Dubos R (1931). The Protective Action of a Specific Enzyme against Type Iii Pneumococcus Infection in Mice. *The Journal of experimental medicine* 54(1): 73-89
- Babetto E, Beirowski B, *et al.* (2010). Targeting NMNAT1 to axons and synapses transforms its neuroprotective potency in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(40): 13291-13304. doi 10.1523/JNEUROSCI.1189-10.2010
- Bakaletz LO (2004). Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nature reviews Microbiology* 2(7): 552-568. doi 10.1038/nrmicro928
- Balachandran P, Hollingshead SK, *et al.* (2001). The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *Journal of bacteriology* 183(10): 3108-3116. doi 10.1128/JB.183.10.3108-3116.2001

- Baron RM, Choi AJ, *et al.* (2012). Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 302(6): L485-497. doi 10.1152/ajplung.00085.2011
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-297
- Bartel DP (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2): 215-233. doi 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bauer CM, Zavitz CC, *et al.* (2010). Treating viral exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: insights from a mouse model of cigarette smoke and H1N1 influenza infection. *PloS one* 5(10): e13251. doi 10.1371/journal.pone.0013251
- Bauer S, Kirschning CJ, *et al.* (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16): 9237-9242. doi 10.1073/pnas.161293498
- Begley TP, Kinsland C, *et al.* (2001). The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitam Horm* 61: 103-119
- Belenky P, Bogan KL, *et al.* (2007). NAD(+) metabolism in health and disease. *Trends in biochemical sciences* 32(1): 12-19. doi 10.1016/j.tibs.2006.11.006
- Berendt RF, Long GG, *et al.* (1975). Influenza alone and in sequence with pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* in the squirrel monkey. *The Journal of infectious diseases* 132(6): 689-693
- Berg J, Zscheppang K, *et al.* (2017). Tyk2 as a target for immune regulation in human viral/bacterial pneumonia. *The European respiratory journal* 50(1). doi 10.1183/13993003.01953-2016
- Berger F, Lau C, *et al.* (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *The Journal of biological chemistry* 280(43): 36334-36341. doi 10.1074/jbc.M508660200
- Berger F, Ramirez-Hernandez MH, *et al.* (2004). The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in biochemical sciences* 29(3): 111-118. doi 10.1016/j.tibs.2004.01.007
- Berndt WO (1976). Use of Tissue Slice Technique for Evaluation of Renal Transport Processes. *Environ Health Persp* 15(Jun): 73-88. doi Doi 10.2307/3428390
- Bertrams W (2014) MicroRNAs in alternative and classic activation of macrophage. doctoral, Humboldt-Universität zu Berlin
- Bi TQ, Che XM, *et al.* (2011). Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the Nampt inhibitor FK866 in combination with fluorouracil. *Oncol Rep* 26(5): 1251-1257. doi 10.3892/or.2011.1378
- Bieganowski Pund Brenner C (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans. *Cell* 117(4): 495-502
- Billington RA, Genazzani AA, *et al.* (2008). NAD depletion by FK866 induces autophagy. *Autophagy* 4(3): 385-387. doi Doi 10.4161/Auto.5635
- Blasi F, Mantero M, *et al.* (2012). Understanding the burden of pneumococcal disease in adults. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 Suppl 5: 7-14. doi 10.1111/j.1469-0691.2012.03937.x
- Bogaert D, De Groot R, *et al.* (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious diseases* 4(3): 144-154. doi 10.1016/S1473-3099(04)00938-7
- Böhm D (2017) The role of CHI3L1 in post-viral bacterial pneumonia. Master thesis, Philipps-Universität Marburg

- Booth JL, Coggeshall KM, *et al.* (2004). Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *Journal of virology* 78(8): 4156-4164
- Bootsma HJ, Egmont-Petersen M, *et al.* (2007). Analysis of the in vitro transcriptional response of human pharyngeal epithelial cells to adherent *Streptococcus pneumoniae*: evidence for a distinct response to encapsulated strains. *Infection and immunity* 75(11): 5489-5499. doi 10.1128/IAI.01823-06
- Branger J, Knapp S, *et al.* (2004). Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infection and immunity* 72(2): 788-794
- Baun J und Dalhoff K (2018). <http://www.pneumonie-aktuell.de/>
- Brown ED und Wright GD (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 529(7586): 336-343. doi 10.1038/nature17042
- Brown JS, Hussell T, *et al.* (2002). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26): 16969-16974. doi 10.1073/pnas.012669199
- Brown SA, Palmer KL, *et al.* (2008). Revisiting the host as a growth medium. *Nature Reviews Microbiology* 6(9): 657-666. doi 10.1038/nrmicro1955
- Buchon N, Broderick NA, *et al.* (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell host & microbe* 5(2): 200-211. doi 10.1016/j.chom.2009.01.003
- Burgos ES und Schramm VL (2008). Weak coupling of ATP hydrolysis to the chemical equilibrium of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* 47(42): 11086-11096. doi 10.1021/bi801198m
- Burkhard P (2017) Einfluss von *Streptococcus pneumoniae* auf bronchiale Epithelzellen. Master thesis, Philipps-Universität Marburg
- Busso N, Karababa M, *et al.* (2008). Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PloS one* 3(5): e2267. doi 10.1371/journal.pone.0002267
- Cabantous S, Hou XY, *et al.* (2017). Evidence for an important role of host microRNAs in regulating hepatic fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 47(13): 823-830. doi 10.1016/j.ijpara.2017.05.007
- Calin GA, Dumitru CD, *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(24): 15524-15529. doi 10.1073/pnas.242606799
- Cao X, Surma MA, *et al.* (2012). Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell research* 22(5): 793-805. doi 10.1038/cr.2012.64
- CDC (2016). <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>
- Cea M, Zoppoli G, *et al.* (2009). APO866 activity in hematologic malignancies: a preclinical in vitro study. *Blood* 113(23): 6035-6037. doi DOI 10.1182/blood-2009-03-209213
- Cen Y, Youn DY, *et al.* (2011). Advances in characterization of human sirtuin isoforms: chemistries, targets and therapeutic applications. *Current medicinal chemistry* 18(13): 1919-1935
- Chakrabarty K, Wu W, *et al.* (2007). Human lung innate immune response to *Bacillus anthracis* spore infection. *Infection and immunity* 75(8): 3729-3738. doi 10.1128/IAI.00046-07
- Chamnanchanunt S, Kuroki C, *et al.* (2015). Downregulation of plasma miR-451 and miR-16 in *Plasmodium vivax* infection. *Experimental parasitology* 155: 19-25. doi 10.1016/j.exppara.2015.04.013
- Chan MC, Chan RW, *et al.* (2010). Tropism and innate host responses of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in ex vivo and in vitro cultures of human conjunctiva and respiratory

- tract. The American journal of pathology 176(4): 1828-1840. doi 10.2353/ajpath.2010.091087
- Chan RW, Hemida MG, *et al.* (2014). Tropism and replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus from dromedary camels in the human respiratory tract: an in-vitro and ex-vivo study. The Lancet Respiratory medicine 2(10): 813-822. doi 10.1016/S2213-2600(14)70158-4
- Chandrasekaran Sund Caparon MG (2015). The Streptococcus pyogenes NAD(+) glycohydrolase modulates epithelial cell PARylation and HMGB1 release. Cellular microbiology 17(9): 1376-1390. doi 10.1111/cmi.12442
- Chang J, Guo JT, *et al.* (2008). Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. Journal of virology 82(16): 8215-8223. doi 10.1128/JVI.02575-07
- Chawla A, Nguyen KD, *et al.* (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. Nature Reviews Immunology 11(11): 738-749. doi 10.1038/nri3071
- Chen A, Li HS, *et al.* (2005). Gene expression profiles of early pneumococcal otitis media in the rat. International journal of pediatric otorhinolaryngology 69(10): 1383-1393. doi 10.1016/j.ijporl.2005.03.033
- Chen F, Yang J, *et al.* (2017). Circulating microRNAs as novel biomarkers for heart failure. Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese. doi 10.1016/j.hjc.2017.10.002
- Chen XY, Zhang HS, *et al.* (2013). Down-regulation of NAMPT expression by miR-182 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation. The international journal of biochemistry & cell biology 45(2): 292-298. doi 10.1016/j.biocel.2012.11.002
- Cho SW, Kim S, *et al.* (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31(3): 230-232. doi 10.1038/nbt.2507
- Cloonan N (2015). Re-thinking miRNA-mRNA interactions: intertwining issues confound target discovery. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 37(4): 379-388. doi 10.1002/bies.201400191
- Coimbra RS, Voisin V, *et al.* (2006). Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. BMC biology 4: 15. doi 10.1186/1741-7007-4-15
- Colino Jund Snapper CM (2003). Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact Streptococcus pneumoniae. Journal of Immunology 171(5): 2354-2365. doi DOI 10.4049/jimmunol.171.5.2354
- Conforti L, Janeckova L, *et al.* (2011). Reducing expression of NAD⁺ synthesizing enzyme NMNAT1 does not affect the rate of Wallerian degeneration. The FEBS journal 278(15): 2666-2679. doi 10.1111/j.1742-4658.2011.08193.x
- Conforti L, Wilbrey A, *et al.* (2009). Wld S protein requires Nmnat activity and a short N-terminal sequence to protect axons in mice. The Journal of cell biology 184(4): 491-500. doi 10.1083/jcb.200807175
- Coonrod JDund Rylko-Bauer B (1977). Complement levels in pneumococcal pneumonia. Infection and immunity 18(1): 14-22
- Cooper G, Rosenstein C, *et al.* (1932). The Further Separation of Types among the Pneumococci Hitherto Included in Group Iv and the Development of Therapeutic Antisera for These Types. The Journal of experimental medicine 55(4): 531-554
- Curtale G, Mirolo M, *et al.* (2013). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(28): 11499-11504. doi 10.1073/pnas.1219852110
- Dagan R, Givon-Lavi N, *et al.* (2002). Reduction of nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. The Journal of infectious diseases 185(7): 927-936. doi 10.1086/339525

- Dahl TB, Holm S, *et al.* (2012). Visfatin/NAMPT: A Multifaceted Molecule with Diverse Roles in Physiology and Pathophysiology. *Annu Rev Nutr* 32: 229-+. doi 10.1146/annurev-nutr-071811-150746
- Dallaire F, Ouellet N, *et al.* (2001). Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia. *The Journal of infectious diseases* 184(3): 292-300. doi 10.1086/322021
- Dallas PB, Gottardo NG, *et al.* (2005). Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR - how well do they correlate? *BMC genomics* 6. doi Artn 5910.1186/1471-2164-6-59
- Davies CA, Perrett D, *et al.* (1999). Simultaneous analysis of nitrite, nitrate and the nicotinamide nucleotides by capillary electrophoresis: Application to biochemical studies and human extracellular fluids. *Electrophoresis* 20(10): 2111-2117
- Dawood FS, Iuliano AD, *et al.* (2012). Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet Infectious diseases* 12(9): 687-695. doi 10.1016/S1473-3099(12)70121-4
- Denli AM, Tops BB, *et al.* (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432(7014): 231-235. doi 10.1038/nature03049
- Dhahbi JM, Spindler SR, *et al.* (2014). Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5' tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer. *Biomarkers in cancer* 6: 37-47. doi 10.4137/BIC.S20764
- Di Stefano M, Galassi L, *et al.* (2010). Unique expression pattern of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isozymes in red blood cells. *Blood cells, molecules & diseases* 45(1): 33-39. doi 10.1016/j.bcmd.2010.04.003
- Didierlaurent A, Goulding J, *et al.* (2008). Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *The Journal of experimental medicine* 205(2): 323-329. doi 10.1084/jem.20070891
- Dietrich LS, Muniz O, *et al.* (1968). NAD synthesis in animal tissues. *The Journal of vitaminology* 14: Suppl:123-129
- Domergue R, Castano I, *et al.* (2005). Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308(5723): 866-870. doi 10.1126/science.1108640
- Dromann D, Rupp J, *et al.* (2010). The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Respiratory research* 11: 67. doi 10.1186/1465-9921-11-67
- Drury RE, O'Connor D, *et al.* (2017). The Clinical Application of MicroRNAs in Infectious Disease. *Frontiers in immunology* 8: 1182. doi 10.3389/fimmu.2017.01182
- Du Bois I, Marsico A, *et al.* (2016). Genome-wide Chromatin Profiling of *Legionella pneumophila*-Infected Human Macrophages Reveals Activation of the Probacterial Host Factor TNFAIP2. *The Journal of infectious diseases* 214(3): 454-463. doi 10.1093/infdis/jiw171
- Durnin L, Hwang SJ, *et al.* (2012). Adenosine 5-diphosphate-ribose is a neural regulator in primate and murine large intestine along with beta-NAD(+). *The Journal of physiology* 590(8): 1921-1941. doi 10.1113/jphysiol.2011.222414
- Eichhorn SW, Guo H, *et al.* (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell* 56(1): 104-115. doi 10.1016/j.molcel.2014.08.028
- Essandoh K, Li Y, *et al.* (2016). MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* 46(2): 122-131. doi 10.1097/SHK.0000000000000604
- Esteller M (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews Genetics* 12(12): 861-874. doi 10.1038/nrg3074

- Fatykhova D, Rabes A, *et al.* (2015). Serotype 1 and 8 Pneumococci Evade Sensing by Inflammasomes in Human Lung Tissue. *PloS one* 10(8): e0137108. doi 10.1371/journal.pone.0137108
- Feldman Cund Anderson R (2016). Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. *F1000Research* 5: 2320. doi 10.12688/f1000research.9283.1
- Fernando FS, Conforti L, *et al.* (2002). Human homologue of a gene mutated in the slow Wallerian degeneration (C57BL/Wld(s)) mouse. *Gene* 284(1-2): 23-29
- Festing Sund Wilkinson R (2007). The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO reports* 8(6): 526-530. doi 10.1038/sj.embor.7400993
- Friedman RC, Farh KK, *et al.* (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19(1): 92-105. doi 10.1101/gr.082701.108
- Fruscione F, Scarfi S, *et al.* (2011). Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD⁺ release and P2Y₁₁-mediated signaling. *Stem cells and development* 20(7): 1183-1198. doi 10.1089/scd.2010.0295
- Fulcher ML, Gabriel S, *et al.* (2005). Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods in molecular medicine* 107: 183-206
- Ganbat D, Seehase S, *et al.* (2016). Mycobacteria infect different cell types in the human lung and cause species dependent cellular changes in infected cells. *BMC pulmonary medicine* 16: 19. doi 10.1186/s12890-016-0185-5
- Gao W, Mao Q, *et al.* (2011). Inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor attenuates inflammation and apoptosis induced by pandemic H1N1 2009 in lung endothelium. *Respiratory physiology & neurobiology* 178(2): 235-241. doi 10.1016/j.resp.2011.06.016
- Garcia JGNund Vinasco LM (2006). Genomic insights into acute inflammatory lung injury. *Am J Physiol-Lung C* 291(6): L1113-L1117. doi 10.1152/ajplung.00266.2006
- Garten A, Petzold S, *et al.* (2009). Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20(3): 130-138. doi 10.1016/j.tem.2008.10.004
- Garten A, Schuster S, *et al.* (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nature reviews Endocrinology* 11(9): 535-546. doi 10.1038/nrendo.2015.117
- Gazanion E, Garcia D, *et al.* (2011). The Leishmania nicotinamidase is essential for NAD(+) production and parasite proliferation. *Molecular microbiology* 82(1): 21-38. doi 10.1111/j.1365-2958.2011.07799.x
- Geno KA, Gilbert GL, *et al.* (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clinical microbiology reviews* 28(3): 871-899. doi 10.1128/CMR.00024-15
- Gladman AS, Matsumoto EA, *et al.* (2016). Biomimetic 4D printing. *Nature materials* 15(4): 413-418. doi 10.1038/nmat4544
- Goodarzi H, Liu XH, *et al.* (2015). Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. *Cell* 161(4): 790-802. doi 10.1016/j.cell.2015.02.053
- Gould JMund Weiser JN (2002). The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *The Journal of infectious diseases* 186(3): 361-371. doi 10.1086/341658
- Grahnert A, Grahnert A, *et al.* (2011). NAD(+): A modulator of immune functions. *Innate immunity* 17(2): 212-233. doi 10.1177/1753425910361989
- Granat SM, Mia Z, *et al.* (2007). Longitudinal study on pneumococcal carriage during the first year of life in Bangladesh. *The Pediatric infectious disease journal* 26(4): 319-324. doi 10.1097/01.inf.0000257425.24492.11
- Griffith F (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of hygiene* 27(2): 113-159
- Griss K, Bertrams W, *et al.* (2016). MicroRNAs Constitute a Negative Feedback Loop in Streptococcus pneumoniae-Induced Macrophage Activation. *The Journal of infectious diseases* 214(2): 288-299. doi 10.1093/infdis/jiw109

- Grolla AA, Travelli C, *et al.* (2016). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *British journal of pharmacology* 173(14): 2182-2194. doi 10.1111/bph.13505
- Grose JH, Bergthorsson U, *et al.* (2005). Assimilation of nicotinamide mononucleotide requires periplasmic AphA phosphatase in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology* 187(13): 4521-4530. doi 10.1128/Jb.13.4521-4530.2005
- Gruhler Sund Kratchmarova I (2008) Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). In: A. P (ed) In: 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation Methods in Molecular Biology™. Humana Press.
- Guo XK, Zhang Q, *et al.* (2013). Increasing expression of microRNA 181 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and has implications for controlling virus infection. *Journal of virology* 87(2): 1159-1171. doi 10.1128/JVI.02386-12
- Ha Mund Kim VN (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 15(8): 509-524. doi 10.1038/nrm3838
- Hahn H, Falke D, *et al.* (2001) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Verlag.
- Hamon MA, Batsche E, *et al.* (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(33): 13467-13472. doi 10.1073/pnas.0702729104
- Han SH, Kim JH, *et al.* (2003). Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infection and immunity* 71(10): 5541-5548
- Han Y, Dai QC, *et al.* (2016). Diagnostic value of elevated serum miRNA-143 levels in sepsis. *The Journal of international medical research* 44(4): 875-881. doi 10.1177/0300060516645003
- Hara N, Yamada K, *et al.* (2007). Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. *The Journal of biological chemistry* 282(34): 24574-24582. doi 10.1074/jbc.M610357200
- Hara N, Yamada K, *et al.* (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PloS one* 6(8): e22781. doi 10.1371/journal.pone.0022781
- Hare KM, Morris P, *et al.* (2008). Random colony selection versus colony morphology for detection of multiple pneumococcal serotypes in nasopharyngeal swabs. *The Pediatric infectious disease journal* 27(2): 178-180. doi 10.1097/INF.0b013e31815bb6c5
- Harford CGund Hara M (1950). Pulmonary Edema in Influenzal Pneumonia of the Mouse and the Relation of Fluid in the Lung to the Inception of Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of experimental medicine* 91(3): 245-260
- Harford CG, Leidler V, *et al.* (1949). Effect of the lesion due to Influenza Virus on the resistance of mice to inhaled pneumococci. *The Journal of experimental medicine* 89(1): 53-68
- Harford CG, Smith MR, *et al.* (1945). The effect of superimposed bacterial pneumonia on the severity of sublethal infection with influenza virus. *Proc Annu Meet Cent Soc Clin Res U S* 18: 13
- Hasenberg M, Stegemann-Koniszewski S, *et al.* (2013). Cellular immune reactions in the lung. *Immunological reviews* 251(1): 189-214. doi 10.1111/imr.12020
- Hashimoto M, Tawaratsumida K, *et al.* (2006). Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 177(5): 3162-3169
- Hasmann Mund Schemainda I (2003a). FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer research* 63(21): 7436-7442
- Hasmann Mund Schemainda I (2003b). FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer research* 63(21): 7436-7442

- Hassa P Ound Hottiger MO (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13: 3046-3082
- Heasman J, Kofron M, *et al.* (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Developmental biology* 222(1): 124-134. doi 10.1006/dbio.2000.9720
- Heidelberger Mund Avery OT (1923). The Soluble Specific Substance of Pneumococcus. *The Journal of experimental medicine* 38(1): 73-79
- Heidelberger Mund Avery OT (1924). The Soluble Specific Substance of Pneumococcus : Second Paper. *The Journal of experimental medicine* 40(3): 301-317
- Henneke P, Morath S, *et al.* (2005). Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J Immunol* 174(10): 6449-6455
- Herbert M, Sauer E, *et al.* (2003). Nicotinamide ribosyl uptake mutants in *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity* 71(9): 5398-5401. doi 10.1128/iai.71.9.5398-5401.2003
- Hinshaw VS, Olsen CW, *et al.* (1994). Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *Journal of virology* 68(6): 3667-3673
- Hocke AC, Becher A, *et al.* (2013a). Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 188(7): 882-886. doi 10.1164/rccm.201305-0954LE
- Hocke AC, Berg J, *et al.* (2013b). Reply to Fujino *et al.* *The Journal of infectious diseases* 207(4): 693-695. doi 10.1093/infdis/jis740
- Hoffmann J, Machado D, *et al.* (2016). Viral and bacterial co-infection in severe pneumonia triggers innate immune responses and specifically enhances IP-10: a translational study. *Scientific reports* 6: 38532. doi 10.1038/srep38532
- Hopkins PAund Sriskandan S (2005). Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clinical and experimental immunology* 140(3): 395-407. doi 10.1111/j.1365-2249.2005.02801.x
- Horvath Pund Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* 327(5962): 167-170. doi 10.1126/science.1179555
- Hover BM, Kim SH, *et al.* (2018). Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nature microbiology*. doi 10.1038/s41564-018-0110-1
- Howard LVund Gooder H (1974). Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 117(2): 796-804
- Hsieh CH, Rau CS, *et al.* (2012). Whole blood-derived microRNA signatures in mice exposed to lipopolysaccharides. *Journal of biomedical science* 19: 69. doi 10.1186/1423-0127-19-69
- Hsieh CH, Yang JC, *et al.* (2013). Circulating microRNA signatures in mice exposed to lipoteichoic acid. *Journal of biomedical science* 20: 2. doi 10.1186/1423-0127-20-2
- Huang J, Wang F, *et al.* (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature medicine* 13(10): 1241-1247. doi 10.1038/nm1639
- Huang N, De Ingeniis J, *et al.* (2009). Structure and Function of an ADP-Ribose-Dependent Transcriptional Regulator of NAD Metabolism. *Structure* 17(7): 939-951. doi 10.1016/j.str.2009.05.012
- Huh D, Hamilton GA, *et al.* (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology* 21(12): 745-754. doi 10.1016/j.tcb.2011.09.005
- Huntzinger Eund Izaurralde E (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics* 12(2): 99-110. doi 10.1038/nrg2936

- Imai S (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Current pharmaceutical design* 15(1): 20-28
- Iversen PL, Warren TK, *et al.* (2012). Discovery and Early Development of AVI-7537 and AVI-7288 for the Treatment of Ebola Virus and Marburg Virus Infections. *Viruses-Basel* 4(11): 2806-2830. doi 10.3390/v4112806
- Jaehme M, Guskov A, *et al.* (2014). Crystal structure of the vitamin B-3 transporter PnuC, a full-length SWEET homolog. *Nature structural & molecular biology* 21(11): 1013-1015. doi 10.1038/nsmb.2909
- Janeway CA, Jr.und Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20: 197-216. doi 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Jang J, Yi HG, *et al.* (2016). 3D Printed Tissue Models: Present and Future. *ACS Biomater Sci Eng* 2(10): 1722-1731. doi 10.1021/acsbomaterials.6b00129
- Jedrzejewski MJ (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 65(2): 187-207 ; first page, table of contents. doi 10.1128/MMBR.65.2.187-207.2001
- Ji W, Sun B, *et al.* (2017). Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. *Genes* 8(1). doi 10.3390/genes8010021
- Jia SH, Li Y, *et al.* (2004). Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *The Journal of clinical investigation* 113(9): 1318-1327. doi 10.1172/JCI19930
- Jiang WY, Bikard D, *et al.* (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31(3): 233-239. doi 10.1038/nbt.2508
- Jin PY, Lu HJ, *et al.* (2017). The effect of DNA-PKcs gene silencing on proliferation, migration, invasion and apoptosis, and in vivo tumorigenicity of human osteosarcoma MG-63 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96: 1324-1334. doi 10.1016/j.biopha.2017.11.079
- Jinek M, Chylinski K, *et al.* (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337(6096): 816-821. doi 10.1126/science.1225829
- Johnson EEund Wessling-Resnick M (2012). Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes and infection* 14(3): 207-216. doi 10.1016/j.micinf.2011.10.001
- Johnson MD, Echlin H, *et al.* (2015). Characterization of NAD salvage pathways and their role in virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 161(11): 2127-2136. doi 10.1099/mic.0.000164
- Johnson NPund Mueller J (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine* 76(1): 105-115
- Jose RJ, Williams AE, *et al.* (2015). Regulation of Neutrophilic Inflammation by Proteinase-Activated Receptor 1 during Bacterial Pulmonary Infection. *Journal of Immunology* 194(12): 6024-6034. doi 10.4049/jimmunol.1500124
- Joyce EA, Popper SJ, *et al.* (2009). *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization induces type I interferons and interferon-induced gene expression. *BMC genomics* 10: 404. doi 10.1186/1471-2164-10-404
- Kamburov A, Stelzl U, *et al.* (2013). The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic acids research* 41(D1): D793-D800. doi 10.1093/nar/gks1055
- Karaïskos S, Naqvi AS, *et al.* (2015). Age-driven modulation of tRNA-derived fragments in *Drosophila* and their potential targets. *Biol Direct* 10. doi ARTN 5110.1186/s13062-015-0081-6
- Kash JC, Walters KA, *et al.* (2011). Lethal synergism of 2009 pandemic H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses. *mBio* 2(5). doi 10.1128/mBio.00172-11
- Kawauchi J, Inoue M, *et al.* (2013). Transcriptional Properties of Mammalian Elongin A and Its Role in Stress Response. *Journal of Biological Chemistry* 288(34): 24302-24315. doi 10.1074/jbc.M113.496703

- Kemmer G, Reilly TJ, *et al.* (2001). NadN and e (P4) are essential for utilization of NAD and nicotinamide mononucleotide but not nicotinamide riboside in *Haemophilus influenzae*. *Journal of bacteriology* 183(13): 3974-3981. doi 10.1128/JB.183.13.3974-3981.2001
- Khair OA, Davies RJ, *et al.* (1996). Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal* 9(9): 1913-1922. doi 10.1183/09031936.96.09091913
- Khan AQ, Chen Q, *et al.* (2005). Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2. *Infection and immunity* 73(1): 298-307. doi 10.1128/IAI.73.1.298-307.2005
- Kim SR, Bae YH, *et al.* (2008). Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappa B activation in endothelial cells. *Bba-Mol Cell Res* 1783(5): 886-895. doi 10.1016/j.bbamcr.2008.01.004
- Kinali M, Arechavala-Gomez V, *et al.* (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurology* 8(10): 918-928. doi 10.1016/S1474-4422(09)70211-X
- Kitani T, Okuno S, *et al.* (2003). Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS letters* 544(1-3): 74-78. doi 10.1016/S0014-5793(03)00476-9
- Knapp S, Hareng L, *et al.* (2004). Activation of neutrophils and inhibition of the proinflammatory cytokine response by endogenous granulocyte colony-stimulating factor in murine pneumococcal pneumonia. *The Journal of infectious diseases* 189(8): 1506-1515. doi 10.1086/382962
- Knepper J, Schierhorn KL, *et al.* (2013). The novel human influenza A(H7N9) virus is naturally adapted to efficient growth in human lung tissue. *mBio* 4(5): e00601-00613. doi 10.1128/mBio.00601-13
- Knip M, Douek IF, *et al.* (2000). Safety of high dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 43(11): 1337-1345. doi DOI 10.1007/s001250051536
- Koedel U, Rupprecht T, *et al.* (2004). MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain : a journal of neurology* 127(Pt 6): 1437-1445. doi 10.1093/brain/awh171
- Koppe U, Suttorp N, *et al.* (2012). Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cellular microbiology* 14(4): 460-466. doi 10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x
- Korner A, Garten A, *et al.* (2007). Molecular characteristics of serum visfatin and differential detection by immunoassays. *J Clin Endocr Metab* 92(12): 4783-4791. doi 10.1210/Jc.2007-1304
- Krek A, Grun D, *et al.* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics* 37(5): 495-500. doi 10.1038/ng1536
- Krieg AM (2003). CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature medicine* 9(7): 831-835. doi 10.1038/nm0703-831
- Krueger T, Berutto C, *et al.* (2011). Challenges in lung transplantation. *Swiss Med Wkly* 141. doi ARTN w1329210.4414/smw.2011.13292
- Krunkosky TM, Jordan JL, *et al.* (2007). *Mycoplasma pneumoniae* host-pathogen studies in an air-liquid culture of differentiated human airway epithelial cells. *Microbial pathogenesis* 42(2-3): 98-103. doi 10.1016/j.micpath.2006.11.003
- Kubo H (2012). Tissue engineering for pulmonary diseases: insights from the laboratory. *Respirology* 17(3): 445-454. doi 10.1111/j.1440-1843.2012.02145.x

- Kulikova V, Shabalin K, *et al.* (2015). Generation, Release, and Uptake of the NAD Precursor Nicotinic Acid Riboside by Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* 290(45): 27124-27137. doi 10.1074/jbc.M115.664458
- Kumar A, Zarychanski R, *et al.* (2009). Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *Jama* 302(17): 1872-1879. doi 10.1001/jama.2009.1496
- Kumar M, Sahu SK, *et al.* (2015a). MicroRNA let-7 Modulates the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection via Control of A20, an Inhibitor of the NF-kappa B Pathway. *Cell host & microbe* 17(3): 345-356. doi 10.1016/j.chom.2015.01.007
- Kumar P, Anaya J, *et al.* (2014). Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC biology* 12. doi ARTN 7810.1186/s12915-014-0078-0
- Kumar P, Mudunuri SB, *et al.* (2015b). tRFdb: a database for transfer RNA fragments. *Nucleic acids research* 43(D1): D141-D145. doi 10.1093/nar/gku1138
- Kwak PBund Tomari Y (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural & molecular biology* 19(2): 145-151. doi 10.1038/nsmb.2232
- Kwon SC, Nguyen TA, *et al.* (2016). Structure of Human DROSHA. *Cell* 164(1-2): 81-90. doi 10.1016/j.cell.2015.12.019
- Lacroix B, Li JX, *et al.* (2006). Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84(3-4): 333-345. doi 10.1139/Y05-108
- Laennec RTH (1923) Translation of selected passages from de l'Auscultation Mediate. Williams Wood & Co., New York, NY.
- Lai L, Song Y, *et al.* (2013). MicroRNA-92a negatively regulates Toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase. *The Journal of biological chemistry* 288(11): 7956-7967. doi 10.1074/jbc.M112.445429
- Lee HYund Doudna JA (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA* 18(11): 2012-2019. doi 10.1261/rna.035501.112
- Lee RC, Feinbaum RL, *et al.* (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-854
- Lee SRund Collins K (2005). Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Biological Chemistry* 280(52): 42744-42749. doi 10.1074/jbc.M510356200
- Lee Y, Ahn C, *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956): 415-419. doi 10.1038/nature01957
- Lee Y, Kim M, *et al.* (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23(20): 4051-4060. doi 10.1038/sj.emboj.7600385
- Leivonen SK, Rokka A, *et al.* (2011). Identification of miR-193b Targets in Breast Cancer Cells and Systems Biological Analysis of Their Functional Impact. *Molecular & Cellular Proteomics* 10(7). doi 10.1074/mcp.M110.005322
- LeVine AM, Koeningsknecht V, *et al.* (2001). Decreased pulmonary clearance of *S. pneumoniae* following influenza A infection in mice. *Journal of virological methods* 94(1-2): 173-186
- Lewis PAund Shope RE (1931). Swine Influenza : li. A Hemophilic Bacillus from the Respiratory Tract of Infected Swine. *The Journal of experimental medicine* 54(3): 361-371
- Li CY, Xiong Q, *et al.* (2012). Quantitative proteomic strategies for the identification of microRNA targets. *Expert Rev Proteomic* 9(5): 549-559. doi 10.1586/Epr.12.49
- Li H, Liu P, *et al.* (2008a). Augmentation of Pulmonary Epithelial Cell IL-8 Expression and Permeability by Pre-B-cell Colony Enhancing Factor. *J Inflamm (Lond)* 5: 15. doi 10.1186/1476-9255-5-15
- Li KS, Guan Y, *et al.* (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430(6996): 209-213. doi 10.1038/nature02746

- Li S, Yue Y, *et al.* (2013). MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PloS one* 8(12): e81438. doi 10.1371/journal.pone.0081438
- Li Y, Zhang Y, *et al.* (2008b). Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *The Journal of biological chemistry* 283(50): 34833-34843. doi 10.1074/jbc.M805866200
- Liaw CYund Guvendiren M (2017). Current and emerging applications of 3D printing in medicine. *Biofabrication* 9(2): 024102. doi 10.1088/1758-5090/aa7279
- Liaw CY, Ji S, *et al.* (2018). Engineering 3D Hydrogels for Personalized In Vitro Human Tissue Models. *Advanced healthcare materials*. doi 10.1002/adhm.201701165
- Lim JH, Stirling B, *et al.* (2007). Tumor suppressor CYLD regulates acute lung injury in lethal *Streptococcus pneumoniae* infections. *Immunity* 27(2): 349-360. doi 10.1016/j.immuni.2007.07.011
- Lin K, Farahani M, *et al.* (2014). Loss of MIR15A and MIR16-1 at 13q14 is associated with increased TP53 mRNA, de-repression of BCL2 and adverse outcome in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 167(3): 346-355. doi 10.1111/bjh.13043
- Lin PY, Yu SL, *et al.* (2010). MicroRNA in lung cancer. *British journal of cancer* 103(8): 1144-1148. doi 10.1038/sj.bjc.6605901
- Liu M, Guo S, *et al.* (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & growth factor reviews* 22(3): 121-130. doi 10.1016/j.cytogfr.2011.06.001
- Liu N, Wang L, *et al.* (2016a). MicroRNA-125b-5p suppresses *Brucella abortus* intracellular survival via control of A20 expression. *Bmc Microbiol* 16. doi Artn 17110.1186/S12866-016-0788-2
- Liu S, Liu C, *et al.* (2016b). microRNA-23a-5p acts as a potential biomarker for sepsis-induced acute respiratory distress syndrome in early stage. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 62(2): 31-37
- Liu TF, Vachharajani VT, *et al.* (2012). NAD(+)-dependent Sirtuin 1 and 6 Proteins Coordinate a Switch from Glucose to Fatty Acid Oxidation during the Acute Inflammatory Response. *Journal of Biological Chemistry* 287(31): 25758-25769. doi 10.1074/jbc.M112.362343
- Liu W, Ling S, *et al.* (2015). Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients. *Scientific reports* 5: 16099. doi 10.1038/srep16099
- Long AN, Owens K, *et al.* (2015). Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease-relevant murine model. *Bmc Neurol* 15. doi ARTN 1910.1186/s12883-015-0272-x
- Longo F, Kasper, Hauser, Jameson, Loscalzo (2012) *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag.
- Louria DB, Blumenfeld HL, *et al.* (1959). Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. *The Journal of clinical investigation* 38(1 Part 2): 213-265. doi 10.1172/JCI103791
- Luk T, Malam Z, *et al.* (2008). Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *Journal of leukocyte biology* 83(4): 804-816. doi 10.1189/jlb.0807581
- Lund E, Guttinger S, *et al.* (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303(5654): 95-98. doi 10.1126/science.1090599
- Lungeninformationsdienst (2016) Helmholtz Zentrum München.
<https://www.lungeninformationsdienst.de/krankheiten/lungenentzuendung/index.html>
- Ma F, Xu S, *et al.* (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma. *Nature immunology* 12(9): 861-U865. doi 10.1038/ni.2073

- Macchiarini P, Jungebluth P, *et al.* (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372(9655): 2023-2030. doi 10.1016/S0140-6736(08)61598-6
- Magni G, Amici A, *et al.* (2004). Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61(1): 19-34. doi 10.1007/s00018-003-3161-1
- Magni G, Orsomando G, *et al.* (2008). Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease. *Front Biosci-Landmrk* 13: 6135-6154. doi 10.2741/3143
- Maier T, Guell M, *et al.* (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* 583(24): 3966-3973. doi 10.1016/j.febslet.2009.10.036
- Mak IW, Evaniew N, *et al.* (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research* 6(2): 114-118
- Mann M (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Bio* 7(12): 952-958. doi 10.1038/nrm2067
- Mao G, Liu Y, *et al.* (2015). Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Angiogenesis* 18(3): 373-382. doi 10.1007/s10456-015-9474-5
- Marten-Loeches I, Sanchez-Corral A, *et al.* (2011). Community-acquired respiratory coinfection in critically ill patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus. *Chest* 139(3): 555-562. doi 10.1378/chest.10-1396
- Martin CM, Kunin CM, *et al.* (1959a). Asian influenza A in Boston, 1957-1958. I. Observations in thirty-two influenza-associated fatal cases. *AMA archives of internal medicine* 103(4): 515-531
- Martin CM, Kunin CM, *et al.* (1959b). Asian influenza A in Boston, 1957-1958. II. Severe staphylococcal pneumonia complicating influenza. *AMA archives of internal medicine* 103(4): 532-542
- Martin PR, Shea RJ, *et al.* (2001). Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. *Journal of bacteriology* 183(4): 1168-1174. doi 10.1128/Jb.183.4.1168-1174.2001
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, *et al.* (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of virology* 78(22): 12665-12667. doi 10.1128/Jvi.78.22.12665-12667.2004
- Maudet C, Mano M, *et al.* (2014). Functional high-throughput screening identifies the miR-15 microRNA family as cellular restriction factors for *Salmonella* infection. *Nature communications* 5. doi Artn 471810.1038/Ncomms5718
- Mayer PR, Huang N, *et al.* (2010). Expression, localization, and biochemical characterization of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2. *The Journal of biological chemistry* 285(51): 40387-40396. doi 10.1074/jbc.M110.178913
- McAuley JL, Hornung F, *et al.* (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell host & microbe* 2(4): 240-249. doi 10.1016/j.chom.2007.09.001
- McConnell BBund Yang VW (2010). Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiological reviews* 90(4): 1337-1381. doi 10.1152/physrev.00058.2009
- McCoy CE, Sheedy FJ, *et al.* (2010). IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *The Journal of biological chemistry* 285(27): 20492-20498. doi 10.1074/jbc.M110.102111
- McCullers JA (2014). The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nature reviews Microbiology* 12(4): 252-262. doi 10.1038/nrmicro3231
- McCullers JAund Bartmess KC (2003). Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases* 187(6): 1000-1009. doi 10.1086/368163
- McCullers JA, McAuley JL, *et al.* (2010). Influenza enhances susceptibility to natural acquisition of and disease due to *Streptococcus pneumoniae* in ferrets. *The Journal of infectious diseases* 202(8): 1287-1295. doi 10.1086/656333

- McEachren TMund Keough KM (1995). Phosphocholine reverses inhibition of pulmonary surfactant adsorption caused by C-reactive protein. *The American journal of physiology* 269(4 Pt 1): L492-497. doi 10.1152/ajplung.1995.269.4.L492
- McLeod JWund Gordon J (1922). Production of Hydrogen Peroxide by Bacteria. *The Biochemical journal* 16(4): 499-506
- Metersky ML, Masterton RG, *et al.* (2012). Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 16(5): e321-331. doi 10.1016/j.ijid.2012.01.003
- Metsalu Tund Vilo J (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic acids research* 43(W1): W566-570. doi 10.1093/nar/gkv468
- Michelow IC, Olsen K, *et al.* (2004). Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 113(4): 701-707. doi DOI 10.1542/peds.113.4.701
- Michos A, Gryllos I, *et al.* (2006). Enhancement of streptolysin O activity and intrinsic cytotoxic effects of the group A streptococcal toxin, NAD-glycohydrolase. *The Journal of biological chemistry* 281(12): 8216-8223. doi 10.1074/jbc.M511674200
- Mills KF, Yoshida S, *et al.* (2016). Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice. *Cell metabolism* 24(6): 795-806. doi 10.1016/j.cmet.2016.09.013
- Mina MJund Klugman KP (2014). The role of influenza in the severity and transmission of respiratory bacterial disease. *The Lancet Respiratory medicine* 2(9): 750-763. doi 10.1016/S2213-2600(14)70131-6
- Mina MJ, Klugman KP, *et al.* (2015). Live attenuated influenza virus increases pneumococcal translocation and persistence within the middle ear. *The Journal of infectious diseases* 212(2): 195-201. doi 10.1093/infdis/jiu804
- Mina MJ, McCullers JA, *et al.* (2014). Live attenuated influenza vaccine enhances colonization of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in mice. *mBio* 5(1). doi 10.1128/mBio.01040-13
- Mitchell PS, Parkin RK, *et al.* (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30): 10513-10518. doi 10.1073/pnas.0804549105
- Mitchell TJ AJ, Morgan PJ, Andrew PW. (1997). Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology* 83(S1): 62-71. doi 10.1046/j.1365-2672.83.s1.7.x
- Mogensen TH, Berg RS, *et al.* (2008). *Streptococcus pneumoniae* stabilizes tumor necrosis factor alpha mRNA through a pathway dependent on p38 MAPK but independent of Toll-like receptors. *BMC immunology* 9: 52. doi 10.1186/1471-2172-9-52
- Mohan S, Hertweck C, *et al.* (2014). Tuf of *Streptococcus pneumoniae* is a surface displayed human complement regulator binding protein. *Molecular immunology* 62(1): 249-264. doi 10.1016/j.molimm.2014.06.029
- Mold C, Rodic-Polic B, *et al.* (2002). Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J Immunol* 168(12): 6375-6381
- Montagner S, Orlandi EM, *et al.* (2013). The role of miRNAs in mast cells and other innate immune cells. *Immunological reviews* 253(1): 12-24. doi 10.1111/imr.12042
- Morens DM, Taubenberger JK, *et al.* (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *The Journal of infectious diseases* 198(7): 962-970

- Mori I, Komatsu T, *et al.* (1995). In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *The Journal of general virology* 76 (Pt 11): 2869-2873. doi 10.1099/0022-1317-76-11-2869
- Moscoso Mund Claverys JP (2004). Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Molecular microbiology* 54(3): 783-794. doi 10.1111/j.1365-2958.2004.04305.x
- Nahid MA, Satoh M, *et al.* (2011). MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cellular & molecular immunology* 8(5): 388-403. doi 10.1038/cmi.2011.26
- Nakagawa I, Nakata M, *et al.* (2004). Transcriptome analysis and gene expression profiles of early apoptosis-related genes in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cellular microbiology* 6(10): 939-952. doi 10.1111/j.1462-5822.2004.00412.x
- Navarro L, Dunoyer P, *et al.* (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312(5772): 436-439. doi 10.1126/science.1126088
- Neuhaus V, Schaudien D, *et al.* (2017). Assessment of long-term cultivated human precision-cut lung slices as an ex vivo system for evaluation of chronic cytotoxicity and functionality. *J Occup Med Toxicol* 12: 13. doi 10.1186/s12995-017-0158-5
- Neumann G, Brownlee GG, *et al.* (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Current topics in microbiology and immunology* 283: 121-143
- Nguyen TA, Jo MH, *et al.* (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161(6): 1374-1387. doi 10.1016/j.cell.2015.05.010
- Nikiforov A, Dolle C, *et al.* (2011). Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *The Journal of biological chemistry* 286(24): 21767-21778. doi 10.1074/jbc.M110.213298
- Noah DLund Krug RM (2005). Influenza virus virulence and its molecular determinants. *Advances in virus research* 65: 121-145. doi 10.1016/S0065-3527(05)65004-X
- Nobbs AH, Jenkinson HF, *et al.* (2015). Generic determinants of *Streptococcus* colonization and infection. *Infect Genet Evol* 33: 361-370. doi 10.1016/j.meegid.2014.09.018
- Noland CLund Doudna JA (2013). Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA* 19(5): 639-648. doi 10.1261/rna.037424.112
- O'Reilly Tund Niven DF (2003). Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 67(3): 229-231
- Ohtsuka Y, Lee J, *et al.* (2001). MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut* 49(4): 526-533. doi 10.1136/Gut.49.4.526
- Okamoto S, Kawabata S, *et al.* (2003). Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *Journal of virology* 77(7): 4104-4112
- Olefsky JMund Glass CK (2010). Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annu Rev Physiol* 72: 219-246. doi 10.1146/annurev-physiol-021909-135846
- Olesen UH, Christensen MK, *et al.* (2008). Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD. *Biochemical and biophysical research communications* 367(4): 799-804. doi 10.1016/j.bbrc.2008.01.019
- Omori K, Nakamura T, *et al.* (2005). Regenerative medicine of the trachea: the first human case. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 114(6): 429-433. doi 10.1177/000348940511400603
- Opitz B, Puschel A, *et al.* (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of biological chemistry* 279(35): 36426-36432. doi 10.1074/jbc.M403861200
- Oswald E, Nougayrede JP, *et al.* (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Current opinion in microbiology* 8(1): 83-91. doi 10.1016/j.mib.2004.12.011

- Otsuka M, Jing Q, *et al.* (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 27(1): 123-134. doi 10.1016/j.immuni.2007.05.014
- Palacios G, Hornig M, *et al.* (2009). Streptococcus pneumoniae coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PloS one* 4(12): e8540. doi 10.1371/journal.pone.0008540
- Palaniappan R, Singh S, *et al.* (2005). Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-specific immune responses in a mouse model of pneumococcal carriage. *Infection and immunity* 73(2): 1006-1013. doi 10.1128/IAI.73.2.1006-1013.2005
- Palazzo AFund Lee ES (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Frontiers in genetics* 6: 2. doi 10.3389/fgene.2015.00002
- Park JE, Heo I, *et al.* (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475(7355): 201-205. doi 10.1038/nature10198
- Park JH, Long A, *et al.* (2016a). Nicotinamide mononucleotide inhibits post-ischemic NAD(+) degradation and dramatically ameliorates brain damage following global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 95: 102-110. doi 10.1016/j.nbd.2016.07.018
- Park MH, Park E, *et al.* (2016b). Porphyromonas gingivalis-induced miR-132 regulates TNFalpha expression in THP-1 derived macrophages. *SpringerPlus* 5(1): 761. doi 10.1186/s40064-016-2363-6
- Parker D, Martin FJ, *et al.* (2011). Streptococcus pneumoniae DNA Initiates Type I Interferon Signaling in the Respiratory Tract. *mBio* 2(3). doi ARTN e00016-1110.1128/mBio.00016-11
- Partida-Sanchez S, Cockayne DA, *et al.* (2001). Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nature medicine* 7(11): 1209-1216. doi 10.1038/nm1101-1209
- Paster BJ, Boches SK, *et al.* (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology* 183(12): 3770-3783. doi 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001
- Paterson GKund Mitchell TJ (2006). Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* 152(Pt 2): 285-293. doi 10.1099/mic.0.28551-0
- Peek CB, Affinati AH, *et al.* (2013). Circadian clock NAD+ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* 342(6158): 1243417. doi 10.1126/science.1243417
- Peng F, He Ja, *et al.* (2017). Identification of serum MicroRNAs as diagnostic biomarkers for influenza H7N9 infection. *Virology Reports* 7: 1-8. doi https://doi.org/10.1016/j.virep.2016.11.001
- Pericone CD, Park S, *et al.* (2003). Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in Streptococcus pneumoniae include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *Journal of bacteriology* 185(23): 6815-6825
- Philpott DJund Girardin SE (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Molecular immunology* 41(11): 1099-1108. doi 10.1016/j.molimm.2004.06.012
- Pinkenburg O, Meyer T, *et al.* (2016). The Human Antimicrobial Protein Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) Inhibits the Infectivity of Influenza A Virus. *PloS one* 11(6): e0156929. doi 10.1371/journal.pone.0156929
- Pittet LA, Hall-Stoodley L, *et al.* (2010). Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of Streptococcus pneumoniae. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 42(4): 450-460. doi 10.1165/rcmb.2007-0417OC
- Plotkowski MC, Puchelle E, *et al.* (1986). Adherence of type I Streptococcus pneumoniae to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *The American review of respiratory disease* 134(5): 1040-1044. doi 10.1164/arrd.1986.134.5.1040
- Pu J, Li R, *et al.* (2017). Expression profiles of miRNAs from bovine mammary glands in response to Streptococcus agalactiae-induced mastitis. *The Journal of dairy research* 84(3): 300-308. doi 10.1017/S0022029917000437

- Quinn EM, Wang JH, *et al.* (2013). MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling. *PloS one* 8(4): e62232. doi 10.1371/journal.pone.0062232
- Raffaelli N, Sorci L, *et al.* (2002). Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochemical and biophysical research communications* 297(4): 835-840
- Rai P, He F, *et al.* (2016). Pneumococcal Pneumolysin Induces DNA Damage and Cell Cycle Arrest. *Scientific reports* 6. doi Artn 2297210.1038/Srep22972
- Ramsey KM, Mills KF, *et al.* (2008). Age-associated loss of Sirt1-mediated enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in beta cell-specific Sirt1-overexpressing (BESTO) mice. *Aging cell* 7(1): 78-88. doi 10.1111/j.1474-9726.2007.00355.x
- Rani S, Gately K, *et al.* (2013). Global analysis of serum microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. *Cancer biology & therapy* 14(12): 1104-1112. doi 10.4161/cbt.26370
- Ratajczak J, Joffraud M, *et al.* (2016). NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nature communications* 7: 13103. doi 10.1038/ncomms13103
- Rautanen A, Pirinen M, *et al.* (2016). Polymorphism in a lincRNA Associates with a Doubled Risk of Pneumococcal Bacteremia in Kenyan Children. *American journal of human genetics* 98(6): 1092-1100. doi 10.1016/j.ajhg.2016.03.025
- Raviprakash K, Liu K, *et al.* (1995). Inhibition of dengue virus by novel, modified antisense oligonucleotides. *Journal of virology* 69(1): 69-74
- Reinert RR (2004). Pneumococcal conjugate vaccines--a European perspective. *International journal of medical microbiology : IJMM* 294(5): 277-294. doi 10.1016/j.ijmm.2004.04.004
- Revollo JR, Grimm AA, *et al.* (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279(49): 50754-50763. doi 10.1074/jbc.M408388200
- Revollo JR, Korner A, *et al.* (2007). Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell metabolism* 6(5): 363-375. doi 10.1016/j.cmet.2007.09.003
- Rice TW, Rubinson L, *et al.* (2012). Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Critical care medicine* 40(5): 1487-1498. doi 10.1097/CCM.0b013e3182416f23
- Richard Mund Fouchier RA (2015). H10N8 and H6N1 maintain avian receptor binding. *Cell host & microbe* 17(3): 292-294. doi 10.1016/j.chom.2015.02.020
- Rivas-Santiago B, Schwander SK, *et al.* (2005). Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. *Infection and immunity* 73(8): 4505-4511. doi 10.1128/IAI.73.8.4505-4511.2005
- Roberts KJ, Cross A, *et al.* (2013). Inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF/NAMPT/visfatin) decreases the ability of human neutrophils to generate reactive oxidants but does not impair bacterial killing. *Journal of leukocyte biology* 94(3): 481-492. doi 10.1189/jlb.1012527
- Robinson KM, Lee B, *et al.* (2015). The role of IL-27 in susceptibility to post-influenza Staphylococcus aureus pneumonia. *Respiratory research* 16: 10. doi 10.1186/s12931-015-0168-8
- Rodionov DA, Li XQ, *et al.* (2008). Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria: genomic reconstruction of NiaR (YrxA) regulon. *Nucleic acids research* 36(6): 2032-2046. doi 10.1093/nar/gkn046
- Rodriguez-Boulan Eund Nelson WJ (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245(4919): 718-725

- Rogers PD, Thornton J, *et al.* (2003). Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 71(4): 2087-2094
- Romacho T, Azcutia V, *et al.* (2009). Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia* 52(11): 2455-2463. doi 10.1007/s00125-009-1509-2
- Romero-Espejel ME, Rodriguez MA, *et al.* (2016). Characterization of Spbhp-37, a Hemoglobin-Binding Protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 6: 47. doi 10.3389/fcimb.2016.00047
- Rongvaux A, Shea RJ, *et al.* (2002). Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *European journal of immunology* 32(11): 3225-3234. doi Doi 10.1002/1521-4141(200211)32:11<3225::Aid-Immu3225>3.0.Co;2-L
- Rossato M, Curtale G, *et al.* (2012). IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF-alpha, IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(45): E3101-3110. doi 10.1073/pnas.1209100109
- Rothchild AC, Sissons JR, *et al.* (2016). MiR-155-regulated molecular network orchestrates cell fate in the innate and adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(41): E6172-E6181. doi 10.1073/pnas.1608255113
- Rupp J, Droemann D, *et al.* (2004). Alveolar epithelial cells type II are major target cells for *C. pneumoniae* in chronic but not in acute respiratory infection. *FEMS immunology and medical microbiology* 41(3): 197-203. doi 10.1016/j.femsim.2004.03.004
- Russell WMSund Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. Universities Federation for Animal Welfare, Wheathampstead, UK.
- Sahu SK, Kumar M, *et al.* (2017). MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBPbeta regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection. *PLoS pathogens* 13(5): e1006410. doi 10.1371/journal.ppat.1006410
- Samal B, Sun YH, *et al.* (1994). Cloning and Characterization of the Cdna-Encoding a Novel Human Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor. *Molecular and cellular biology* 14(2): 1431-1437. doi Doi 10.1128/Mcb.14.2.1431
- Sampath D, Zabka TS, *et al.* (2015). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacol Therapeut* 151: 16-31. doi 10.1016/j.pharmthera.2015.02.004
- Sauer E, Merdanovic M, *et al.* (2004). PnuC and the utilization of the nicotinamide riboside analog 3-aminopyridine in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(12): 4532-4541. doi 10.1128/Aac.48.12.4532-4541.2004
- Schmeck B, Gross R, *et al.* (2004). *Streptococcus pneumoniae*-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infection and immunity* 72(9): 4940-4947. doi Doi 10.1128/iai.72.9.4940-4947.2004
- Scholtissek C (1995). Molecular evolution of influenza viruses. *Virus genes* 11(2-3): 209-215
- Schrauwen EJund Fouchier RA (2014). Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerging microbes & infections* 3(2): e9. doi 10.1038/emi.2014.9
- Schroder NW, Morath S, *et al.* (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *The Journal of biological chemistry* 278(18): 15587-15594. doi 10.1074/jbc.M212829200

- Schulte LN, Westermann AJ, *et al.* (2013). Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing. *Nucleic acids research* 41(1): 542-553. doi 10.1093/nar/gks1030
- Seok J, Warren HS, *et al.* (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(9): 3507-3512. doi 10.1073/pnas.1222878110
- Shanks N, Greek R, *et al.* (2009). Are animal models predictive for humans? *Philosophy, ethics, and humanities in medicine : PEHM* 4: 2. doi 10.1186/1747-5341-4-2
- Sheng B, Zhao L, *et al.* (2017). miR-375 ameliorates sepsis by downregulating miR-21 level via inhibiting JAK2-STAT3 signaling. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 86: 254-261. doi 10.1016/j.biopha.2016.11.147
- Shibata K, Hayakawa T, *et al.* (1986). Tissue Distribution of the Enzymes Concerned with the Biosynthesis of NAD in Rats. *Agricultural and Biological Chemistry* 50(12): 3037-3041
- Shigematsu M, Kirino Y (2015). tRNA-Derived Short Non-coding RNA as Interacting Partners of Argonaute Proteins. *Gene Regul Syst Bio* 9: 27-33. doi 10.4137/Grsb.S29411
- Shinya K, Okamura T, *et al.* (2011). Toll-like receptor pre-stimulation protects mice against lethal infection with highly pathogenic influenza viruses. *Virology journal* 8: 97. doi 10.1186/1743-422X-8-97
- Siddle KJ, Tailleux L, *et al.* (2015). bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and their isomiRs. *PLoS genetics* 11(3): e1005064. doi 10.1371/journal.pgen.1005064
- Siegel SJ, Roche AM, *et al.* (2014). Influenza promotes pneumococcal growth during coinfection by providing host sialylated substrates as a nutrient source. *Cell host & microbe* 16(1): 55-67. doi 10.1016/j.chom.2014.06.005
- Simons Kund Wandinger-Ness A (1990). Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62(2): 207-210
- Sitkiewicz I, Green NM, *et al.* (2009). Transcriptome adaptation of group B Streptococcus to growth in human amniotic fluid. *PloS one* 4(7): e6114. doi 10.1371/journal.pone.0006114
- Sittka A, Schmeck B (2013). MicroRNAs in the lung. *Advances in experimental medicine and biology* 774: 121-134. doi 10.1007/978-94-007-5590-1_7
- Slupsky CM, Cheyesh A, *et al.* (2009). Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus Pneumonia Induce Distinct Metabolic Responses. *Journal of proteome research* 8(6): 3029-3036. doi 10.1021/pr900103y
- Smith J, Lund Bayles DO (2006). The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical reviews in microbiology* 32(4): 227-248. doi 10.1080/10408410601023557
- Smoot JC, Barbian KD, *et al.* (2002). Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A Streptococcus strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7): 4668-4673. doi 10.1073/pnas.062526099
- Smyth LA, Boardman DA, *et al.* (2015). MicroRNAs affect dendritic cell function and phenotype. *Immunology* 144(2): 197-205. doi 10.1111/imm.12390
- Soares AR, Santos M (2017). Discovery and function of transfer RNA-derived fragments and their role in disease. *Wires Rna* 8(5). doi Artn E142310.1002/Wrna.1423
- Song L, Liu H, *et al.* (2010). Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *Journal of virology* 84(17): 8849-8860. doi 10.1128/JVI.00456-10
- Song XM, Connor W, *et al.* (2009). Transcriptome studies on Streptococcus pneumoniae, illustration of early response genes to THP-1 human macrophages. *Genomics* 93(1): 72-82. doi 10.1016/j.ygeno.2008.09.008
- Spellerberg B, Cundell DR, *et al.* (1996). Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in Streptococcus pneumoniae. *Molecular microbiology* 19(4): 803-813

- Spiegler S, Kirchmaier B, *et al.* (2016). FAM222B Is Not a Likely Novel Candidate Gene for Cerebral Cavernous Malformations. *Molecular syndromology* 7(3): 144-152. doi 10.1159/000446884
- Srivastava A, Henneke P, *et al.* (2005). The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infection and immunity* 73(10): 6479-6487. doi 10.1128/IAI.73.10.6479-6487.2005
- Steen S, Ingemansson R, *et al.* (2007). First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo. *Annals of Thoracic Surgery* 83(6): 2191-2195. doi 10.1016/j.athoracsur.2007.01.033
- Stein LRund Imai S (2014). Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging. *Embo Journal* 33(12): 1321-1340. doi 10.1002/embj.201386917
- Stelma F, van der Ree MH, *et al.* (2017). Immune phenotype and function of natural killer and T cells in chronic hepatitis C patients who received a single dose of anti-MicroRNA-122, RG-101. *Hepatology* 66(1): 57-68. doi 10.1002/hep.29148
- Stoll H, Dengjel J, *et al.* (2005). Staphylococcus aureus deficient in lipidation of prelipoproteins is attenuated in growth and immune activation. *Infection and immunity* 73(4): 2411-2423. doi 10.1128/IAI.73.4.2411-2423.2005
- Suico MA, Shuto T, *et al.* (2017). Roles and regulations of the ETS transcription factor ELF4/MEF. *J Mol Cell Biol* 9(3): 168-177. doi 10.1093/jmcb/mjw051
- Surmann K, Simon M, *et al.* (2015). A proteomic perspective of the interplay of Staphylococcus aureus and human alveolar epithelial cells during infection. *Journal of proteomics* 128: 203-217. doi 10.1016/j.jprot.2015.07.034
- Swamy MN, Wu H, *et al.* (2016). Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS. *Advanced drug delivery reviews* 103: 174-186. doi 10.1016/j.addr.2016.03.005
- Szalai AJ, Agrawal A, *et al.* (1997). C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunologic research* 16(2): 127-136
- Szymanski KV, Toennies M, *et al.* (2012). Streptococcus pneumoniae-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *The European respiratory journal* 40(6): 1458-1467. doi 10.1183/09031936.00186911
- Taganov KD, Boldin MP, *et al.* (2006a). NF-kappa B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(33): 12481-12486. doi 10.1073/pnas.0605298103
- Taganov KD, Boldin MP, *et al.* (2006b). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(33): 12481-12486. doi 10.1073/pnas.0605298103
- Takeda Kund Akira S (2003). Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular microbiology* 5(3): 143-153
- Tan B, Young DA, *et al.* (2013). Pharmacological Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT), an Enzyme Essential for NAD(+) Biosynthesis, in Human Cancer Cells METABOLIC BASIS AND POTENTIAL CLINICAL IMPLICATIONS. *Journal of Biological Chemistry* 288(5): 3500-3511. doi 10.1074/jbc.M112.394510
- Tanaka M, Nozaki M, *et al.* (2007). Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 359(2): 194-201. doi 10.1016/j.bbrc.2007.05.096
- Tang B, Liang H, *et al.* (2017). miR-194b-3p partially inhibits Streptococcus equi subsp. zooepidemicus adherence to PK15 cells. *Veterinary microbiology* 210: 38-42. doi 10.1016/j.vetmic.2017.08.023

- Tay HL, Kaiko GE, *et al.* (2015). Antagonism of miR-328 increases the antimicrobial function of macrophages and neutrophils and rapid clearance of non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) from infected lung. *PLoS pathogens* 11(4): e1004549. doi 10.1371/journal.ppat.1004549
- Tekir SD, Cakir T, *et al.* (2012). Infection strategies of bacterial and viral pathogens through pathogen-human protein-protein interactions. *Frontiers in microbiology* 3. doi Artn 4610.3389/Fmicb.2012.00046
- Thangavel RRund Bouvier NM (2014). Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *Journal of immunological methods* 410: 60-79. doi 10.1016/j.jim.2014.03.023
- Thi EP, Mire CE, *et al.* (2015). Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola-virus-Makona-infected nonhuman primates. *Nature* 521(7552): 362-365. doi 10.1038/nature14442
- Thomson DW, Bracken CP, *et al.* (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic acids research* 39(16): 6845-6853. doi 10.1093/nar/gkr330
- Tian WY, Zhu YX, *et al.* (2013). Visfatin, a potential biomarker and prognostic factor for endometrial cancer. *Gynecologic oncology* 129(3): 505-512. doi 10.1016/j.ygyno.2013.02.022
- Tolstikov V, Nikolayev A, *et al.* (2014). Metabolomics Analysis of Metabolic Effects of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibition on Human Cancer Cells. *PloS one* 9(12). doi ARTN e11401910.1371/journal.pone.0114019
- Tong HH, Long JP, *et al.* (2004). Alteration of gene expression in human middle ear epithelial cells induced by influenza A virus and its implication for the pathogenesis of otitis media. *Microbial pathogenesis* 37(4): 193-204. doi 10.1016/j.micpath.2004.06.012
- Tong HH, Long JP, *et al.* (2003). Expression of cytokine and chemokine genes by human middle ear epithelial cells induced by influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae* opacity variants. *Infection and immunity* 71(8): 4289-4296
- Tong HH, Weiser JN, *et al.* (2001). Effect of influenza A virus infection on nasopharyngeal colonization and otitis media induced by transparent or opaque phenotype variants of *Streptococcus pneumoniae* in the chinchilla model. *Infection and immunity* 69(1): 602-606. doi 10.1128/IAI.69.1.602-606.2001
- Tong S, Li Y, *et al.* (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(11): 4269-4274. doi 10.1073/pnas.1116200109
- Triboulet R, Mari B, *et al.* (2007). Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315(5818): 1579-1582. doi 10.1126/science.1136319
- Truttmann MC, Misselwitz B, *et al.* (2011). *Bartonella henselae* engages inside-out and outside-in signaling by integrin beta 1 and talin1 during invasin-mediated bacterial uptake. *Journal of cell science* 124(21): 3591-3602. doi 10.1242/jcs.084459
- UNICEF (2017). <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/>
- Van Daal GJ, Beusenberg FD, *et al.* (1991). Protection against influenza A virus infection in mice by oral immunization with a polyvalent bacterial lysate. *International journal of immunopharmacology* 13(7): 831-840
- Van den Bergh R, Florence E, *et al.* (2010). Transcriptome analysis of monocyte-HIV interactions. *Retrovirology* 7: 53. doi 10.1186/1742-4690-7-53
- van der Ree MH, de Vree JM, *et al.* (2017). Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 389(10070): 709-717. doi 10.1016/S0140-6736(16)31715-9
- van der Ree MH, van der Meer AJ, *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral research* 111: 53-59. doi 10.1016/j.antiviral.2014.08.015

- Venkatesh T, Suresh PS, *et al.* (2016). tRFs: miRNAs in disguise. *Gene* 579(2): 133-138. doi 10.1016/j.gene.2015.12.058
- Verschoor CP, Dorrington MG, *et al.* (2014). MicroRNA-155 is required for clearance of *Streptococcus pneumoniae* from the nasopharynx. *Infection and immunity* 82(11): 4824-4833. doi 10.1128/IAI.02251-14
- Viegas MS, do Carmo A, *et al.* (2007). CD38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of Th1 immune responses against *Mycobacterium avium*. *Microbes and infection* 9(7): 847-854. doi 10.1016/j.micinf.2007.03.003
- Wagner C, Goldmann T, *et al.* (2015). Budesonide Inhibits Intracellular Infection with Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Despite Its Anti-Inflammatory Effects in Respiratory Cells and Human Lung Tissue: A Role for p38 MAP Kinase. *Respiration; international review of thoracic diseases* 90(5): 416-425. doi 10.1159/000439226
- Wang A, Kwee LC, *et al.* (2017a). Whole blood sequencing reveals circulating microRNA associations with high-risk traits in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 261: 19-25. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.041
- Wang F, Liu J, *et al.* (2017b). MicroRNA-143-3p, up-regulated in *H. pylori*-positive gastric cancer, suppresses tumor growth, migration and invasion by directly targeting AKT2. *Oncotarget* 8(17): 28711-28724. doi 10.18632/oncotarget.15646
- Wang H, Chen F, *et al.* (2017c). Circulating microRNAs as novel biomarkers for dilated cardiomyopathy. *Cardiology journal* 24(1): 65-73. doi 10.5603/CJ.a2016.0097
- Wang HY, Yang H, *et al.* (2013a). One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 153(4): 910-918. doi 10.1016/j.cell.2013.04.025
- Wang Q, Lee I, *et al.* (2013b). Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21(2): 368-379. doi 10.1038/mt.2012.237
- Weber JR, Freyer D, *et al.* (2003). Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 19(2): 269-279
- Webster RG, Bean WJ, *et al.* (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews* 56(1): 152-179
- Wei CC, Kong YY, *et al.* (2017). Nicotinamide mononucleotide attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Scientific reports* 7. doi ARTN 71710.1038/s41598-017-00851-z
- Weinheimer VK, Becher A, *et al.* (2012). Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *The Journal of infectious diseases* 206(11): 1685-1694. doi 10.1093/infdis/jis455
- White B (1938) *The biology of pneumococcus*. The Commonwealth Fund, New York, NY.
- WHO (2014) *Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance*.
- WHO (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>
- Wilson RC, Tambe A, *et al.* (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular cell* 57(3): 397-407. doi 10.1016/j.molcel.2014.11.030
- Wohlsen A, Martin C, *et al.* (2003). The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *The European respiratory journal* 21(6): 1024-1032
- Wolff JC, Wilhelm J, *et al.* (2010). Comparative gene expression profiling of post-natal and post-pneumonectomy lung growth. *The European respiratory journal* 35(3): 655-666. doi 10.1183/09031936.00059709
- Wozniak MB, Scelo G, *et al.* (2015). Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer. *PloS one* 10(5): e0125026. doi 10.1371/journal.pone.0125026

- Wu W, Booth JL, *et al.* (2010). Innate immune response to H3N2 and H1N1 influenza virus infection in a human lung organ culture model. *Virology* 396(2): 178-188. doi 10.1016/j.virol.2009.10.016
- Xia HB, Mao QW, *et al.* (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20(10): 1006-1010. doi 10.1038/nbt739
- Xia T, O'Hara A, *et al.* (2008). EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3. *Cancer research* 68(5): 1436-1442. doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-5126
- Xu F, Droemann D, *et al.* (2008). Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 39(5): 522-529. doi 10.1165/rcmb.2007-0328OC
- Yalowitz JA, Xiao S, *et al.* (2004). Characterization of human brain nicotinamide 5'-mononucleotide adenylyltransferase-2 and expression in human pancreas. *The Biochemical journal* 377(Pt 2): 317-326. doi 10.1042/BJ20030518
- Yamamoto M, Takeda K, *et al.* (2004). TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Molecular immunology* 40(12): 861-868
- Yamboliev IA, Smyth LM, *et al.* (2009). Storage and secretion of beta-NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *The European journal of neuroscience* 30(5): 756-768. doi 10.1111/j.1460-9568.2009.06869.x
- Yang H, Wang HY, *et al.* (2013). One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 154(6): 1370-1379. doi 10.1016/j.cell.2013.08.022
- Yao H, Zhang H, *et al.* (2017a). Purified *Streptococcus pneumoniae* Endopeptidase O (PepO) Enhances Particle Uptake by Macrophages in a Toll-Like Receptor 2- and miR-155-Dependent Manner. *Infection and immunity* 85(4). doi 10.1128/IAI.01012-16
- Yao ZW, Yang WH, *et al.* (2017b). Nicotinamide mononucleotide inhibits JNK activation to reverse Alzheimer disease. *Neuroscience letters* 647: 133-140. doi 10.1016/j.neulet.2017.03.027
- Ye SQ, Zhang LQ, *et al.* (2005). Pre-B-cell-colony-enhancing factor is critically involved in thrombin-induced lung endothelial cell barrier dysregulation. *Microvascular research* 70(3): 142-151. doi 10.1016/j.mvr.2005.08.003
- Yi R, Qin Y, *et al.* (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17(24): 3011-3016. doi 10.1101/gad.1158803
- Yoon MJ, Yoshida M, *et al.* (2015). SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice. *Cell metabolism* 21(5): 706-717. doi 10.1016/j.cmet.2015.04.002
- Yoshimura A, Lien E, *et al.* (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163(1): 1-5
- Yoshino J, Baur JA, *et al.* (2018). NAD(+) Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell metabolism* 27(3): 513-528. doi 10.1016/j.cmet.2017.11.002
- Yoshino J, Mills KF, *et al.* (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell metabolism* 14(4): 528-536. doi 10.1016/j.cmet.2011.08.014
- You FP, Wang PH, *et al.* (2013). ELF4 is critical for induction of type I interferon and the host antiviral response. *Nature immunology* 14(12): 1237-+. doi 10.1038/ni.2756
- Yuste J, Botto M, *et al.* (2005). Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol* 175(3): 1813-1819
- Yuste J, Sen A, *et al.* (2008). Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infection and immunity* 76(8): 3761-3770. doi 10.1128/IAI.00291-08

- Zahlten J, Herta T, *et al.* (2015a). Role of Pneumococcal Autolysin for KLF4 Expression and Chemokine Secretion in Lung Epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 53(4): 544-554. doi 10.1165/rcmb.2014-0024OC
- Zahlten J, Kim YJ, *et al.* (2015b). Streptococcus pneumoniae-Induced Oxidative Stress in Lung Epithelial Cells Depends on Pneumococcal Autolysis and Is Reversible by Resveratrol. *The Journal of infectious diseases* 211(11): 1822-1830. doi 10.1093/infdis/jiu806
- Zamporlini F, Ruggieri S, *et al.* (2014). Novel assay for simultaneous measurement of pyridine mononucleotides synthesizing activities allows dissection of the NAD(+) biosynthetic machinery in mammalian cells. *Febs Journal* 281(22): 5104-5119. doi 10.1111/febs.13050
- Zerbino DR, Achuthan P, *et al.* (2018). Ensembl 2018. *Nucleic acids research* 46(D1): D754-D761. doi 10.1093/nar/gkx1098
- Zeskind JE, Lenburg ME, *et al.* (2008). Translating the COPD transcriptome: insights into pathogenesis and tools for clinical management. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5(8): 834-841. doi 10.1513/pats.200807-074TH
- Zhang GL, Li YX, *et al.* (2010a). Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral research* 88(2): 169-175. doi 10.1016/j.antiviral.2010.08.008
- Zhang J, Wang Y, *et al.* (2014a). Down-regulation of nicotinamide N-methyltransferase induces apoptosis in human breast cancer cells via the mitochondria-mediated pathway. *PLoS one* 9(2): e89202. doi 10.1371/journal.pone.0089202
- Zhang T, Yu J, *et al.* (2014b). Salmonella enterica serovar enteritidis modulates intestinal epithelial miR-128 levels to decrease macrophage recruitment via macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of infectious diseases* 209(12): 2000-2011. doi 10.1093/infdis/jiu006
- Zhang X, Kurnasov OV, *et al.* (2003). Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 278(15): 13503-13511. doi 10.1074/jbc.M300073200
- Zhang Y, Liu D, *et al.* (2010b). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* 39(1): 133-144. doi 10.1016/j.molcel.2010.06.010
- Zheng M, Tao W, *et al.* (2018). Nanotechnology-Based Strategies for siRNA Brain Delivery for Disease Therapy. *Trends in biotechnology*. doi 10.1016/j.tibtech.2018.01.006
- Zhou HL, Monack DM, *et al.* (2005). Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *Journal of Experimental Medicine* 202(10): 1327-1332. doi 10.1084/Jem.20051194
- Zhou J, Chaudhry H, *et al.* (2015). Dysregulation in microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients is associated with immunopathology. *Cytokine* 71(1): 89-100. doi 10.1016/j.cyto.2014.09.003
- Zhu Z, Qi YH, *et al.* (2016). Systematic Identification and Bioinformatic Analysis of MicroRNAs in Response to Infections of Coxsackievirus A16 and Enterovirus 71. *BioMed research international*. doi Artn 430247010.1155/2016/4302470
- Zocchi E, Usai C, *et al.* (1999). Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca²⁺ mobilization: role of NAD⁺ transport across cell membranes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(2): 273-283

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer an der Universität Hamburg waren die Damen und Herren:

Adam; Bisping; Bruchhaus; Burmester; Dausmann; Ganzhorn; Gilberger; Haas; Hanelt; Heinze;
Jürgens; Lüthen; Noack; Pommerening-Röser; Rohwer; Schäfer; Schmeisser; Schütte; Spieck;
Streit; Wittenburg

DANKSAGUNG

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

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Bernd Schmeck für die Überlassung des interessanten Themas sowie das in mich gesetzte Vertrauen und die Unterstützung in der Zeit dieser Arbeit. Ein besonderer Dank gilt Dr. Evelyn Vollmeister für die unermüdliche Betreuung und Unterstützung, für Diskussionen, unentwegte Ideen und Ratschläge, trotz mancher Disparitäten (☺) über die Jahre.

Ich danke meinen Kooperationspartnern, allen voran Prof. Dr. Andreas Kirschbaum für die Bereitstellung der Lungen und Aufnahme der Patienten in die Studie. Dein Eifer für die Forschung ist phantastisch, und ich hoffe, dass es noch weitere Projekte gibt, in welche Du Dich mit Deinen Fachkenntnissen einbringen kannst. Mein Dank gilt auch Dr. Andreas Klemmer und Dr. Lukas Jerrentrup, die sich bei dem HuLu-Projekt mit der Ethikkommission und den Patienten auseinander gesetzt haben. Prof. Dr. Uwe Völker, Dr. Kristin Surmann und Sascha Blankenburg danke ich für die Kooperation zur Proteomanalyse. Für die bioinformatische Unterstützung danke ich Prof. Dr. Julio Vera und Dr. Xin Lai sowie Dr. Wilhelm „Wigo“ Bertrams, deren Rat und Expertise bei der Analyse der Hochdurchsatzdaten essentiell waren und auch über R-eichlich Probleme hinweg geholfen haben. Dabei gilt auch Heiko Werner mein Dank für die Lösung eines gravierenden statistischen Problems, auch wenn du laut eigener Aussage „keine Ahnung“ von Statistik hast. Dr. Marc Strickert danke ich ebenfalls für seine vielen Versuche, mit Hilfe seiner *MAGIC* Sinn in den (letztlich doch nicht verwendeten) TLDA-Daten zu finden.

Für die technische Unterstützung im Labor danke ich Sarah Winterberg und besonders Isabell Beinborn – dank dir und deiner „schon vor dem Morgengrauen im Labor aktiv sein“-Hilfe waren manche Kokken-Tage nicht so lang wie sie andernfalls gewesen wären.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Korrekturleser. Allen voran Evelyn, die nahezu jedes Wort dieser Arbeit kritisch beäugt und unglaublich viele Verbesserungsvorschläge eingebracht hat (und dabei SO leider AUCH einige BEREITS tolle Sätze rausgestrichen hat ☺). Ich danke Lucie sehr für ganz viel konstruktive Kritik, guten Ideen und den frischen Blick aus einer anderen Perspektive. Vielen Dank auch an Wigo, Anna Lena und Katrin für die vielen hilfreichen Tipps (vor allem beim Formatierungshorror), Korrekturen und Fehlervermeidungen.

Ein besonderer Dank gilt Christina Herkt für das gemeinsame Durchbeißen über die Jahre und vor allem beim Schreiben. Danke für viele Tipps und Tricks, die mir viel Stress erspart haben. Und für gelegentliche Gehörstürze an eigentlich stillen, arbeitsreichen Nachmittagen, wenn man nichts Böses erwartet hat 😊 .

Ich danke allen (weiteren) aktuellen und ehemaligen Labormitgliedern, besonders allerdings Philipp, dem besten Lakaien der Welt; Christine für das Bekanntmachen des neuen Labors; Alex für viele hilfreiche Ratschläge; Marlene (wenn es jemand weiß, dann du) und allen anderen, die ich noch nicht erwähnt habe.

Der erste spezielle Dank geht an die Geek Battle Gruppe Wigo, Andreas und Marc für viele lustige Momente innerhalb und außerhalb des Labors, gesellige, spaßige, leckere und eigentlich zu wenige Abende, und nicht zu vergessen die Conventions. Der zweite spezielle Dank geht an die virologische Kaffee-Runde, die mich immer wieder auf andere Gedanken gebracht haben und Döner-Buddy Erik für so manche kreative Idee.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, den Hamburger Jungs samt Ihren Damen, die mich über die Jahre immer unterstützt und motiviert haben. Von ganzem Herzen danke ich Lucie für einfach alles - deine Unterstützung, Motivation (4%!), Geduld, Ideen, Ablenkung und dass ich immer auf dich zählen kann und du immer für mich da bist.