

Aus der Klinik für Innere Medizin V
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Einfluss von Interleukin-17 Rezeptor E und Interleukin-17C auf die experimentelle Pneumokokken-Pneumonie

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von: Patrick Steck
geboren am 09. Januar 1996 in Ulm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Zusammenfassung	9
2. Summary.....	11
3. Einleitung.....	12
3.1 Pneumonie	12
3.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
3.3 Virulenzfaktoren	16
3.4 Gegen Pneumokokken gerichtete angeborene Immunabwehr	19
3.4.1 Komplementsystem.....	20
3.4.2 Alveolarmakrophagen	20
3.4.3 Neutrophile Granulozyten.....	21
3.4.4 Epithel	22
3.5 Gegen Pneumokokken gerichtete adaptive Immunantwort.....	22
3.6 Myelopoese	23
3.7 Zytokine	24
3.8 IL-17 Zytokinfamilie.....	25
3.9 IL-17 Rezeptoren.....	27
3.10 Ziel dieser Arbeit	29
4. Material und Methoden.....	30
4.1 Tiere.....	33
4.2 Bakterienstamm	33
4.3 Murines Pneumokokken-Pneumoniemodell	33
4.3.1 Bakterienzahl in BALF, Lungengewebe und Blut	34
4.3.2 Lungenpräparation, Fixierung und histologische Schnitte	34
4.3.3 Inflammatorischer Score	35
4.3.4 Immunhistochemie.....	35
4.3.5 Immunhistologische Bewertung der Lungeninflammation	36
4.3.6 Durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks	36
4.3.8 RNS-Isolierung, cDNA-Synthese, quantitative RT-PCR.....	37
4.4 Enzyme-linked immuno assay (ELISA).....	39
4.5 Ex vivo Versuche.....	40
4.5.1 Gewinnung von murinen Alveolarmakrophagen	40
4.5.2 Stimulationsexperimente.....	40
4.5.3 Bakterienzahl im Medium.....	41
4.5.4 Phagozytose-Experiment	41
4.6 Statistische Analyse.....	42
5. Ergebnisse	43
5.1 Die Rolle von IL-17RE und IL-17C im murinen Pneumokokken-Pneumoniemodell.....	43
5.1.1 Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> führt zu Gewichtsverlust	43

5.1.2 <i>Il-17re^{-/-}</i> -Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Exposition einen geringeren Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge	44
5.1.3 <i>Il-17re^{-/-}</i> -Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Exposition eine geringere Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum	45
5.1.4 Die Defizienz für IL-17RE beeinflusst nur geringfügig die Eliminierung von <i>S. pneumoniae</i> in der Lunge	47
5.1.5 Die Bildung von G-CSF ist in Lungen von <i>Il-17re^{-/-}</i> -Mäusen vermindert.....	48
5.1.7 Die Anzahl TNF- α positiver Zellen ist in <i>Il-17re^{-/-}</i> -Mäusen vermindert.....	51
5.1.8 Die Defizienz für IL-17RE hat keinen Einfluss auf das Differentialblutbild nach Pneumokokken-Exposition	53
5.1.9 <i>Il-17c^{-/-}</i> -Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Exposition eine geringere Anzahl Entzündungszellen in der Lunge.....	54
5.1.10 <i>Il-17c^{-/-}</i> -Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Infektion eine geringere Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum	55
5.1.11 Die Defizienz für IL-17C beeinflusst nur geringfügig die Eliminierung von <i>S. pneumoniae</i>	56
5.1.12 Nach Pneumokokken-Exposition unterscheiden sich <i>Il-17re^{-/-}</i> - und WT-Mäuse in der Myelopoese geringfügig	56
5.1.13 IL-17A, IL-17C, IL-17D und IL-17RE werden bei Pneumokokken-Pneumonie vermehrt exprimiert.....	58
5.2 <i>Ex vivo</i> Versuche	59
5.2.1 IL-17C hat keinen Einfluss auf die <i>S. pneumoniae</i> -induzierte Zytokinsekretion durch murine Alveolarmakrophagen.....	59
5.2.2 <i>Il-17re^{-/-}</i> - und WT-Alveolarmakrophagen phagozytieren gleich effizient	61
6. Diskussion.....	62
6.1 Die Rolle von IL-17RE und IL-17C im murinen Pneumokokken-Pneumoniemodell.....	62
6.1.1 Durch <i>S. pneumoniae</i> herbeigeführter Gewichtsverlust	63
6.1.2 IL-17RE und IL-17C vermitteln die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, ohne den Makrophagen-Umsatz zu beeinflussen	63
6.1.3 IL-17RE hat keinen Einfluss auf die Sekretion von MIP-2 und KC	65
6.1.4 IL-17RE induziert G-CSF	66
6.1.5 Unbeeinflusste G-CSF Plasmakonzentration und Blutneutrophilenzahl.....	67
6.1.6 IL-17RE/IL-17C hat einen geringen Einfluss auf die bakterielle Klärung.....	67
6.1.7 IL-17RE hat Einfluss auf die Anzahl TNF- α -positiver Zellen in der Lunge	69
6.1.8 IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die Myelopoese und das Differentialblutbild.....	69
6.1.9 IL-17 Zytokinexpression.....	70
6.2 <i>Ex vivo</i> Versuche	71
6.2.1 IL-17C führt bei Pneumokokken-Exposition zu keiner vermehrten Zytokinsekretion durch murine Alveolarmakrophagen.....	71
6.2.2 <i>Il-17re^{-/-}</i> - und WT-Alveolarmakrophagen phagozytieren gleich effizient	72
6.3 Schlussbemerkung.....	73
7. Literaturverzeichnis	74
8. Abbildungsverzeichnis.....	92
9. Tabellenverzeichnis	93
10. Publikationen	94

11. Danksagung	95
12. Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2	96

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AEC	Aminoethyl carbazole
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BALF	Bronchioalveoläre Lavage Flüssigkeit
BSA	Bovine serum albumin
CAP	Community-acquired pneumonia
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CFU	Colony forming units
CMP	Common myeloid progenitor
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokine 8
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab-Fragment	Fragment antigen binding-fragment
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc-Fragment	Fragment crystallisable
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GMP	Granulocyte-monocyte progenitors
HAP	Hospital-acquired pneumonia
HE	Hämatoxylin-Eosin

H. influenzae***Hämophilus influenzae***

HSC	Haematopoietic stem cell
HSPC	Hematopoietic stem and progenitor cells
IgA	Immunglobulin A
IgA₁	Immunglobulin A1
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin-1
IL-17A	Interleukin-17A
IL-17B	Interleukin-17B
IL-17C	Interleukin-17C
IL-17D	Interleukin-17D
IL-17E	Interleukin-17E
IL-17F	Interleukin-17F
IL-17RA	Interleukin receptor 17A
IL-17RB	Interleukin receptor 17B
IL-17RC	Interleukin receptor 17C
IL-17RD	Interleukin receptor 17D
IL-17RE	Interleukin receptor 17E
IL-17RF	Interleukin receptor 17F
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-25	Interleukin-25
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
INF-γ	Interferon- γ
IRF	Interferon regulatory factors

K. pneumoniae***Klebsiella pneumoniae***

KC	Keratinocyte-derived chemokine
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
MPC	Mesenchymal progenitor cells
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain receptor 2
NOD-like-receptor	Nucleotide-binding oligomerization domain receptor
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NTHi	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>
OD	Optical density
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAR-1	Proteinase-activated receptor 1
PavA	Pneumococcal adherence and virulence factor A
PBS	Phosphate buffered saline
PMNL	Polymorphkernige neutrophile Leukozyten
PRR	Pattern recognition receptor
PspA	Pneumococcal surface protein A
qRT-PCR	Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RBC	Red blood cell
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

SD	Standard deviation
SEFIR	Similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SP	Surfactant protein
SP-A	Surfactant protein-A
SP-D	Surfactant protein-D
TAK1	TGF β -activated kinase 1
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-Zellrezeptor
TH17	T helper cells 17
TH2	T helper cells 2
THB	Todd Hewitt broth
TLR	Toll-like-Receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRAF6	TNFR-associated factor 6
TSA	Trypticase Soy Agar
WT	Wild Type

1. Zusammenfassung

Weltweit versterben jährlich Millionen Menschen an Infektionen der tiefen Atemwege. Insbesondere ältere Patienten erliegen an ambulant erworbenen Pneumonien, die in den meisten Fällen durch das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufen werden. Um den Organismus vor dem Eindringen des Erregers hinreichend zu schützen, bedarf es einer differenzierten Immunantwort. Das Zytokin Interleukin-17C (IL-17C) und sein funktioneller Rezeptor Interleukin-17 Rezeptor E (IL-17RE) sind seit einigen Jahren Gegenstand intensivster Forschung. IL-17C wird dabei eine modulatorische Funktion in der angeborenen, epithelialen Abwehr zugesprochen. Welche Rolle die IL-17C/IL-17RE-Achse bei der Pneumokokken-Pneumonie spielt, ist bislang jedoch ungewiss.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der IL-17C/IL-17RE-Achse auf die akute, durch *S. pneumoniae* hervorgerufene Pneumonie und die hieraus resultierende Entzündungsantwort anhand eines Mausmodells zu untersuchen.

Es wurden IL-17RE (*Il-17re^{-/-}*)- und IL-17C (*Il-17c^{-/-}*)-defiziente sowie Wildtyp (WT)-Mäuse intranasal mit *S. pneumoniae* infiziert und über einen Zeitraum von 78 Stunden hinsichtlich des Ausmaßes der Entzündung analysiert. Die Infektion der Lunge mit *S. pneumoniae* führte zu einer gesteigerten pulmonalen Expression von IL-17C, IL-17RE, IL-17A und IL-17D. Es zeigte sich, dass die Defizienz sowohl für IL-17RE als auch für IL-17C zu einem signifikant reduzierten Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge führte. Dies ging mit einer signifikant verminderten Bildung des Zytokins *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) und einer signifikant verringerten Anzahl von *tumor necrosis factor α* (TNF-α) – positiven Zellen einher. Sowohl bei WT- als auch bei *Il-17c^{-/-}*- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen kam es innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infektion zu einem starken Absinken der Anzahl an Alveolarmakrophagen. 72 h nach Infektion lag die Anzahl an Alveolarmakrophagen etwas über dem Niveau uninfizierter Mäuse. Die bakterielle Klärung unterschied sich nicht wesentlich zwischen *Il-17re^{-/-}*-, *Il-17c^{-/-}*- und WT-Mäusen. Gleiches galt für die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut. Der Anteil an *granulocyte-monocyte progenitors* (GMPs) und *mesenchymal progenitor cells* (MPCs) war bei *Il-17re^{-/-}*-Mäusen reduziert.

Ergänzend dazu wurde der Einfluss von IL-17C auf murine Alveolarmakrophagen untersucht. In *ex vivo* Experimenten erfolgte die Stimulation mit *S. pneumoniae* und IL-17C. Die Zytokinsekretion der Alveolarmakrophagen blieb dabei unter IL-17C Ko-Stimulation unverändert.

Um zu klären, ob der Verlust von IL-17RE die Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen beeinflusst, wurden entsprechende Zellen aus WT- und *Il-17re^{-/-}*-Tieren isoliert und *in vitro* mit fluoreszierenden Mikrosphären inkubiert. In der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse konnten keine Unterschiede in den Phagozytoseraten beider Gruppen gemessen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten während der Pneumokokken-Pneumonie von IL-17C und IL-17RE vermittelt wird, ohne dabei Einfluss auf die Aktivität und Erholung der Alveolarmakrophagen zu nehmen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die IL-17C/IL-17RE-Achse den pulmonalen Entzündungsprozess bei *S. pneumoniae* Infektion reguliert. Für die Therapie und den Verlauf von ambulant erworbenen Pneumonien könnte dieser Zusammenhang von Bedeutung sein.

2. Summary

Impact of interleukin-17 receptor E and interleukin-17C on the experimental pneumococcal pneumonia

Millions of people worldwide still die from lower respiratory tract infections every year. Particularly elderly patients suffer from community acquired pneumonia, commonly caused by the bacterium of *Streptococcus pneumoniae*. To protect the host from invading pathogens, a differentiated immune response is needed. The cytokine of interleukin-17C (IL-17C) and its functional receptor interleukin-17 receptor E (IL-17RE) are subjects of intense research for several years. Modulatory effects on the innate epithelial immunity are attributed to IL-17C. Nevertheless, the function of the IL-17C/IL-17RE-axis in pneumococcal pneumonia remains unclear. The aim of this doctoral thesis was to examine the influence of the IL-17C/IL-17RE-axis on the acute pneumonia caused by *S. pneumoniae* and to investigate the resulting inflammatory response by using a murine model.

IL-17RE (*Il-17re^{-/-}*)- and IL-17C (*Il-17c^{-/-}*)-deficient as well as wildtype (WT) mice were intranasally infected with *S. pneumoniae* and subsequently analysed over a period of 78 hours in regard to their inflammatory scale. The infection of the lung resulted in an increased pulmonary expression of IL-17C, IL-17RE, IL-17A and IL-17D. The deficiency of both IL-17RE and IL-17C appeared to reduce neutrophil granulocyte influx in the lung significantly. Furthermore, the production of the cytokine granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and number of tumor necrosis factor α (TNF- α) - positive cells were significantly decreased in IL-17RE deficient animals. Both in WT- and *Il-17c^{-/-}*- as well as *Il-17re^{-/-}*- mice alveolar macrophage count declined during the first 24 hours after infection, recovering completely 72 hours after infection. Bacterial clearance did not differ between *Il-17re^{-/-}*-, *Il-17c^{-/-}*- and WT-mice. Moreover, no differences in neutrophil blood count were detectable. The fraction of granulocyte-monocyte progenitors (GMPs) and mesenchymal progenitor cells (MPCs) was reduced in *Il-17re^{-/-}*-mice.

Complementary the effects of IL-17C on murine alveolar macrophages were studied. *Ex vivo* trials were performed, stimulating cells with *S. pneumoniae* and IL-17C. Whereas alveolar macrophage cytokine secretion did not change under IL-17C costimulation.

To clarify if the absence of IL-17RE has an impact on the phagocytosis activity of alveolar macrophages, cells have been isolated from WT- and *Il-17re^{-/-}*-mice. After incubation with fluorescent particles *in vitro*, flowcytometric analysis has been conducted. However, no differences in phagocytosis rate between both groups were notable.

The results of this thesis show that neutrophil granulocyte recruitment during pneumococcal pneumonia is mediated by IL-17C and IL-17RE without affecting the activity nor recovery of alveolar macrophages. These findings suggest that the IL-17C/IL-17RE-axis regulates the pulmonal inflammation process within *S. pneumoniae* infection. This could be crucial for the therapy and progression of community acquired pneumonia.

3. Einleitung

3.1 Pneumonie

Akute Infektionen der Lunge fordern jährlich 4 Millionen Tode weltweit und stellen nach wie vor eine immense Last für das Gesundheitssystem dar [218, 240]. Es ist davon auszugehen, dass mehr als ein Drittel, der durch ansteckende Krankheiten verursachten Tode, auf solche Infekte der unteren Atemwege zurückzuführen sind [73, 163]. Pneumonien sind dabei keineswegs eine alleinige Komplikation von immunsupprimierten Patienten, sondern repräsentieren ein ernstzunehmendes Problem der älteren und sehr jungen Bevölkerung. Die Mehrheit aller Patienten hat ein Alter von 65 Jahren überschritten. Über 90% der Pneumonie-bedingten Tode sind in dieser Altersgruppe zu finden, während sie in Entwicklungsländern die Haupttodesursache unter Kleinkindern darstellen [56, 70, 160, 218, 231]. Selbst in Europa zeigt sich dabei eine nicht zu unterschätzenden Mortalität, die bei schwerem Verlauf bis zu 48% beträgt [239].

Unter physiologischen Bedingungen ist die Lunge nahezu steril [249]. Bakterien aus der Mundhöhle und des Rachenraums erreichen jedoch über die eingeatmete Luft und Mikroaspirationen die Atemwege und werden fortlaufend eliminiert. Gelingt dies nicht und es kommt zum Eindringen mikrobieller Pathogene, entsteht innerhalb der Alveolen und deren Umgebung eine Entzündungsreaktion, die zum Bild einer Pneumonie führt. Hierbei muss zwischen drei Formen der Pneumonie unterschieden werden. Die ambulant erworbene Pneumonie (*community-acquired pneumonia*, CAP), die nosokomial erworbene Pneumonie (*hospital-acquired pneumonia*, HAP) sowie die Pneumonie des immunsupprimierten Patienten [198]. Unter einer CAP versteht sich eine Infektion der Lunge mit Zeichen eines unteren Atemwegsinfektes, die nicht mit einem kürzlichen Krankenhaus- oder Aufenthalt in einer Langzeitpflegeeinrichtung assoziiert ist. Für die Diagnosestellung ist der positive radiologische Nachweis von neu aufgetretenem Infiltrat meist obligat. Im Gegensatz dazu ist die nosokomiale Pneumonie durch das Auftreten von Symptomen innerhalb von mindestens 48 h nach Aufenthalt in einer medizinischen Einrichtung definiert [6, 78]. Wird die Erkrankung durch einen Erreger des opportunistischen Spektrums unter supprimiertem Immunsystem hervorgerufen, ist sie als Pneumonie unter Immunsuppression zu klassifizieren [54]. In der folgenden Arbeit wird lediglich auf die CAP näher eingegangen.

Streptococcus pneumoniae ist nicht nur in Europa, sondern weltweit der häufigste Auslöser der CAP des Erwachsenen. Andere, frequente Agenzien sind respiratorische Viren, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* [51, 237, 239]. Die Bedeutung dieser Diplokokken wird auch bei der kindlichen Pneumonie deutlich, welche trotz effektiven Impfungen zu 60% bakteriell bedingt ist und 73% der Erkrankungen auf *S. pneumoniae* zurückzuführen sind [160].

Anfangs tritt der Pneumokokken-Infekt meist durch eine unspezifische Erkältungssymptomatik zum Vorschein. Dringt das Bakterium im weiteren Verlauf jedoch in die unteren Atemwege vor, versucht das Immunsystem die Lunge durch diverse Verteidigungsmechanismen zu schützen. Gelingt es zu

diesem Zeitpunkt nicht den Erreger aufzuhalten, kommt es meist zur Inflammation mit dem Vollbild einer Pneumokokken-Pneumonie [231]. Typischerweise zeigt sich diese durch ein plötzlich einsetzendes, starkes Krankheitsgefühl, Schüttelfrost, Fieber, produktiven Husten, atemabhängigen Brustschmerz, Verwirrtheit und Dyspnoe [78, 231]. Bei älteren Patienten sind diese Symptome oftmals schwächer ausgeprägt und dürfen nicht zum Trugschluss einer geringeren Krankheitsschwere führen, da sie meist durch einen weitaus komplizierteren Verlauf gekennzeichnet ist [14, 56]. Bei der durch Pneumokokken verursachten Lobärpneumonie können häufig vier charakteristische makro-pathologische Phasen beobachtet werden. In der hyperämischen Anschoppungsphase kommt es in den Alveolen als erstes zur Ansammlung von neutrophilen Granulozyten und proteinreichem Exsudat. Darauf folgt die Phase der roten Hepatisation, verursacht durch massig extravaskuläre Erythrozyten, Fibrin und vermehrt Granulozyten. Das dritte Stadium wird graue Hepatisation genannt. Hier zeigen sich die Lappen gräulich, trocken. Das Granulozytenexsudat ist rückläufig, während es zur Einwanderung von Makrophagen kommt. Die letzte Phase ist die sogenannte gelbe Hepatisation. Sie bezeichnet vornehmlich die enzymatische Auflösung des gebildeten Fibrins und damit die Wiederherstellung der normalen Lungenfunktion. Makrophagen sind hier der dominierende Zelltypus [75, 250]. Dabei kommt es häufig zu einer Schädigung der Blut-Luft-Schranke, welche vom Lungenepithel und Gefäßendothel gebildet wird. Dies ist nicht nur der Pathogenität des Erregers, sondern auch einer überschießenden Inflammation zuzuschreiben, womit es zu einer kritischen Störung des Gasaustausches kommen kann [93]. Diverse Virulenzfaktoren sind für eine derart parenchymschädigende Wirkung verantwortlich. Beispielsweise führt das von *S. pneumoniae* gebildete Pneumolysin zu einer vermehrten Kapillarpermeabilität. Nicht selten kann hieraus ein massives Lungenödem entstehen [245].

Die Gabe von Antibiotika stellt die kausale Therapie einer Pneumokokken-Pneumonie dar. In neuester Zeit werden dabei immer mehr resistente Stämme registriert. Dennoch zeigt sich *S. pneumoniae*, insbesondere in Deutschland, meist empfindlich gegenüber Penicillinen [106]. Bei der Behandlung der unkomplizierten CAP hat sich eine frühe antibiotische Therapie bestehend aus Aminopenicillinen, evtl. in Kombination mit einem Betalaktamaseinhibitor sowie Fluorochinolonen, Makroliden oder Cephalosporinen der 3. Generation bewährt [198]. Bleibt die CAP unbehandelt, kann sie jedoch zu respiratorischem Versagen und einer Sepsis mit letalem Ende führen [7]. Zur Primärprophylaxe stehen zwei Impfstoffe gegen Pneumokokken zur Verfügung. Der Polysaccharid-Impfstoff, welcher gegen die, in Entwicklungsländern, 23 häufigsten Krankheit verursachenden Serotypen gerichtet ist und der 13-valente Konjugatimpfstoff. Bei beiden Impfstoffen handelt es sich um Totimpfstoffe, welche die Bildung von Antikapselantikörpern induzieren. Der Konjugatimpfstoff findet dabei vornehmlich bei Kindern unter 2 Jahren und der Polysaccharidimpfstoff bei Erwachsenen Einsatz. Die moderne Impfstoffentwicklung zielt hingegen insbesondere auf eine Immunantwort gegen diverse Pneumokokken-Oberflächenproteinen ab [31, 231].

3.2 *Streptococcus pneumoniae*

Das Bakterium *S. pneumoniae* gilt als häufigster Auslöser der ambulant erworbenen Pneumonie. Unter den infektiösen Erkrankungen zeigt diese Form der Lungenentzündung die höchste Mortalität weltweit [51, 231]. Allein in Deutschland werden jährlich etwa 150.000 ambulante Pneumonie-Fälle mit *S. pneumoniae* als Hauptverursacher gelistet. Bei 63.000 – 105.000 dieser Patienten kommt es zur Hospitalisation [259]. Die Verbreitung des Erregers erfolgt hauptsächlich über Tröpfcheninfektion und nahen Kontakten, zum Beispiel durch gemeinsam genutzte Trinkflaschen [134]. Dabei ist die Pathogenität von *S. pneumoniae* keineswegs auf die unteren Atemwege beschränkt. Das Spektrum der durch diesen Erreger verursachten Krankheiten ist weit und beinhaltet unter anderem Sinusitiden, Mittelohrentzündungen, Meningitiden, Peritonitiden und Septitiden [169]. Vor allem bei Risikogruppen wie Kleinkindern, älteren- und immunsupprimierten Menschen, oder Asplenikern kommt es häufiger zur Erkrankung mit schwerem Verlauf [146]. Unter dem Lichtmikroskop imponieren die fakultativ anaeroben *S. pneumoniae* als lanzettförmige, grampositive und paarweise angeordnete Diplokokken. Auf Blutagar zeigen sich schleimige, glatte, α -hämolyisierende Kolonien mit zentraler Eindellung. Im Gegensatz zu anderen Streptokokken zeichnen sich Pneumokokken durch Gallenlöslichkeit und Optochin-Empfindlichkeit aus [75]. *S. pneumoniae* ist von einer Zellwand umgeben, die im Wesentlichen aus einer Teichonsäure-bindenden Peptidoglykanschicht und integrierten Oberflächenproteinen besteht. Die Teichonsäure stellt das sogenannte C-Polysaccharid dar, welches aus der Zellwandinnen- und Außenseite hinausragt und ein hohes antigenes Potential besitzt [10, 63, 166, 209]. An die Zellwand ist in den meisten Fällen eine Kapsel aus Polysacchariden aufgelagert. Ihr kommt eine protektive Rolle zu. Ein weiteres in der Plasmamembran lokalisierte Antigen ist das F-Antigen. Hierbei handelt es sich um eine Lipoteichonsäure, die einen inhibitorischen Effekt auf das von Pneumokokken exprimierte Autolysin verübt [42, 96, 209]. Anhand unterschiedlicher Antigeneigenschaften der Kapsel konnten bisher über 90 verschiedene Serotypen identifiziert werden [89]. Beispielsweise ist der in dieser Arbeit verwendete Stamm D39 ein virulenter Vertreter des Serotyps 2. Er wurde 1916 erstmals aus einem Patienten isoliert und stellt seither einer der meist verwendeten Stämme in der Erforschung von Pneumokokken verursachten Erkrankungen dar [131]. Das Bakterium gilt als nicht obligat pathogene Kommensale des menschlichen Nasenrachenraumes. Demzufolge nimmt ein Großteil der Bevölkerung, vor allem Kinder, zeitweise einen Trägerstatus ein. Obwohl es sich zumeist um eine asymptomatische Besiedelung der Schleimhäute handelt, gilt diese Kolonisation als Grundvoraussetzung für die Krankheitsentstehung. Zur Erkrankung kommt es, wenn Pneumokokken in den vermeintlich keimfreien Raum der unteren Atemwege eindringen und in den Blutkreislauf gelangen (Abb. 1) [21, 55, 238].

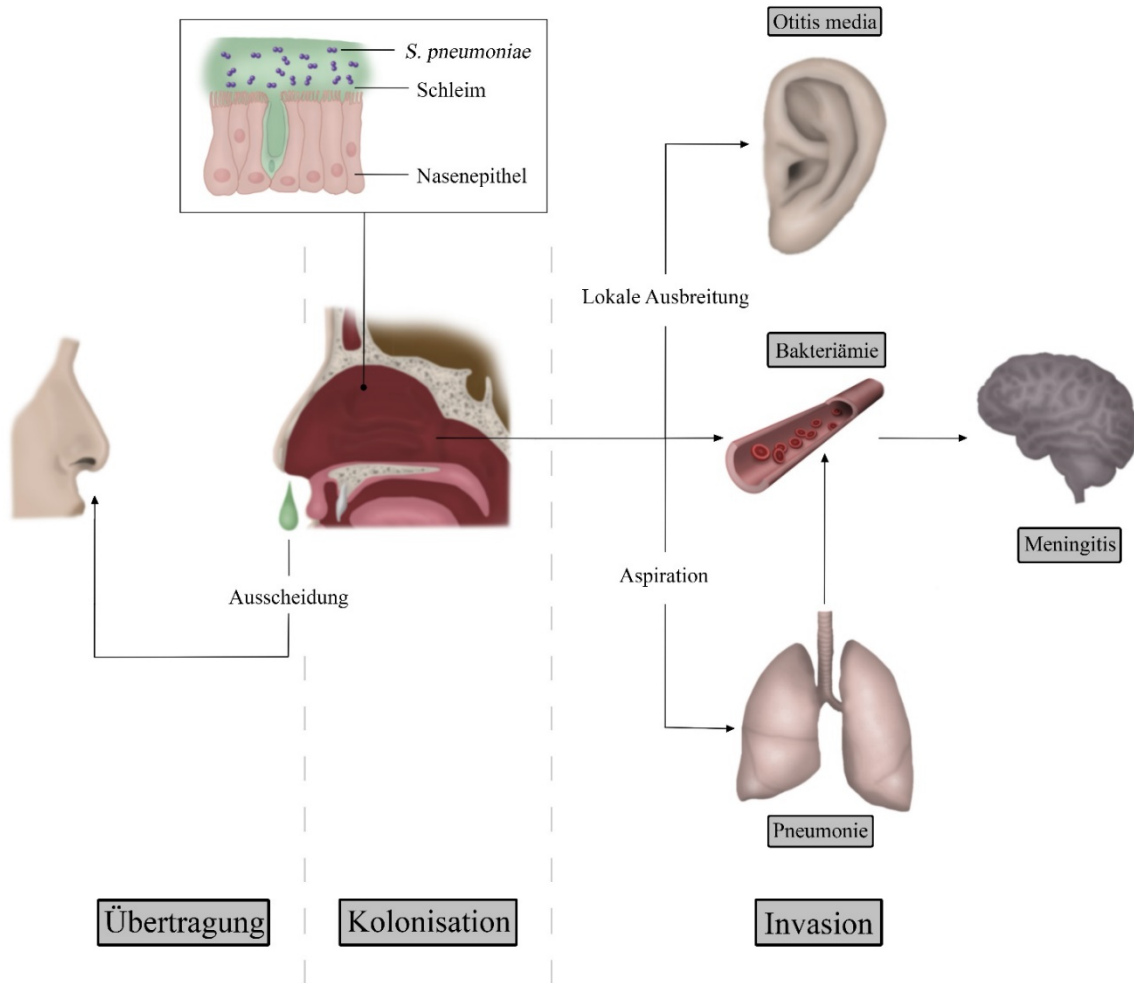


Abbildung 1: Pathogenese der Pneumokokken-Erkrankungen (nach [120, 238])

S. pneumoniae besiedelt die Schleimhäute der oberen Atemwege. Die Kolonisation dieser Nische ist Grundvoraussetzung für die Übertragung und invasive Erkrankungen. Die Erreger können durch die Nase über Sekretproduktion ausgeschieden und auf einen neuen Wirt übertragen werden. Durch lokale Ausbreitung und Aspiration kann es zu Pneumonien oder Mittelohrenzündungen kommen. Der Übertritt des Erregers in die Blutzirkulation kann zur systemischen Infektion und auch Meningitiden führen.

3.3 Virulenzfaktoren

Zur Pathogenität eines Erregers tragen gewisse Oberflächenmoleküle bei, die als sogenannte Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Diese erleichtern dem Bakterium beispielsweise das Eindringen in den Organismus oder dienen dazu der Immunabwehr zu entkommen. *S. pneumoniae* besitzt eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die zur Kolonisation und Krankheitsentstehung beitragen. Die wichtigsten werden im folgenden Abschnitt aufgelistet und dargestellt (Abb. 2).

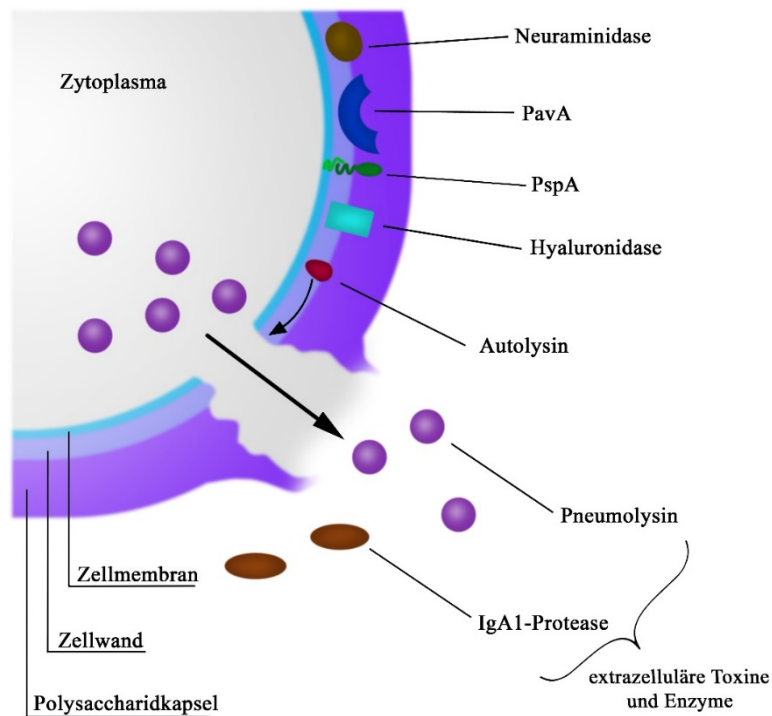


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* (nach [231])

Die Virulenzfaktoren Neuraminidase, *Pneumococcal adherence and virulence factor A* (PavA), *Pneumococcal surface protein A* (PspA), Hyaluronidase und Autolysin sind in der Zellwand lokalisiert. Autolysin spaltet im aktivierten Zustand Bestandteile der Zellwand was zur Zellyse mit Freisetzung von Pneumolysin, anderen Toxinen und Enzymen führt. Das intrazellulär gelegene Pneumolysin kann dadurch nach extrazellulär gelangen. Der wohl bedeutendste Virulenzfaktor ist die Polysaccharidkapsel, welches das Bakterium umgibt.

Kapsel

S. pneumoniae wird von einer Kapsel umhüllt, welche als bedeutendster Virulenzfaktor des Bakteriums gilt. [238] Ihre Hauptaufgabe besteht darin, das Bakterium vor Phagozytose zu schützen. Sie ist zum größten Teil aus Polysacchariden aufgebaut, welche mit wenigen Ausnahmen, kovalent mit der Zellwand verankert sind [11, 214]. Es hat sich gezeigt, dass die Virulenz und Fähigkeit der Kolonisation eines Stammes vor allem von der Kapselzusammensetzung und zu einem geringeren Teil von der Kapseldicke abhängt. Im Tierversuch zeigten bekapselte Stämme eine weitaus niedrigere letale Dosis 50 (LD50), vermehrte Invasivität und Kolonisation als unbekapselte Vertreter [142, 236] Dies erklärt sich durch das Verdecken der stark immunogenen Zellwand. Folglich wird die Opsonierung behindert, indem die Komplement- und Antikörperbindung reduziert wird [1, 102, 242]. Darüber hinaus ist die Kapseloberfläche stark geladen, was die Eliminierung durch Phagozyten zusätzlich hemmt [136]. Durch die negativ geladenen Polysaccharide gelingt es den Bakterien außerdem dem Schleimeinschluss und der mukoziliären *Clearance* zu entkommen. Dies begünstigt die Erregerverbreitung [238].

Pneumolysin

Einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* ist Pneumolysin. Das Enzym trägt beachtlich zur hohen Virulenz, Letalität und Übertragung der Pneumokokken-Infektion bei [17, 238]. Die Wirkung des Toxins ist vielseitig und beruht hauptsächlich auf seinen zytolytischen Eigenschaften. Die Aktivierung von Pneumolysin erfolgt dabei durch membranassoziiertes Cholesterin der Zielzelle, was zur Integration in deren Lipidmembran führt. Durch die Bildung von Oligomeren entstehenden Poren, durch die Wasser in die Zelle strömt [19]. Vor allem Erythrozyten, aber auch abwehrrelevante polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNL) und Thrombozyten sind von der Zytolyse betroffen [18, 113]. Darüber hinaus kommt es bei Pneumolysin-stimulierten Monozyten zur Ausschüttung von Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukinen [98]. Bei anderen Zellen des Immunsystems entfaltet das Toxin hingegen eher inhibitorische Effekte. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Migration und der oxidative Burst von PMNL durch Pneumolysin reduziert und opsonierte Pneumokokken vermindert abgetötet werden [180]. Auch anti-lymphoproliferative Eigenschaften sowie eine Verringerung der Lymphokin- und Immunglobulinsekretion können dem Enzym zugeschrieben werden [59]. Es konnte gezeigt werden, dass allein die Applikation von rekombinanten Pneumolysin zu schweren Lobärpneumonien in Rattenlungen führt [57]. Dies mag dadurch zu erklären sein, dass frei zirkulierendes Pneumolysin durch unspezifische IgG-Bindung den klassischen Komplementweg aktiviert. Dadurch werden weniger Bakterien opsoniert, womit das Ausmaß der Entzündung und die pulmonale Schädigung zunehmen [181, 216]. Hinzukommen eine limitierte pulmonale Klärung durch Hemmung der Zilienmotilität sowie toxische Effekte auf Pneumozyten und Kapillarendothel, die zur erhöhten Permeabilität der Lungenbarriere beitragen. Diese Pathomechanismen erleichtern dem Bakterium die Penetration bzw. Systeminvasion und schaffen Verständnis für die Entstehung des Vollbildes einer Pneumokokken-Pneumonie [113, 195, 196].

IgA1-Protease

Bei der IgA₁-Protease handelt es sich um ein Enzym, welches humane IgA₁- und sekretorische IgA-Antikörper zu spalten vermag. Antikörper der Klasse IgA₁ stellen einen wesentlichen Teil der Schleimhautabwehr gegen *S. pneumoniae* dar. Die enzymatische Spaltung in Fab- und Fc-Fragmente limitiert die Immunoglobulin vermittelte Immunantwort. Dadurch wird die Kolonisation der Nasen-Rachen-Mukosa erheblich erleichtert [122, 143, 185, 235].

Autolysin

Autolysin ist eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase [95]. Ein Enzym welches durch Abspaltung von Zellwandkomponenten für die Freisetzung von intrazellulär lokalisierten Toxinen wie Pneumolysin und Neuraminidase sowie immunogenen Wandfragmenten sorgt (Abb. 2). Dieser Mechanismus trägt stark zur Gewebsschädigung und Inflammation bei [37, 112, 229]. Des Weiteren ist Autolysin bei der Antibiotika-induzierten Zellwand-Lyse, wie beispielsweise durch Penicillin, von Bedeutung [224].

Neuraminidase

Neuraminidase ist ein Enzym, welches seine Wirkung auf Zelloberflächen und in Körperflüssigkeiten entfaltet. Dort katalysiert es die Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Glykoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden. Vermutlich dient diese Reaktion der Demaskierung von Oberflächenrezeptoren für Pneumokokken-Adhäsine, wobei es zur zusätzlichen Schädigung des Wirtsorganismus kommen kann [127, 138, 174].

Hyaluronidase

Das Enzym Hyaluronidase spaltet Hyaluronsäuren der Extrazellulärmatrix und erleichtert damit dem Bakterium die Gewebsinvasion sowie Translokation [179].

PspA

Pneumococcal surface protein A (PspA) ist ein Oberflächenprotein, welches durch seine protektiven Eigenschaften die Virulenz der Pneumokokken steigert und deren Klärung reduziert [26, 156]. Es inhibiert die Aktivierung des alternativen Komplementweges indem es die Anlagerung von C3b unterbindet [228]. Außerdem besitzt es die Fähigkeit Lactoferrin zu binden und schützt das Bakterium vor der bakteriziden Wirkung von Apolactoferrin. Lactoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein der angeborenen Immunabwehr, welches durch Eisenrestriktion das Bakterienwachstum limitiert [83, 207].

PavA

Pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA) zählt zu den Fibronectin-bindenden Oberflächenproteinen. Es trägt während der Pneumokokken-Infektion zur Virulenz bei, indem es die Adhäsion zu Epithelzellen vermittelt [94].

3.4 Gegen Pneumokokken gerichtete angeborene Immunabwehr

Mit einer Oberfläche von bis zu 100 m² steht das Lungenepithel über eingeatmete Luft und Mikroaspirationen ständig mit der Umwelt und Mikrobiota der oberen Atemwege in Kontakt [43]. Daher muss die Lunge durch diverse Mechanismen vor schädlichen Umwelteinflüssen und Infektionen geschützt werden. Einer dieser Mechanismen ist die angeborene Immunabwehr. Unter ihr versteht man das Zusammenspiel zahlreicher mechanischer, zellulärer und humoraler Faktoren, die den Organismus unabhängig von vorherigen Kontakten in einer schnellen Reaktion vor Pathogenen schützen. Darüber hinaus kommt dem angeborenen Immunsystem eine wichtige Funktion bei der Initiierung einer adäquaten adaptiven Immunantwort zu [150]. Pneumonien verlaufen meist rasch progredient. In der frühen Phase der Erkrankung kann das naive, adaptive Immunsystem nicht angemessen greifen, weshalb die angeborene Abwehr hier eine bedeutende Rolle einnimmt [177, 178, 250]. Die mukoziliäre *Clearance* stellt dabei die erste mechanische Barriere dar, welche Pneumokokken am Übertreten in die Lunge hindert. Bedeckt von einer dicken Schleimschicht, hält das respiratorische Flimmerepithel Staub und Erreger über Zilienschlag und Husten von den unteren Atemwegen fern [202]. Kommt es dennoch zum Eindringen der Erreger in den nahezu sterilen Raum der unteren Atemwege, sind in erster Linie Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen aber auch gewebsständige Lymphozyten wie *innate Lymphoid cells* und $\gamma\delta$ T-Zellen die Schlüsselzellen der initialen Verteidigung [161, 250]. Um eindringende Erreger als potenzielle Bedrohung zu identifizieren, müssen die Zellen der angeborenen Immunabwehr diese als solche erkennen. Für diesen Prozess sind sogenannte *Pattern recognition receptors* (PRRs) maßgeblich [3]. Die für die Pneumokokken-Erkennung wichtigsten Rezeptoren sind C-reaktives Protein, *Toll-like* - (TLR), *Scavenger*- und *NOD-like*-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind in verschiedenen Kombinationen in so gut wie allen bekannten Zelltypen zu finden und erkennen erregerspezifische Struktur motive, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), von Mikroorganismen und Viren. [3, 178]. Bei den PAMPs handelt es sich um vielfältige Strukturen wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, DNS und RNS. Sie können sich wie Lipoteichonsäure und Lipoproteine an der Oberfläche der Mikroorganismen befinden. PAMPs wie bakterielle RNS und DNS können auch erst durch z.B. den Verdau im Endosom oder durch Autolyse freigesetzt werden [3]. Auch körpereigene Strukturen gelten als Aktivoren und werden *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) genannt [35]. PRRs dienen der Einleitung von Signalkaskaden. Die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren weist klassenabhängig verschiedene Bindungsstellen auf, was zu der jeweiligen Spezifität für die Liganden führt. TLR2 erkennt hauptsächlich Zellwandbestandteile, die bei grampositiven Bakterien vorkommen, wie Lipoteichonsäure und Lipopeptide, während TLR5 Flagellin und TLR4 LPS detektieren [144, 203]. Bei der Phagozytose von Pneumokokken nehmen TLR9-, welcher vor allem bakterielle DNS detektiert und der *Scavenger* A-Rezeptor MARCO, eine bedeutende Rolle ein. Beide Rezeptoren sind vornehmlich in Alveolarmakrophagen anzutreffen [4, 9]. Darüber hinaus dienen zytosolisch lokalisierte PRRs der Identifikation intrazellulärer Pathogene sowie von Faktoren, die ins Zytosol gelangen. So ermöglicht der NOD2 Rezeptor, Erreger anhand charakteristischer

Muramyldipeptide zu erkennen [173]. Nach Bindung von PRRs an ihre spezifischen Liganden kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden, die unter anderem über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und IRFs (*Interferon regulatory factors*) sowie dem Inflammasom die Bildung von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden regulieren. Im Falle einer akuten Pneumonie vermittelt das angeborene Immunsystem auf diese Weise die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Zudem wird auch häufig das Komplementsystem aktiviert. So bindet C-reaktives Protein an die Zellwand von *S. pneumoniae* und dient als Aktivator des Komplementsystems [3, 219].

3.4.1 Komplementsystem

Das aus über 30 Proteinen bestehende Komplementsystem stellt einer der effektivsten Abwehrmechanismen gegen *S. pneumoniae* dar. Die enzymatische Signalkaskade kann über 3 verschiedene Wege, dem klassischen-, alternativen- und Lektin-Weg, aktiviert werden. Deren gemeinsames Ziel ist die Abwehr von Mikroorganismen durch Opsonierung und Lyse. Erreicht wird dies über die gemeinsame Endstrecke, welche die Bildung von den chemotaktischen Anaphylatoxinen C3a und C5a, dem Opsonin C3b und einem sogenannten Membranangriffskomplex zur Folge hat [201]. Dieser Membranangriffskomplex entspricht einer in der Bakterienmembran lokalisierten Pore, welche durch Wassereinstrom zur Lyse des Erregers führt [168]. Dem klassischen Weg kommt bei der Abwehr von Pneumokokken die größte Bedeutung zu [27]. Jener wird durch die Bindung von natürlichen Antikapsel-Antikörpern oder Akute-Phase-Proteinen, wie Serumamyloid P-Komponente oder C-reaktives Protein an die Bakterienoberfläche initiiert [27, 164, 257]. Der etwas weniger effektive, alternative Weg scheint durch die antikörperunabhängige Aktivierung vor allem beim nicht-immunisierten Wirt eine Rolle zu spielen. Er wird durch Teichonsäure in der Pneumokokken-Zellwand in Gang gesetzt [243].

3.4.2 Alveolarmakrophagen

Die zu den professionellen Phagozyten zählenden Alveolarmakrophagen stammen von Monozyten ab, die aus dem Dottersack oder der Leber stammen und bereits die embryonale Lunge besiedeln [221]. Sie dienen als erste Instanz der Eliminierung eindringender Pathogene und Fremdpartikel [50, 232]. Ihre Bedeutung in der Verteidigung gegen bakterielle Erreger ist fundamental. Sie beschränkt sich bei weitem nicht nur auf die Phagozytose von Erregern, sondern umspannt die Rekrutierung anderer Immunzellen über Zytokine, Inflammationsinduktion, als auch Resolution der Entzündung und Gewebshomöostase [23, 88]. Alveolarmakrophagen entfalten zudem ein antimikrobielles Potenzial über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Stickoxide [58]. Alveolarmakrophagen sind in der

Lage mit dem Alveolarepithel zu kommunizieren und hierüber die Immunantwort zu modifizieren [241]. Kommt es zur Schädigung des Epithels durch Bakterien, werden die Makrophagen vom Epithel losgelöst und durch PAMP und DAMP Freisetzung aktiviert. In diesem aktiven Zustand sind die Fresszellen befähigt die Pathogene zu phagozytieren [130]. Dabei kann die Bindung bekapselter Bakterien wie *S. pneumoniae* am effizientesten erfolgen, wenn eine vorherige Opsonierung durch Komplement oder Antikörper stattgefunden hat [77]. Phagozytierte Erreger werden daraufhin durch diverse Enzyme wie Proteasen, Lysozym oder Sauerstoffradikale abgetötet [58]. Die Makrophagen werden hierdurch wiederum selbst zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 angeregt. Diese Botenstoffe führen unter anderem zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen wie neutrophiler Granulozyten und einer Amplifizierung der Immunantwort [23]. Doch Alveolarmakrophagen nehmen nicht nur eine proinflammatorische, sondern auch eine entzündungsprotektive Rolle ein. Durch Phagozytose apoptotischer PMN's beseitigen sie potenziell gewebeschädigende Enzyme und Radikalquellen und limitieren eine überschießende Immunantwort der Pneumokokken-Pneumonie [88, 124]. Bei einer *S. pneumoniae* Pneumonie kommt es zumindest im Mausmodell zu einem vorübergehenden Verlust an Alveolarmakrophagen und zur anschließenden Rekrutierung von Monozyten aus dem Blutkreislauf in die Lunge [91, 154, 244]. Inwiefern Makrophagen, welche sich aus rekrutierten Monozyten differenzieren, die ursprünglichen Alveolarmakrophagen dauerhaft nach Gesundung ersetzen, ist Gegenstand aktueller Forschung [167].

3.4.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten zählen zu den professionellen Phagozyten [121]. Nach der Initialabwehr durch Alveolarmakrophagen sind sie, als Haupteffektorzellen der Verteidigung, maßgeblich für eine effiziente Pneumokokken-Klärung verantwortlich [74]. Nimmt die Erregerzahl in der Lunge weiterhin zu, kommt es dementsprechend auch zur vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen. Dabei konnte im Mausmodell 12-16 h nach Infektion mit *S. pneumoniae*, parallel zum beschleunigten Bakterienwachstum, ein enormer Einstrom in die Lunge beobachtet werden [119, 121]. Mittels chemotaktisch wirkender Zytokine wie IL-8 (KC bei der Maus) und MIP-2 sowie Pneumokokken-Bestandteilen wie Pneumolysin, werden die Neutrophilen zur Diapedese durch das pulmonale Endothel hindurch angeregt [47, 149, 217]. Im Alveolarraum angekommen dienen sie der Eliminierung überwiegend opsonierter Pathogene durch Phagozytose, lytische Enzyme und radikalhaltige Granula. Sie modulieren selbst die Immunantwort durch Zytokinsekretion. Jedoch kann es zu einer überschießenden Neutrophilenabwehr kommen. Diese hat Strukturdefekte und prolongierte Entzündungen der Lunge zur Folge [30, 80].

3.4.4 Epithel

Das respiratorische Epithel der Atemwege stellt durch Muzine, Zilienschlag und *Tight Junctions* nicht nur eine passive, physikalische Barriere dar, sondern ist auch aktiv an der Immunabwehr gegen *S. pneumoniae* beteiligt [202]. Über PRRs erkennen Atemwegsepithelzellen eindringende Pathogene und reagieren durch die Sezernierung antimikrobieller Peptide wie Lactoferrin, Defensine, Cathelizine und Lysozym [152, 223]. Beispielsweise bindet Lactoferrin Eisen und entzieht den Bakterien dadurch einen wichtigen Nährstoff, wohingegen Lysozym durch Zellwandhydrolyse bakterizid wirkt [8, 40]. Eine weiterreichende Immunmodulation wird durch die Freisetzung von Zytokinen wie IL-6, CXCL8, GM-CSF, G-CSF und IL-17C erreicht. Diese Botenstoffe vermitteln die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten und stimulieren die Bildung neuer Immunzellen [177, 184].

Unter den Alveolarepithelzellen werden zwei Arten unterschieden. Der Großteil der Lungenbläschenoberfläche wird von Alveolarepithelzellen vom Typ I ausgekleidet. Sie dienen hauptsächlich dem Gasaustausch. Die Hauptaufgabe der Typ II Zellen ist die *Surfactant*-Produktion. Außerdem sezernieren sie Zytokine und eine Vielzahl an antimikrobiellen Peptiden. Zu diesen zählen unter anderem die *Surfactant* Proteine SP-A und SP-D, welche einen direkt antimikrobiellen- und opsonierenden Effekt entfalten. Eine Eigenschaft die durch Erhöhung der Zellpermeabilität und Veränderung der Nährstoffaufnahme erreicht wird. Außerdem tragen sie zur Rekrutierung von Neutrophilen und T-Zellen bei [82, 87, 116, 151].

3.5 Gegen Pneumokokken gerichtete adaptive Immunantwort

Unter der adaptiven- oder erworbenen Immunabwehr versteht man eine effektive, antigenspezifische Verteidigung, deren Hauptakteure der lymphatischen Zelllinie angehören. Sie bildet sich erst nach Pathogenkontakt aus [22].

In der Kinetik der *S. pneumoniae*-Infektion können mehrere Phasen identifiziert werden. Dabei kommt es im letzten Abschnitt zu einer Stase oder auch Abnahme des Bakterienwachstums. Auf den anfänglichen Neutrophileneinstrom folgt dann die Akkumulation von lymphatischen T- und B-Zellen. Dies findet hauptsächlich in den peribronchialen und perivaskulären Entzündungsherden statt [118, 119]. T-Zellen können über Zytokine oder Antigenpräsentation aktiviert werden [230]. In diesem aktivierten Zustand sind T-Zellen weder zur Phagozytose befähigt, noch haben sie zytotoxische Effekte. Sie können diese aber sekundär durch die Freisetzung von Zytokinen einleiten. Interferon Gamma (INF- γ) gehört diesen Zytokinen an. INF- γ wirkt chemotaktisch sowie aktivierend auf Makrophagen und natürliche Killerzellen [197]. Eine vorherige Kolonisation mit einem bestimmten Pneumokokken-Stamm kann dabei zu einer beschleunigten Klärung durch CD4+ Th-17 Zellen führen. Diese außerordentliche Rolle der CD4+ T-Zellen wird durch die hohe Frequenz schwerer Pneumokokken-Pneumonien bei AIDS Patienten deutlich [225]. Darüber hinaus kann es zu einer antigenspezifischen T-Zellantwort mit

Immunisierung gegen den jeweiligen Bakterienstamm kommen. Gegen die Polysaccharidkapsel und Oberflächenproteine gerichtete Schleimhaut IgA- sowie systemische IgG- und IgM-Antikörper schützen dann vor einer erneuten Kolonisation und Invasion, indem sie die Eliminierung durch Phagozyten beschleunigen [190]. Dabei wird die B-Zell Immunglobulinproduktion durch aktivierte T-Helfer-Zellen angeregt. Ihr T-Zellrezeptor (TCR) erkennt Pneumokokken-Fragmente, die von MHCII exprimierende Zellen wie Makrophagen, Dendritischen- und B-Zellen präsentiert werden [22].

3.6 Myelopoese

Die Bildung und Reifung der Blutzellen wird unter dem Begriff Hämatopoese zusammengefasst. Sie findet im Knochenmark und lymphatischen Organen statt. Dabei können zwei aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehende, Hauptzelllinien unterschieden werden: Die lymphatische- und myeloische Zellreihe. Die Entwicklung letzterer wird als Myelopoese bezeichnet und findet lediglich im Knochenmark statt. Aus ihr gehen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten hervor. Ausgehend von der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSC) erfolgt die weitere wachstumsfaktoren-abhängige Differenzierung in die jeweiligen Progenitorzellen. Mit fortschreitender Zellreihe nimmt auch das Differenzierungspotenzial ab [84, 162]. Betrachtet man lediglich die granulozytäre- und monozytäre Zellreihe, geht die gemeinsame myeloische Vorläuferzelle „*common myeloid progenitor*“ (CMP), aus der HSC hervor. Die CMP kann sich weiter zur granulozytären und monozytären Vorläuferzelle „*Granulocyte-Monocyte progenitor*“ (GMP) und diese wiederum zu Myeloblasten entwickeln, um final in Granulozyten und Monozyten zu differenzieren [108]. Bei der Reifung neutrophiler Granulozyten können weitere Stadien unterschieden werden. Neutrophile Granulozyten werden auf der Stufe des segmentkernigen Granulozyten in die periphere Blutzirkulation entlassen. Sind vermehrt unreife Vorläuferzellen wie stabkernige Granulozyten in der Peripherie anzutreffen, spricht man von Linksverschiebung. Diese kann reaktiv, im Rahmen einer Infektion, aber auch pathologischen Ursprungs sein [97]. Im Zuge einer Infektion erhöht sich insbesondere der Bedarf an Neutrophilen und Monozyten, weshalb eine gesteigerte „Notfall-Myelopoese“ eingeleitet wird. Durch Aktivierung der Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark kommt es zur vermehrten Ausreifung und Mobilisation von Zellreserven in die Zirkulation. Dies kann durch spezielle Zytokine, sogenannte Wachstumsfaktoren bzw. über mikrobielle Bestandteile wie PAMPs reguliert werden [162]. Dementsprechend können Pathogene die Sekretion einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine bewirken, welche die Differenzierung der HSC in Richtung der myeloiden Zellreihe lenken und reife Zellen freisetzen, um eine adäquate Verteidigung zu gewährleisten. Beispiele für derartige Faktoren sind der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) [39].

3.7 Zytokine

Die Familie der Zytokine umfasst eine große Bandbreite an Proteinen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Die Zielzellen können dabei in unmittelbarer Nachbarschaft, als auch in fernen Körperpartien lokalisiert sein. Zytokine können zudem autokrin wirken. Je nach Ursprung und Hauptaufgabe erfolgt die Einteilung in Chemokine, Interleukine, Interferone, koloniestimulierende Faktoren oder Tumornekrosefaktoren. Nahezu alle kernhaltigen Zellen sind in der Lage, im Rahmen einer Schädigung oder Infektion Zytokine zu sezernieren [139]. So kann eine Ausschüttung im Rahmen der Pathogenerkennung durch PAMP induziert werden und ein weites Spektrum an immunregulatorischen- und proliferativen Eigenschaften zeigen [177]. Beispielsweise können IL-1 und TNF α proinflammatorisch wirken, indem sie die Immunantwort amplifizieren, Chemokine regulieren, die Entzündungszellen in entsprechende Gewebe rekrutieren oder die Ausschüttung anderer Zytokine initialisieren [49]. Im Gegensatz dazu gibt es auch antiinflammatorische Interleukine wie IL-4 und IL-10, die einem überschießenden Entzündungsprozess entgegenwirken können [172].

KC

Das Chemokin *keratinocyte-derived chemokine* (KC) ist das murine Homolog des humanen IL-8. Es wird vornehmlich von Neutrophilen, Makrophagen und Epithelien exprimiert. Es wirkt stark chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten [25, 105].

MIP-2

Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) wird von Makrophagen, Neutrophilen und Epithel bei Entzündungsprozessen exprimiert. Es führt hauptsächlich zur chemotaktischen Rekrutierung Neutrophiler in das betroffene Gewebe [52].

G-CSF

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) zeigt eine breite Wirkung auf granulozytäre Zellen. Unter den vielen verschiedenen Zellarten, die in der Lage sind, G-CSF zu produzieren, findet die Expression vor allem durch Stromazellen des Knochenmarks, Makrophagen, Endothel, Fibroblasten und Epithel als Antwort auf eine Entzündung statt [67]. Hierzu ist ein inflammatorischer Stimulus vonnöten, wobei sich IL-17A als eines der hauptverantwortlichen Mediatoren gezeigt hat [65].

G-CSF entfaltet eine proliferative Wirkung auf alle Vorläuferzellen der granulozytären Reihe, beschleunigt die Neutrophilen Reifung und verlängert deren Überleben. Dadurch wird die Anzahl zirkulierender Granulozyten erhöht. Durch seine Phagozytose fördernden sowie chemotaktischen und aktivierenden Effekte auf Neutrophile kommt es zu einer verstärkten Eliminierung von Bakterien [193].

TNF- α

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) gilt als wichtiger Entzündungsinitiator der Lunge. Er wird größtenteils von Makrophagen sezerniert und führt zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelien sowie der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Darüber hinaus stimuliert TNF- α die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder IL-6, wodurch eine Entzündungskaskade in die Wege geleitet wird [52].

3.8 IL-17 Zytokinfamilie

Die Interleukin-17 Mitglieder gelten als wichtige Mediatoren während entzündlichen Prozessen. Das erste und gleichzeitig am besten erforschte Interleukin, welches dieser Familie zugeordnet werden konnte, war IL-17A. Im weiteren Verlauf konnten 5 weitere Vertreter, IL-17B, -C, -D, -E und -F identifiziert werden. Allesamt leiten durch Bindung an entsprechende IL-17 Rezeptoren (IL-17RA – IL-17RE) Signalkaskaden in die Wege. Sämtliche IL-17 Zytokine haben vier konservierte Cysteinreste am C-Terminus gemein. Über diese sind sie in der Lage, sich zu Homodimeren zusammen zu lagern [104, 125]. Darüber hinaus kann IL-17A gemeinsam mit IL-17F, einen IL-17A – IL-17F-Heterodimer bilden [137].

IL-17A

IL-17A wird vornehmlich von aktivierten T-Helferzellen 17, CD4⁺- und CD8⁺ T-Gedächtniszellen, *innate lymphoid cells*, $\gamma\delta$ T-Zellen sowie iNKT-Zellen exprimiert [76, 85, 133, 208, 256]. Diese Zellen setzen bei bakterieller Exposition als Antwort IL-17A frei, welches seine Wirkung an Zielzellen wie Fibroblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Keratinozyten, Epithel- und Endothelzellen entfaltet. Diese werden durch IL-17A zur Expression zahlreicher Gene, unter anderem proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF- α oder G-CSF sowie diverser antimikrobieller Peptide stimuliert [107]. Als funktionelle Rezeptoren dienen IL-17RA und IL-17RC [226]. IL-17A scheint zudem mit Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose assoziiert zu sein [12, 20, 32].

IL-17B

IL-17B bindet an seinen funktionellen Rezeptor IL-17RB und wird vornehmlich in Neuronen, Hoden, Pankreas, Magen und Chondrozyten gebildet [175, 200]. Es induziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β und wirkt proliferativ auf Chondrozyten [188]. Zugleich steuert es der inflammatorischen Wirkung von IL-17E entgegen und zeigt protektive Effekte bei Asthma und Kolitiden [189].

IL-17C

IL-17C wird hauptsächlich in Epithelzellen der Lunge, Haut, Niere und des Kolons gebildet. In Fibroblasten, peripheren Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen ist es hingegen nicht zu detektieren [186, 247]. Es wirkt über die Bindung an einen Rezeptorkomplex bestehend aus IL-17RA und IL-17RE, mit höherer Affinität zu letzterem [213]. Seine Freisetzung wird im Atemwegsepithel über Bakterien, Viren, proinflammatorische Zytokine und TLR Agonisten induziert. Dabei wirken IL-17A und TNF- α steigernd auf die Expression [41, 109, 184, 247]. Die Hauptaufgabe von IL-17C besteht darin, die Rekrutierung von Entzündungszellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, zu vermitteln und die Expression antimikrobieller Peptide zu regulieren. Dies geschieht, indem es chemotaktische und proinflammatorische Zytokine induziert und TH17-Zellen zur IL-17A und IL-17F Produktion anregt [213, 247]. Es konnte gezeigt werden, dass der IL-17C Rezeptor IL-17RE die Immunität gegenüber intestinalen Pathogenen im Kolonepithel vermittelt, indem es die Freisetzung antimikrobieller Peptide und inflammatorischer Mediatoren induziert [213]. In der Lunge führt IL-17C insbesondere zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Derartige Eigenschaften wurden unter anderem bei *Pseudomonas aeruginosa* Exposition beobachtet [247]. Dementsprechend resultierte auch die intrapulmonale Installation von als IL-17C Vektoren dienenden Adenoviren, in einem pulmonalen Neutrophilen Einstrom und einer Expression inflammatorisch wirksamer Gene [103]. In Zellkulturen zeigte sich, dass der Knockout von IL-17C im Atemwegsepithel zur reduzierten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und einer geringeren neutrophilen Chemotaxis nach Erregerkontakt führt [109]. Darüber hinaus wurde eine autokrine Immunregulation bei Epithelzellen beschrieben. Bakterienexposition führt dabei zu einer wechselseitigen Stimulation benachbarter Zellen durch IL-17C. Dies führt zur Amplifizierung der entzündlichen Antwort über Zytokine und antimikrobieller Peptide [186]. Es konnte zudem eine Assoziation zu diversen Erkrankungen festgestellt werden. Erhöhte IL-17C Konzentrationen wurden in psoriatisch veränderter Haut und im Bronchialepithel bei COPD, Mukoviszidose und Aspergillose nachgewiesen [114, 184]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in Lungentumoren, als auch das Tumorwachstum IL-17C-abhängig verläuft [117, 192].

IL-17D

IL-17D wird insbesondere im Gehirn, Herz, Lunge, Pankreas, Fett- und Muskelgewebe gebildet. Bei Bindung an einen bislang unbekanntem Rezeptor wirkt es im Endothel proinflammatorisch und inhibitorisch auf die Hämatopoese [215].

IL-17E (IL-25)

IL-17E wird von Alveolarmakrophagen, basophilen- und eosinophilen Granulozyten, Mast- und Epithelzellen gebildet. Seine funktionellen Rezeptoren sind IL-17RB und IL-17RA. Es wird insbesondere zur Abwehr von Parasiten, Viren, Pilzen und bei Protease-Allergenkontakt sezerniert. Dabei kann eine Eosinophilie sowie Überproduktion an TH2-Zell-spezifischen Zytokinen durch eine

IL-17E Überexpression erreicht werden. Dies spielt insbesondere in der Pathophysiologie von Asthma und atopischer Dermatitis eine maßgebliche Rolle. TH17-Zellen werden hingegen durch IL-17E supprimiert [71, 176].

IL-17F

IL-17F bindet an seine funktionellen Rezeptoren IL-17RA und IL-17RF. Es wird maßgeblich von TH17-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie neutrophilen Granulozyten gebildet. Es trägt sowohl zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten als auch zur Genese autoimmuner Erkrankungen bei [33].

3.9 IL-17 Rezeptoren

Unter den IL-17 Rezeptoren konnten die 5 Subtypen, IL-17RA-E identifiziert werden. Diese Untereinheiten weisen allesamt den gleichen Aufbau, bestehend aus einer Transmembran-, extrazellulären Fibronectin-III-like- und einer im Zytoplasma lokalisierten SEFIR-Domäne (*similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R*) auf [71]. Die Rezeptoreinheiten sind im Stande sich zu Heteromultimeren zusammen zu lagern, um durch entsprechende Liganden aktiviert zu werden (Abb. 3). Der ubiquitär exprimierte IL-17RA, ist dabei Bestandteil fast aller Rezeptorkomplexe und dient der Erkennung von IL-17A, -C, -E, und F [71, 213, 251]. Die Detektion von IL-17C erfolgt über IL-17RE und IL-17RA [213]. Der Rezeptorbestandteil IL-17RE wird auf vielen Zelltypen exprimiert und ist vor allem in Epithelien von Haut, Kolon, Atemwegen und TH17 Zellen zu finden. Auf peripheren Blutmonozyten und Fibroblasten wird er hingegen kaum exprimiert [129, 176, 186, 213]. Die Aktivierung des IL-17RA-IL-17RE-Komplexes durch IL-17C leitet durch Phosphorylierung NF- κ B und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalwege ein [213]. IL-17A und IL-17C scheinen zudem über die Stabilisierung von mRNAs die Bildung von Proteinen zu regulieren (Abb. 3) [157].

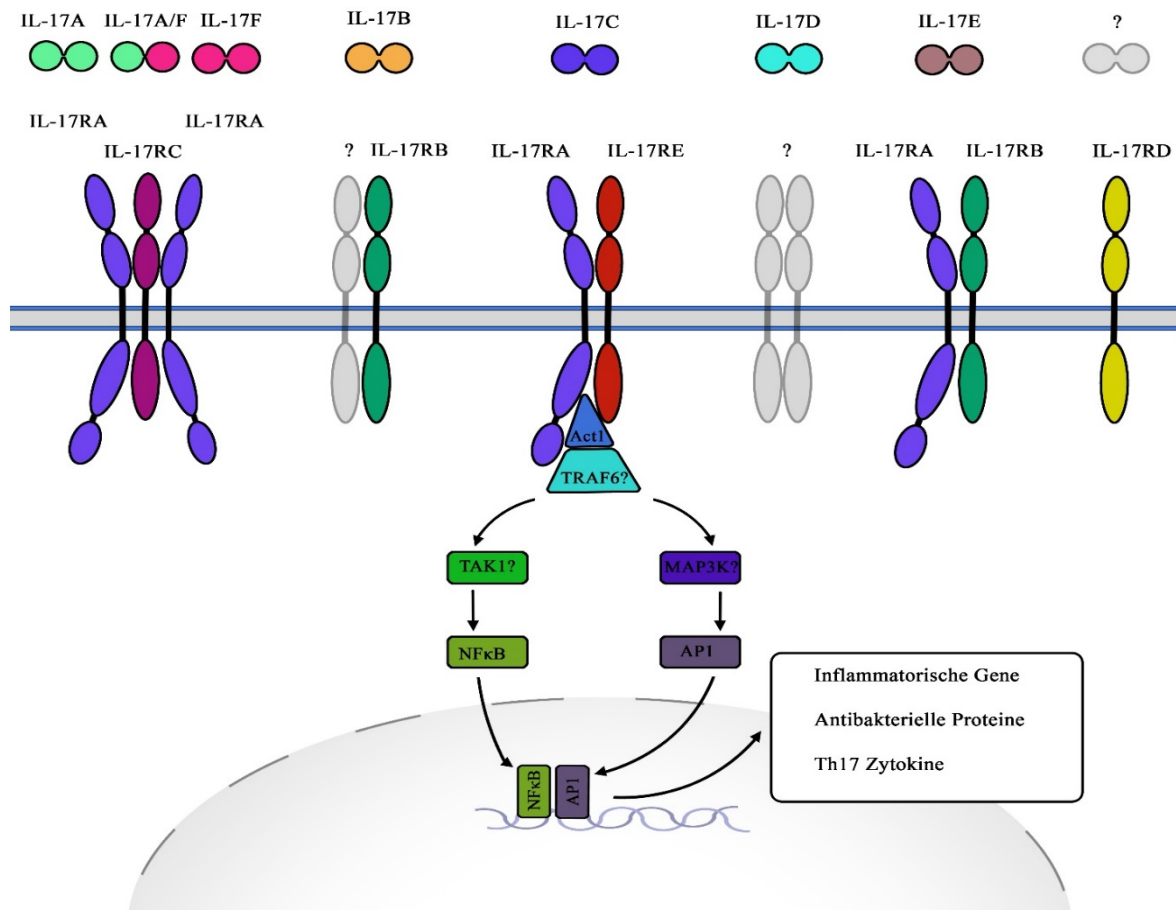


Abbildung 3: Übersicht der IL-17 Zytokinfamilie, deren Rezeptoren und durch IL-17C induzierte Signalwege (nach [212])

Bislang konnten die 6 IL-17 Zytokine IL-17A-F identifiziert werden. Die IL-17 Rezeptorfamilie hingegen besteht aus den 5 bekannten Untereinheiten IL-17RA-RE, die zur Heteromultimerbildung im Stande sind. IL-17A, IL-17A/F und IL-17F werden wahrscheinlich durch einen heterotrimeren Komplex bestehend aus zwei IL-17RA und einem IL-17RC-Rezeptor gebunden. IL-17B wird durch IL-17RB detektiert. Welche weitere Untereinheit dabei beteiligt ist, ist derweil unbekannt. Der Rezeptor für IL-17E besteht aus jeweils einer IL-17RA und IL-17RB Untereinheit. Es ist derzeit unbekannt welcher Rezeptor IL-17D bindet. Der entsprechende Ligand von IL-17RD blieb bislang ebenfalls unentdeckt. IL-17C wird von einem Heterodimer bestehend aus IL-17RA und IL-17RE erkannt. Nach Aktivierung durch IL-17C werden über die Bindung von Act1 an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors, NFκB- und MAPK- Signalwege eingeleitet. Diese führen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP1, welche die Expression inflammatorischer Gene, antibakterieller Peptide und Th17 Zytokine induzieren. TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*) ist möglicherweise auch in den IL-17C Signalkomplex involviert, da es an der Signaltransduktion anderer IL-17 Mitglieder beteiligt ist. Inwiefern die Kinasen TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*) und MAP3K (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) beteiligt sind, ist bislang nicht ausreichend erforscht.

3.10 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der IL-17C/IL17-RE-Achse bei einer akuten *S. pneumoniae*-Pneumonie zu untersuchen. Im Mausmodell sollte unter Einbeziehung von IL-17C- und IL-17RE-defizienten Mäusen geprüft werden, inwiefern IL-17C und IL-17RE die Rekrutierung von Leukozyten und die Eliminierung von Bakterien vermitteln. Zudem sollte geprüft werden, inwiefern IL-17C murine Alveolarmakrophagen und deren Phagozytoseaktivität *ex vivo* reguliert.

4. Material und Methoden

Tabelle 1: Übersicht verwendete Geräte

Gerät / Anwendung	Produktname	Hersteller
Brutschrank	Hera cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dispergiergerät	ULTRATURRAX®	IKA, Staufen, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
cDNA-Synthese	MyCycler	Bio-Rad, Hercules, USA
ELISA-Reader	FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
ELISA-Washer	Nunc Immuno Wash 8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlzentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Messung RNS-Konzentration	Nano Drop 8000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskop	ICC50	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	BX51	Olympus, Shinjuku, Japan
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Biochrom, Berlin, Deutschland
qRT-PCR	CFx96 Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, USA
Reagenzglasschüttler	Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Schlittenmikrotom	SM2000R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Schüttelinkubator	Minitron	Infors HT, Bottingen Schweiz
Waage	ABS 120-4	Kern, Balingen, Deutschland
Wasserbad	Inkubationsbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellbank	Hera safe Zellbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1,0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Labofuge 400	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zytozentrifuge	Cellspin II	Tharmac, Wiesbaden, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht verwendete Software

Anwendung	Programm	Hersteller
Bildaufnahme	Cellsens Dimensions 1.5	Olympus, Shinjuku, Japan
Bildverarbeitung	ImageJ	Wayne Rasband (NIH), USA
ELISA Datenverarbeitung	Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
ELISA Datenanalyse	MARS – Data Analysis	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
FACS Analyse	FACSDIVA 6	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Messung RNS-Konzentration	NanoDrop – 8000 V2.1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Statistik	Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, CA
Tabellenkalkulation	Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
Textverarbeitung	Word 2010	Microsoft, Redmond, USA

Tabelle 3: Übersicht verwendete Lösungen und Materialien

Material / Lösung	Hersteller / Inhalt
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CellWASH	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS Buffer	1x HBSS, 0,1% BSA, 5 mM EDTA
Fetales Kälberserum	Gibco Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszierende Latex Mikrosphären	Fluoresbrite® YG Microspheres, Calibration Grade 1.00µm, Polyscience Inc., Warrington, USA
Formaldehyd, 37%	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes
H2O; RNase-frei	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
H2SO4	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Ursotamin, Serumwerk, Bernburg, Deutschland
1x RBC Lyse Buffer	10 Teile RBC Lyse Buffer in 1 Teil Aqua. dest.
NaCl – Lösung 0,9%	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
1xPBS	NaCl (8g/l), KCL(0,2g/l), Na2HPO4 (1,44 g/l) x 2 H2O, KH2PO4(0,24 g/l), pH 7,4
Rekombinantes IL-17C	Recombinant Mouse IL-17C CF, R&D, Minneapolis, USA
RPMI Zellkulturmedium	Gibco RPMI 1640 + GlutaMAX - I, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schafblut Agarplatten	TSA-II, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
THB	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Xylazin, WDT, Garbsen, Deutschland

Sonstige verwendete Materialien, Kits oder Antikörper werden im folgenden Methodenteil geschildert.

4.1 Tiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um 8 – 10 Wochen alte, weibliche Mäuse des C57BL/6N Stammes. IL-17C-defiziente C57BL/6N (*Il-17c^{-/-}*) und IL-17RE-defiziente C57BL/6N (*Il-17re^{-/-}*) Mäuse wurden ursprünglich aus dem Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC, USA) bezogen. Alle Tierversuche wurden im Rahmen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und oblagen der Genehmigung des Landesamts für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz. Die Tiere wurden in Gruppen unter 55% (+/-10%) Luftfeuchte und 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, 22 °C (+/- 2 °C) in konventioneller Haltung gehalten. Für die Infektionsversuche wurden die Tiere zwei Wochen im Voraus in den S2-Tierstall des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes verlegt. Der freie Zugang zu Futter und Wasser war stets gewährleistet.

4.2 Bakterienstamm

Für das Pneumoniemodell wurde *S. pneumoniae* des Serotyp 2 Stammes D39 verwendet. Gefrorene *S. pneumoniae* Glycerol-stocks der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,7 wurden über 3 Stunden und 30 Minuten in THB-Medium bei 37 °C ohne CO₂ angezogen. Die *S. pneumoniae* wurden bei 2000 x g, 4 °C für 10 min abzentrifugiert, mit 1xPBS gewaschen und anschließend in 1xPBS resuspendiert, sodass eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Für die *in vivo*- und *ex vivo* Versuche wurde *S. pneumoniae* mit einer Ausgangskonzentration von 10-20x10⁷ /ml CFU (*Colony forming unit*) verwendet.

4.3 Murines Pneumokokken-Pneumoniemodell

Für die Mausexperimente wurden insgesamt 48 WT C57BL/6N, 7 *Il-17c^{-/-}* und 33 *Il-17re^{-/-}* Mäuse verwendet. Die Tiere wurden für die Infektion durch intraperitoneale Injektion von 0,175 mg Xylazinhydrochlorid (Xylazin, WDT, Garbsen, Deutschland) und 2,625 mg Ketaminhydrochlorid (Ursotamin, Serumwerk, Bernburg, Deutschland) leicht narkotisiert und anschließend in überstreckt-hängender Position durch intranasale Applikation von insgesamt 40 µl Bakterien-PBS-Suspension (4-7x10⁶ *colony-forming units* pro Tier) in 10 µl Schritten infiziert. Die Kontrolltiere wurden mit 40 µl sterilem PBS scheininfiziert. 4 h, 24 h und 72 h nach bakterieller Inokulation wurden die Tiere erneut narkotisiert. Bei ausbleibendem Zwischenzehenreflex erfolgte nach Wirkungseintritt die Blutentnahme am eröffneten Thorax durch finale Herzpunktion mit einer 1 ml Spritze die 50 µL 0,6 M EDTA enthielt. Zum Anfertigen eines Differentialblutbildes wurde die Gesamtleukozytenzahl durch Auftragen von 10 µl Zellsuspension in eine Zählkammer nach Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) bestimmt. Anschließend wurden die Vollblutproben auf Objektträger ausgestrichen, fixiert und nach Standardprotokoll einer Giemsa-Färbung unterzogen. Um den relativen

Anteil an neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu bestimmen, wurden mehr als 160 Leukozyten in zufällig gewählten Bildausschnitten lichtmikroskopisch ausgezählt. Das restliche Vollblut wurde bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert und das EDTA-Plasma für die weitere Analytik verwendet. Im Zuge der bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde die freipräparierte Trachea inzidiert, eine Venenverweilkanüle vorgeschoben und die Lungen dreimalig mit 1ml 1xPBS gespült. Die gewonnene bronchoalveoläre-Flüssigkeit (BALF) wurde daraufhin bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde aliquotiert und für nachfolgende Zytokinanalysen bei -80 °C eingefroren. Das Leukozytenpellet wurde mit 1 ml 1xPBS resuspendiert und diente im sofortigen Anschluss der Bestimmung der Gesamtzellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland). Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben und 2x9 Großquadrate ausgezählt. Der erhaltene Wert wurde auf 1 ml hochgerechnet. Zur Anfertigung eines Differentialzellbildes wurden 50 µl BALF mit 150 µl 1xPBS verdünnt und durch eine Zytozentrifuge (Cellspin II, Tharmac, Waldsolms, Deutschland) bei 200 x g für 5 min auf Objektträger transferiert und 10 Minuten bei -20 °C in Methanol fixiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit dem „Diff Quik Staining Set“ (Medion Diagnostics, Gräfelfing, Deutschland). Durch lichtmikroskopisches Auszählen von mindestens 100 Zellen aus zufällig gewählten Bildausschnitten konnte der relative Anteil an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten bestimmt werden. Nach Durchführung der BAL wurde die Lunge entnommen, wobei der rechte Lungenflügel zur späteren RNS-Isolierung unmittelbar in flüssigem Stickstoff weggefroren und der linke Lungenflügel in 1ml 1xPBS mit einem ULTRATURRAX® Dispergiergerät (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert und bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurde. Der Lungenhomogenisat-Überstand diente der Bestimmung der *colony-forming units* (CFU).

4.3.1 Bakterienzahl in BALF, Lungengewebe und Blut

Zur Ermittlung der Bakterienzahl in der BALF, im Lungenhomogenisat und im Blut wurde eine 10-fach Reihenverdünnung der Proben in PBS aufgestellt. Die Verdünnungen wurden auf Trypticase Soy Agar II Platten mit 5% Schafblut (TSA-II, BD Biosciences) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zählung der Kolonien und die hieraus resultierende Berechnung der *colony-forming units* (CFU) pro Milliliter.

4.3.2 Lungenpräparation, Fixierung und histologische Schnitte

Um die Entzündung der Lunge histologisch zu bewerten, wurde eine pertracheale Installationsfixation des Lungengewebes vorgenommen. In die freigelegte Trachea der euthanasierten Maus wurde eine Venenverweilkanüle vorgeschoben, mit Bindfaden fixiert und die Lunge *in toto* inklusive Kanüle aus

dem Situs entfernt. Danach wurde sie mit einem Scheidetrichter konnektiert und über 15 min transtracheal unter konstantem Druck von 30 cmH₂O mit PBS gepufferter 4%iger Formaldehydlösung perfundiert. Nach erneutem Abbinden der Trachea und dem Entfernen der Kanüle folgte eine weitere Fixierung über 24 h in PBS gepufferter 4%iger Formaldehydlösung. Als nächster Schritt wurde die Trachea entfernt und die Lunge über Nacht in 1xPBS gewaschen. Nach einem PBS-Wechsel wurde die Lunge auf 60 °C erwärmt, für 6 h bei dieser Temperatur belassen und das 1xPBS anschließend verworfen. Die Lunge wurde in 1%iger Agaroselösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zu Blöcken eingebettet und mittels Gewebsschneider in der Transversalebene von apikal nach basal in 5 mm dicke Scheiben geschnitten. Nach Überführung in Waagschalen und erneuter Überschichtung mit 1%iger Agaroselösung erfolgte die Paraffineinbettung durch das Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Es wurden 2 µm dicke Gewebsschnitte aus den Paraffinblöcken angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Färbung mit Hämalaun (Dako, Jena, Deutschland) und Eosin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde nach Standardprotokoll durchgeführt.

4.3.3 Inflammatorischer Score

Um das Ausmaß des entzündlichen Lungenschadens zu bewerten, wurden die Hämalaun und Eosin gefärbten Lungenschnitte freundlicher Weise vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes anhand eines inflammatorischen Scores beurteilt. Die Auswertung erfolgte dabei verblindet am Lichtmikroskop, wobei die Inflammation anhand verschiedener Kriterien eines Punktesystems gewertet wurde. Sowohl das Vorhandensein einer Entzündung als auch deren Schwere fließen in die Wertung mit ein. Einzelne Kriterien, wie das Vorhandensein von Neutrophilen, Makrophagen, Lymphozyten oder Ödemen erfolgt von 0 bis maximal 4 Punkten anhand der relativen Größe des betroffenen Lungenanteils [187].

4.3.4 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung, erfolgte die Antigendemaskierung durch Entparaffinieren, Rehydrieren und 30-minütiges Kochen der Lungenschnitte in 1 mM EDTA-Puffer (pH = 8,0). Mit 3 % H₂O₂ (Acros Organics, Schwerte, Deutschland) wurde die Blockade endogener Peroxidasen erreicht und die Lungenschnitte anschließend in 2,5%iger BSA-Lösung geblockt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4 °C mit dem TNF- α Antiserum (Abcam, Cambridge, UK) inkubiert. Die TNF- α Antikörper wurden dafür 1:100 in TBS verdünnt. Die antigengebundenen Primärantikörper konnten durch Hinzugabe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (Nichirei Bioscience, Tokio, Japan) sowie einer AEC Substratlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) dargestellt werden. Durch Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung nach Mayer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde eine Färbung der Zellkerne erzielt und mit Glycergel Mounting

Medium (Dako, Jena, Deutschland) eingedeckt.

4.3.5 Immunhistologische Bewertung der Lungeninflammation

Um die pulmonale Inflammation zu quantifizieren, wurden die immunhistologisch gefärbten Lungenschnitte verblindet unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Es wurden von jedem Präparat mittels Bildaufnahme-Software „Cellsens Dimensions 1.5“ (Olympus, Shinjuku, Japan) zwischen 7 und 10 Aufnahmen angefertigt. Anschließend erfolgte die Auswertung durch die Verarbeitungs-Software „ImageJ“ (Wayne Rasband (NIH), USA), indem die TNF- α positiven Zellen pro Feld bestimmt und gemittelt wurden.

4.3.6 Durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks

Nachdem die Mäuse wie zuvor beschrieben euthanasiert wurden, erfolgte die Freilegung der Femora mit anschließender Abtrennung am proximalen und distalen Gelenk. Anhaftende Gewebsrückstände wurden manuell vom Knochen entfernt.

Nachfolgend beschriebene durchflusszytometrische Analysen wurde freundlicherweise vom Institut für experimentelle und translationale Nephrologie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Um Knochenmarkszellen zu isolieren, wurde das Mäusefemur proximal und distal auf Höhe der Metaphysen durchtrennt und der Markraum eröffnet. Das Femur wurde anschließend mit 10 ml eiskaltem 1xPBS aus einer Spritze durchspült. Nach Filtrierung durch ein 70 μ m Nylon Cell Strainer wurden die Zellen in einem *Tube* aufgefangen und bei 300 x g und 4 °C, für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Erythrozyten wurden mit 4 ml Red Blood Cell lysis *Buffer* lysiert. Nach einer Inkubation über 5 min in Dunkelheit auf Eis, wurden 4 ml FACS Buffer hinzugegeben und bei 300 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 5 ml FACS Buffer resuspendiert und die Zellen ausgezählt um 1×10^6 Zellen in ein FACS – *Tube* zu transferieren. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation erfolgte schrittweise die Inkubation mit Antikörpern (hinzu pipettierte Menge nach Herstellerangaben) nach folgendem Schema:

Inkubation *Linage Marker* Antikörpern (BioLegend, San Diego, USA) 20 min auf Eis in Dunkelheit → Hinzugabe 2 ml FACS Buffer und Zentrifugation → Inkubation Streptavidin FITC Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) 20 min auf Eis in Dunkelheit → Hinzugabe 2 ml FACS Buffer und Zentrifugation → Inkubation *direct labeled* Antikörper (siehe Übersichtstabelle 4) 20 min auf Eis in Dunkelheit → Hinzugabe 2 ml FACS Buffer und Zentrifugation

Das Zellpellet wurde, nachdem der Überstand verworfen wurde, in 200 μ l Flow Cytometry Staining Buffer aufgenommen und im sofortigen Anschluss durchflusszytometrisch mit dem „FACS Canto II“ (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) analysiert.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper

<i>Direct labeled</i> Antikörper	Hersteller
c-Kit (CD117) APC	BioLegend, San Diego, USA
Sca-1 (Ly6A/E) APC/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
FCγR III/II PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA
CD34 PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA

4.3.8 RNS-Isolierung, cDNA-Synthese, quantitative RT-PCR

Die RNS wurde mit dem TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, USA) nach mitgeliefertem Protokoll aus Lungengewebe isoliert und deren Menge mittels der Computersoftware „Nanodrop – 8000 V1.2.0“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) quantifiziert. Die nachfolgende cDNA-Synthese wurde ebenfalls nach mitgeliefertem Protokoll des „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622)“ der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die jeweiligen cDNA-Konzentrationen wurden anschließend durch Verdünnung mit ddH₂O einander angeglichen. Bei jeder PCR-Reaktion wurden 5 µl der erhaltenen cDNA-Verdünnung, jeweils 0,2 µl eines *forward*- sowie *reverse-Primers* (Metabion, Martinsried, Deutschland; siehe Tabelle), 12,5 µl SYBR-Green (SensiMixTM SYBR & Fluorescein Kit, London, UK) und 7,1 µl ddH₂O verwendet. Das PCR- Protokoll, welches durch den „CFx96 Real-Time Cycler“ (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt wurde, lautete: 95 °C, 10 min → 40x (95 °C, 15 s → 60 °C, 30 s) → 65 °C, 31 s → 65 °C, 5 s → 5 °C. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um RNS-freies ddH₂O. Aus den RT-PCR Ergebnissen wurde mittels Δ Ct-Methode die relative Expression errechnet [183].

Tabelle 5: Auflistung der Gene und dazugehörigen Primersequenzen, welche mittels qRT-PCR untersucht wurden [34, 199, 253]

Zielgen	Forward-Primer Oligo Sequenz	Reverse-Primer Oligo Sequenz
GAPDH	5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG-3'	5'-CAT TCT CGG CCT TGA CTG-3'
IL-17C	5'-GCT CCT CCA CAC CTG CTA AC-3'	5'-AGT GTC AGC TTC CAG CAC CT-3'
IL-17RE	5'-CTG GCA GTC AAT ACG CTT CA-3'	5'-TTC TGA CTC CTG TGC TGT GG-3'
IL-17A	5'-GCT CCA GAA GGC CCT CAG A-3'	5'-AGC TTT CCC TCC GCA TTG A-3'
IL-17B	5'-CGG TGC CTA TGT TTG GGT TGC-3'	5'-GGG TTG GTG GTT GGC TCA GAA-3'
IL-17D	5'-AGC TTG TCC ATG CTG GAG TT-3'	5'-CTC TAC GGG GAG GAG GAC TT-3'
IL-17E	5'-CAC ACT GCG TCA GCC TAC AGA-3'	5'-TGT GGT AAA GTG GGA CGG AGT T-3'
IL-17F	5'-CAA CGC TGC ATA CAA AAA TCA-3'	5'-TTA AGT GAG GCA TTG GGA ACA-3'

4.4 Enzyme-linked immuno assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Konzentration an entzündungsmediatorischen Zytokinen, wurde ein *enzyme-linked immuno assay* (ELISA) mit dem „Duo Set ELISA Development-Kits“ (Firma R&D Systems, Minneapolis, USA), nach mitgeliefertem Protokoll durchgeführt und mit dem „Fluostar Omega ELISA reader“ (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Zur Datenverarbeitung diente die Software „Omega Mars“ (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland). Bei den in den Mausexperimenten nachgewiesenen Zytokinen handelt es sich um MIP-2, KC, G-CSF, IL-17A, IL-17F und bei den Zellversuchen um MIP2 und KC.

Tabelle 6: Verwendete ELISA Kits

Zytokin	Produktname	Hersteller
MIP-2	Mouse CXCL2 / MIP-2 DuoSet ELISA	R&D Systems
G-CSF	Mouse G-CSF DuoSet ELISA	R&D Systems
KC	Mouse CXCL1 / KC DuoSet ELISA	R&D Systems
IL-17A	Mouse IL-17 DuoSet ELISA	R&D Systems
IL-17F	Mouse IL-17F DuoSet ELISA	R&D Systems

4.5 Ex vivo Versuche

4.5.1 Gewinnung von murinen Alveolarmakrophagen

Für die Gewinnung von murinen Alveolarmakrophagen wurden WT C57BL/6N Mäuse verwendet. Die Tiere wurden hierzu durch intraperitoneale Injektion von je 13,1 mg Xylazinhydrochlorid (Xylazin, WDT, Garbsen, Deutschland) und 2,625 mg Ketaminhydrochlorid (Ursotamin, Serumwerk, Bernburg, Deutschland) sowie Exsanguination euthanasiert. Nach Eröffnung der Halsregion wurde die Trachea freipräpariert und inzidiert. Durch Verschieben einer Venenverweilkanüle wurde die Luftröhre kanalisiert, die Lunge mit 1 ml PBS-EDTA-Lösung (50 mM EDTA) einmalig gespült und die Spülflüssigkeit gesammelt. Der Vorgang wurde pro Lunge 10mal wiederholt und das BAL-Fluid aller Tiere gleicher Gruppenzugehörigkeit gepoolt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g und 4° C für 10 min abzentrifugiert und in Zellkulturmedium, resuspendiert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 (Gibco RPMI 1640 + GlutaMAX - I, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 10 % FCS (Gibco Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Nach lichtmikroskopischer Auszählung in einer Zählkammer nach Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurde die Zellsuspension mit Zellkulturmedium verdünnt und jeweils 1 ml der Verdünnung auf eine 24-Well-Zellkulturplatte (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) gegeben, wodurch eine Zellzahl von $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Well erreicht wurde. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden nicht-adhärenente Zellen im Überstand entfernt und 1 ml frisches Zellkulturmedium in jedes Well gegeben. Die Platten wurden daraufhin weitere 22 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert [246–248, 258].

4.5.2 Stimulationsexperimente

Für das Stimulationsexperiment wurde das überständige Zellkulturmedium abgesaugt und die Wells der Zellkulturplatte mit adhärenenten Makrophagen in 4 Gruppen unterteilt und mit jeweils 2 ml gruppenspezifischem Medium befüllt. Wells der Gruppe 1 dienten als Kontrollgruppe und wurden mit reinem Zellkulturmedium (siehe oben) und PBS befüllt. Für Gruppe 2 wurde das Zellkulturmedium mit rekombinatem IL-17C (Recombinant Mouse IL-17C CF, R&D, Minneapolis, USA), in einer Konzentration von 100 ng/ml, versetzt. Gruppe 3 enthielt lebende *S. pneumoniae* des Stammes D39 (CFU 2-3,5x10⁴/ml). Hierzu wurden die Bakterien wie zuvor beschrieben (siehe 4.2) auf eine OD₆₀₀ von 0,5 (CFU 11-20x10⁷/ml) gebracht und mit Zellkulturmedium verdünnt. Gruppe 4 beinhaltete lebende *S. pneumoniae* (CFU 2-3,5x10⁴/ml) in Kombination mit rekombinaten IL-17C (Recombinant Mouse IL-17C CF, R&D, Minneapolis, USA) in einer Konzentration von 100 ng/ml.

Nachdem die Wells mit dem jeweiligen Medium befüllt waren, wurden die Platten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und nach 4 Stunden 1 ml Überstand aus jedem Well abgenommen. Nach weiteren 20 Stunden im Brutschrank, wurde der restliche Überstand abgenommen. Mittels ELISA (siehe 4.4) wurde die Zytokinkonzentration in den Überständen bestimmt.

4.5.3 Bakterienzahl im Medium

Um die Anzahl der im Medium vorhandenen *S. pneumoniae* zu quantifizieren, wurden zu den Zeitpunkten 0-, 4- und 24 Stunden nach Bakterieninokulation, 30 µl Überstand aus den Wells abgenommen und deren CFU, wie zuvor beschrieben, bestimmt (siehe 4.3.1).

4.5.4 Phagozytose-Experiment

Für die Phagozytose-Experimente wurden insgesamt 6 WT C57BL/6N- und 5 *Il-17re^{-/-}*-Mäuse verwendet. Um murine Alveolarmakrophagen zu gewinnen, wurden die Tiere wie zuvor beschrieben (siehe 4.5.1) euthanasiert und die freipräparierte Trachea mit einer Venenverweilkanüle kanalisiert. Die Lungenspülung erfolgte dreimalig mit 1ml PBS-EDTA-Lösung (50 mM EDTA). Anschließend wurde die BALF bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das entstehende Zellpellet in 300 µl Zellkulturmedium, bestehend aus RPMI 1640 (Gibco RPMI 1640 + GlutaMAX - I, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 10% FCS (Gibco Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), resuspendiert. Nach lichtmikroskopischer Auszählung in einer Zählkammer nach Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden, durch Verdünnung mit Zellkulturmedium (siehe oben), die verschiedenen Zellkonzentrationen einander angeglichen. Es folgte die Hinzugabe von fluoreszierenden Latex Mikrosphären (Fluoresbrite® YG Microspheres, Calibration Grade 1.00 µm, Polyscience, Inc., Warrington, USA) im Zell-Mikrosphären-Verhältnis von 1:200 sowie reinem Zellkulturmedium (siehe oben) in der Kontrollgruppe. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C unter kontinuierlicher Agitation erfolgten zwei Zentrifugations- und Waschschriffe durch 1xPBS mit 3% BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bei 4 °C. Das Zellpellet wurde nach erneuter Zentrifugation in 400 µl CellWASH (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) aufgenommen. Die Proben wurden im sofortigen Anschluss durchflusszytometrisch am „FACSCanto II“ (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) analysiert. Die Datenauswertung geschah mittels der Software „FACSDIVA 6“ (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) [254].

4.6 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung dieser Arbeit, diente die Computersoftware Prism 5 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Gezeigte Graphen sind mit Mittelwerten und Standardabweichung (SD) dargestellt. Bei der Analyse von zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der zweiseitige t-Test angewendet. Waren mehrere Gruppen zu vergleichen, wurde ein One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test durchgeführt. Ergebnisse mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5. Ergebnisse

5.1 Die Rolle von IL-17RE und IL-17C im murinen Pneumokokken-Pneumoniemodell

Um die Rollen von IL-17RE und IL-17C bei der Infektion der tiefen Atemwege durch *S. pneumoniae* zu untersuchen, wurden WT-, *Il-17re^{-/-}*- und *Il-17c^{-/-}*- Tiere intranasal mit dem Serotyp 2 Pneumokokken-Stamm D39 oder PBS als Kontrollen infiziert. 4 h, 24 h und 72 h nach der bakteriellen Exposition wurden die Mäuse euthanasiert und hinsichtlich der bakteriellen Last und der pulmonalen Entzündung analysiert.

5.1.1 Infektion mit *S. pneumoniae* führt zu Gewichtsverlust

Das Körpergewicht diente als Marker für die Infektionsschwere und des Wohlbefindens der Tiere. Es wurde daher das Gewicht über den Verlauf der Infektion gemessen (Abb. 4). Die induzierte Pneumokokken-Pneumonie führte sowohl bei WT- als auch bei *Il-17re^{-/-}*-Mäusen über 72 h gleichermaßen zu einem deutlichen Gewichtsverlust. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und *Il-17re^{-/-}*- Mäusen.

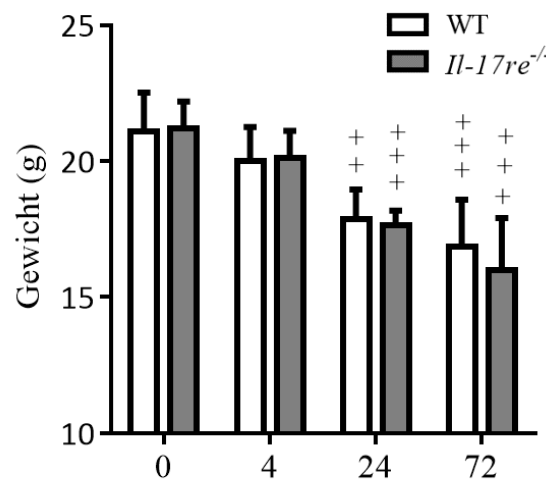


Abbildung 4: Die Infektion mit *S. pneumoniae* führt zu einem Verlust an Körpergewicht

WT- (weiß) und *Il-17re^{-/-}*- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. Das Körpergewicht (in Gramm) wurde vor der Inokulation sowie 4 h, 24 h und 72 h nach der Infektion gemessen. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Signifikanzniveau: ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$); verglichen mit dem Gewicht vor der Infektion ($t=0$).

5.1.2 *Il-17re^{-/-}*-Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Exposition einen geringeren Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge

Um den Einfluss von IL-17RE auf das Ausmaß der pulmonalen Inflammation nach Pneumokokken-induzierter Pneumonie zu quantifizieren, wurde die Gesamtzahl an Leukozyten in der BALF bestimmt (Abb. 5). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen 24 Stunden nach der intranasalen Gabe von PBS. Nach 4 h kam es sowohl bei WT- als auch bei *Il-17re^{-/-}*-Mäusen zu einem Absinken der Gesamtzellzahl, gefolgt von einem starken Leukozyteneinstrom nach 24 h. Dieser Anstieg der Gesamtzellzahl im Alveolarraum war bei *Il-17re^{-/-}*-Mäusen verglichen mit WT-Mäusen signifikant vermindert. 72 h nach Bakterienapplikation war die Zellzahl beider Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen noch signifikant erhöht. Auch 72 Stunden nach der Infektion war die Anzahl an Leukozyten in der BALF von *Il-17re^{-/-}*-Mäusen verglichen mit WT-Mäusen signifikant vermindert.

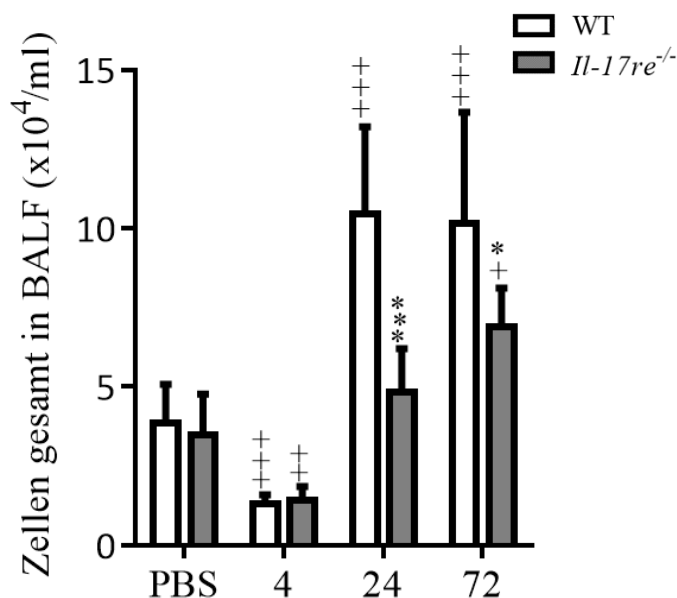


Abbildung 5: Die Gesamtanzahl der Entzündungszellen in der BALF ist nach Infektion bei *Il-17re^{-/-}*-Mäusen vermindert

WT- (weiß) und *Il-17re^{-/-}*- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. Die Gesamtanzahl der Leukozyten (in $\times 10^4$ /ml) in der BAL wurde bei PBS-infizierten Kontrolltieren sowie 4 h, 24 h und 72 h nach Infektion durch Auszählen in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen PBS-Kontrollen und infizierten Mäusen (Signifikanzniveau: + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$); Vergleich zwischen WT- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.1.3 *Il-17re^{-/-}*-Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Exposition eine geringere Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum

Das Differentialzellbild ergab, dass das Entzündungsgeschehen innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Infektion durch den Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge gekennzeichnet war (Abb. 6). Während nach 4 h nur wenige neutrophile Granulozyten in der BALF vorhanden waren, konnte nach 24 h eine massive Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 6A). Nach 72 h kam es wiederum zu einem Absinken, wobei noch deutlich mehr neutrophile Granulozyten als bei den Kontroll- und 4 h – Tieren nachweisbar waren. Signifikante Unterschiede zwischen WT- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen ergaben sich 24 h und 72 h nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren signifikant weniger neutrophile Granulozyten im Alveolarraum von *Il-17re^{-/-}*-Mäusen vorhanden. Sowohl bei WT- als auch bei *Il-17re^{-/-}*-Mäusen war die Anzahl von Makrophagen in der BALF 4 h und 24 h, verglichen mit PBS-infizierten Mäusen signifikant vermindert (Abb. 6B). Nach 72 h stieg die Makrophagenzahl wieder an und war bei den WT-Tieren signifikant höher als die der PBS-infizierten Kontrollen. Bei den Lymphozyten kam es allein nach 72 h zu einem signifikanten Anstieg in der WT-Gruppe im Vergleich zu den PBS-infizierten Kontrollen (Abb. 6C). Sowohl bei den Makrophagen als auch bei den Lymphozyten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Mausstämmen festzustellen. Bei den PBS-infizierten Kontrolltieren kam es bei keinem Zelltypus zu einem signifikanten Unterschied zwischen WT- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen.

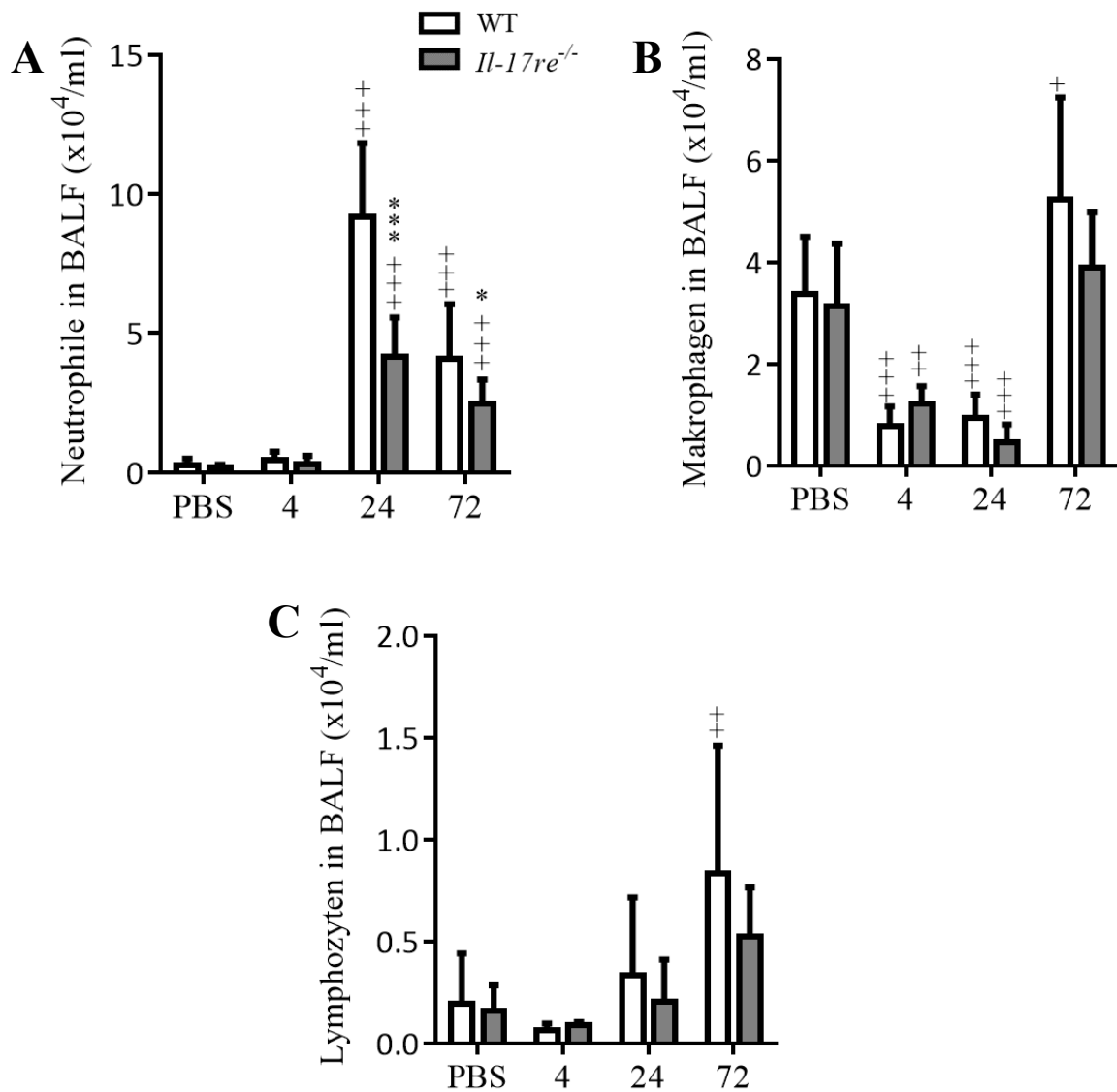


Abbildung 6: IL-17RE vermittelt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge

WT- (weiß) und *Il-17re*^{-/-} - Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4\text{-}7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. Mittels Cytospin-Präparate wurden neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten lichtmikroskopisch differenziert. (A) Anzahl der neutrophilen Granulozyten, (B) Makrophagen und (C) Lymphozyten in der BALF 4 h, 24 h und 72 h nach Infektion. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen PBS-Kontrollen und infizierten Mäusen (Signifikanzniveau: + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$); Vergleich zwischen WT- und *Il-17re*^{-/-}-Mäusen (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

5.1.4 Die Defizienz für IL-17RE beeinflusst nur geringfügig die Eliminierung von *S. pneumoniae* in der Lunge

Um den Effekt von IL-17RE auf die bakterielle Klärung zu untersuchen, wurde die Anzahl lebender Pneumokokken aus BALF, Lungenhomogenisat und Blut 4 h, 24 h und 72 h nach der Infektion bestimmt. Dabei beeinflusste die Defizienz für IL-17RE die Klärung der Bakterien nicht wesentlich. Bei beiden Gruppen kam es in der BALF zu einem deutlichen Absinken der CFU über 72 h (Abb. 7A). Weder nach 4 h noch nach 24 h und 72 h kam es zu einem signifikanten Unterschied in den CFU beider Gruppen. Es bestand lediglich die Tendenz zu einer niedrigeren CFU bei den IL-17RE defizienten Tieren nach 24 h und 72 h.

Auch die CFU's, welche aus dem Lungenhomogenisat ermittelt wurden, sanken bis 72 h ab. Gruppenunterschiede konnten dabei zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden (Abb. 7B). Im Blut konnten allein nach 72 h bei 2 von 10 WT- und 4 von 8 *Il-17re*^{-/-}-Mäusen lebendige Bakterien nachgewiesen werden (Grafik nicht gezeigt).

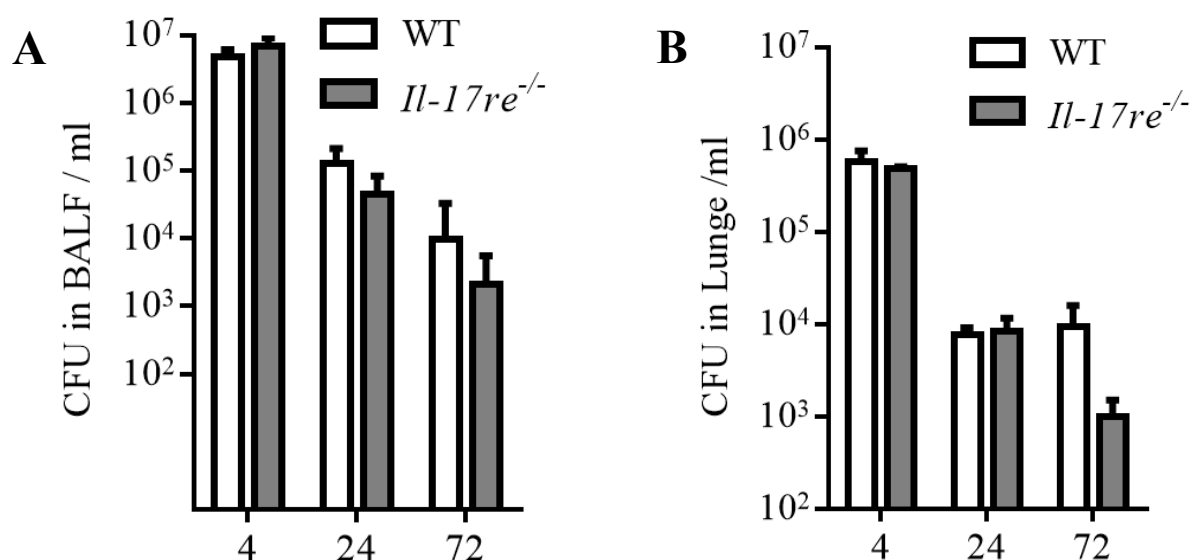


Abbildung 7: Die Defizienz für IL-17RE hat nur geringen Einfluss auf die Eliminierung von *S. pneumoniae*

WT- (weiß) und *Il-17re*^{-/-}- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. 4 h, 24 h und 72 h nach Infektion erfolgte die Bestimmung der Pneumokokken CFU (/ml) aus BALF und Lungenhomogenisat. (A) CFU in BALF und (B) CFU in Lungenhomogenisat. Statistik: Zweiseitiger t-Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD).

5.1.5 Die Bildung von G-CSF ist in Lungen von *Il-17re*^{-/-}-Mäusen vermindert

Es konnte gezeigt werden, dass der Entzündungszell- und Neutrophileneinstrom in den Alveolarraum bei Pneumokokken infizierten, IL-17RE defizienten Tieren weitaus geringer ausfiel als bei den WT-Tieren. Um die unteren Atemwege vor *S. pneumoniae* und anderen bakteriellen Pathogenen zu schützen, ist die initiale Rekrutierung neutrophiler Granulozyten maßgeblich [46]. Diese ist insbesondere von chemotaktisch wirkenden Zytokinen abhängig, wobei MIP-2 und KC die größte Bedeutung zukommen [61]. Das Zytokin G-CSF zeigt neben diesen chemotaktischen auch Apoptose verzögernde und knochenmarksmobilisierende Effekte, was die pulmonale Neutrophilen-Akkumulation stark begünstigt [92, 233]. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen von G-CSF, KC und MIP-2 bestimmt. Um den Einfluss anderer IL-17 Zytokine zu ermitteln, wurde zudem die Konzentration von IL-17A und IL-17F in der BAL bestimmt.

Die Pneumokokken-Infektion führte im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollgruppen unabhängig bereits 4 h nach der Infektion zu signifikant gesteigerten Konzentrationen von G-CSF, KC und MIP-2 in der BALF. Auch nach 24 Stunden waren die Konzentrationen dieser Zytokine noch signifikant erhöht, wenn auch auf einem etwas niedrigeren Niveau (Abb. 8A-C). Die Konzentrationen von G-CSF waren in der BALF von *Il-17re*^{-/-}-Mäusen 4h und 24 h nach Infektion verglichen mit den jeweiligen infizierten WT-Mäusen signifikant vermindert (Abb. 8A). Sowohl bei KC als auch bei MIP-2 traten zwischen beiden Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 8B und C). IL-17A und IL-17F lagen hingegen beide unter dem Detektionslevel von 15 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

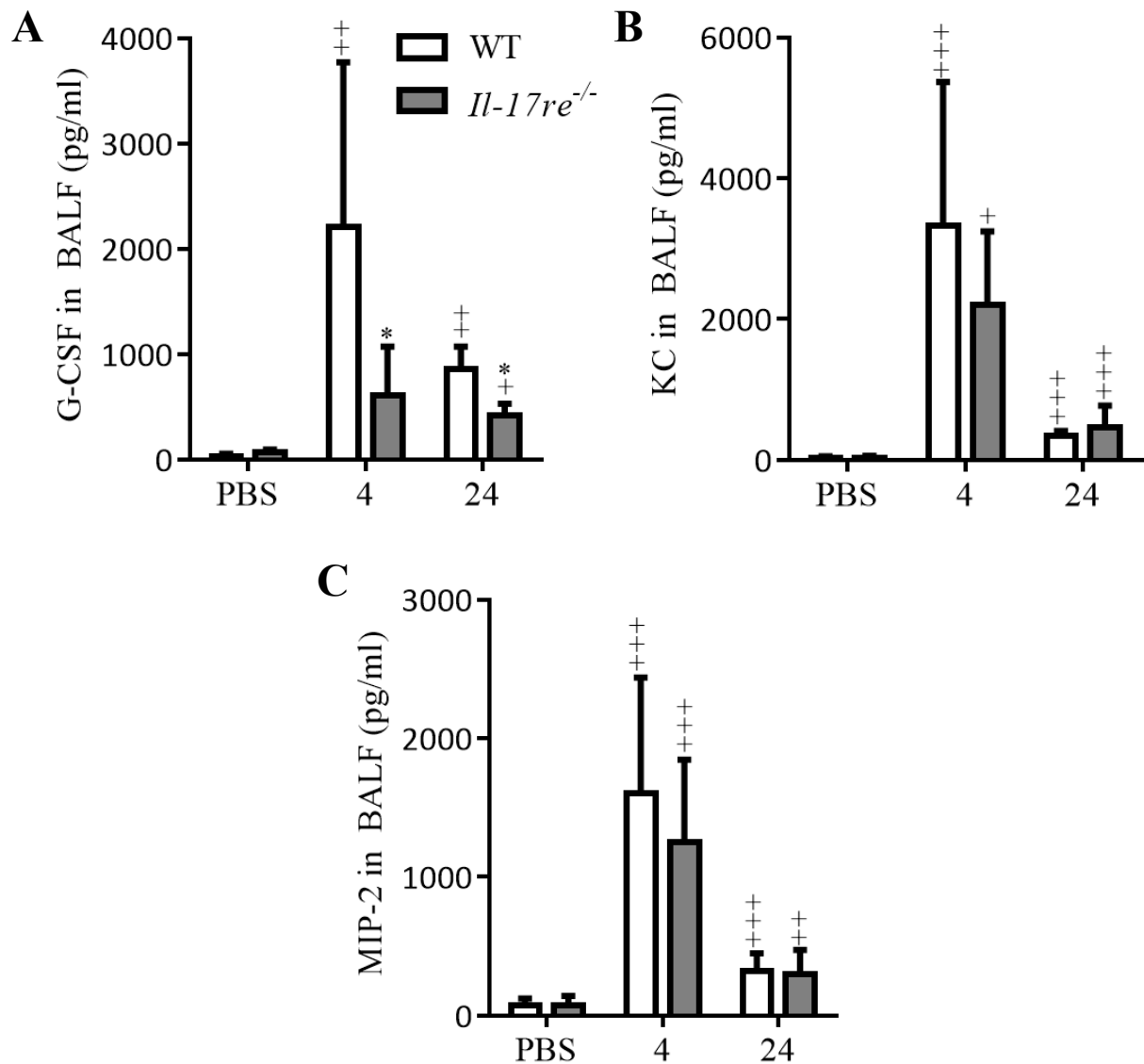


Abbildung 8: IL-17RE reguliert die Bildung von G-CSF

WT- (weiß) und *Il-17re*^{-/-} - Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. Die Konzentrationen (in pg/ml) von (A) G-CSF, (B) KC und (C) MIP-2 in der BALF wurden 4 und 24 h nach der Infektion mittels ELISA gemessen. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen PBS-Kontrollen und infizierten Mäusen (Signifikanzniveau: + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$), Vergleich zwischen WT- und *Il-17re*^{-/-}-Mäusen (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

Zudem wurden die Konzentrationen von G-CSF 4 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* im Plasma bestimmt. Hierbei unterschieden sich die G-CSF Plasmaspiegel nicht signifikant zwischen WT- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen (Abb. 9).

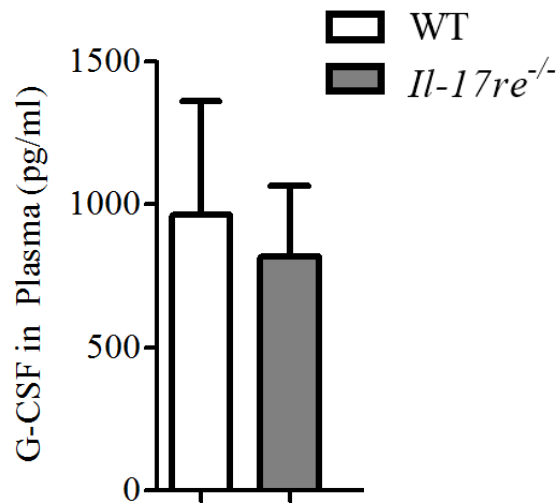


Abbildung 9: Die Defizienz für IL-17RE hat keinen Einfluss auf die Konzentrationen von G-CSF im Plasma

WT- (weiß) und *Il-17re^{-/-}* - Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. 4 h nach Infektion, erfolgte die Bestimmung der G-CSF-Konzentration (in pg/ml) im Plasma mittels ELISA. Statistik: Zweiseitiger t-Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD)

5.1.7 Die Anzahl TNF- α positiver Zellen ist in *Il-17re*^{-/-}-Mäusen vermindert

Lungen von IL-17RE defizienten- und WT-Tieren wurden 24 h nach *S. pneumoniae*-Infektion en-bloc entnommen und fixiert. In der Histologie erschien die peribronchiale Entzündung in den Präparaten aus *Il-17re*^{-/-}-Mäusen schwächer ausgeprägt zu sein. Um diese Entzündung genauer zu quantifizieren, wurden die HE-gefärbten Lungenschnitte anhand eines inflammatorischen Scores bewertet (Abb. 10A und B). Hierbei ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen.

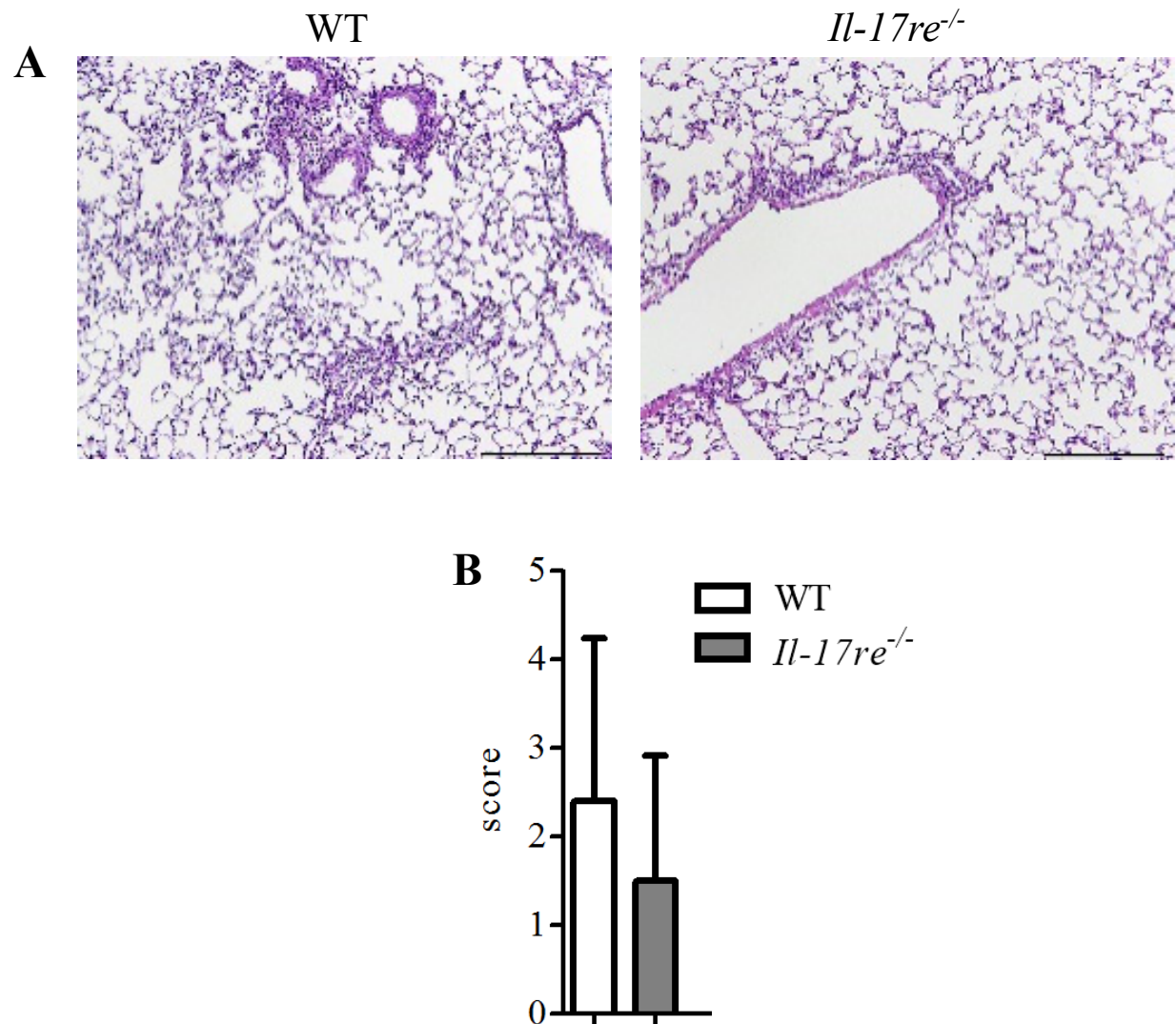


Abbildung 10: Die Infektion mit *S. pneumoniae* führt zu einem Infiltrat der Lunge

WT- und *Il-17re*^{-/-}- Tiere wurden mit *S. pneumoniae* ($4\text{-}7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Tiere euthanasiert. (A) Repräsentative Lungenhistologie (HE-Färbung) und (B) inflammatorischer Score. Statistik: Zweiseitiger t-Test (n =10 und 8 pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Skalierungsbalken: 200 μ m

Um die Inflammation genauer zu visualisieren und quantifizieren, wurde subzellulär lokalisiertes TNF- α immunhistologisch sichtbar gemacht (Abb. 11A). Sowohl bei den WT- als auch *Il-17re*^{-/-}-Mäusen färbten sich vornehmlich peribronchial im Lungeninfiltrat gelegene Zellen positiv. Es wurden von jedem Präparat mehrere Aufnahmen (10x-Objektiv) zufällig gewählter Bronchien und deren umliegendem Parenchym erstellt, um anschließend die Anzahl TNF- α positiver Zellen pro Sichtfeld zu ermitteln. In IL-17RE-Knockout Mäusen konnten signifikant weniger positive Zellen gezählt werden als in den WT-Mäusen (Abb. 11B).

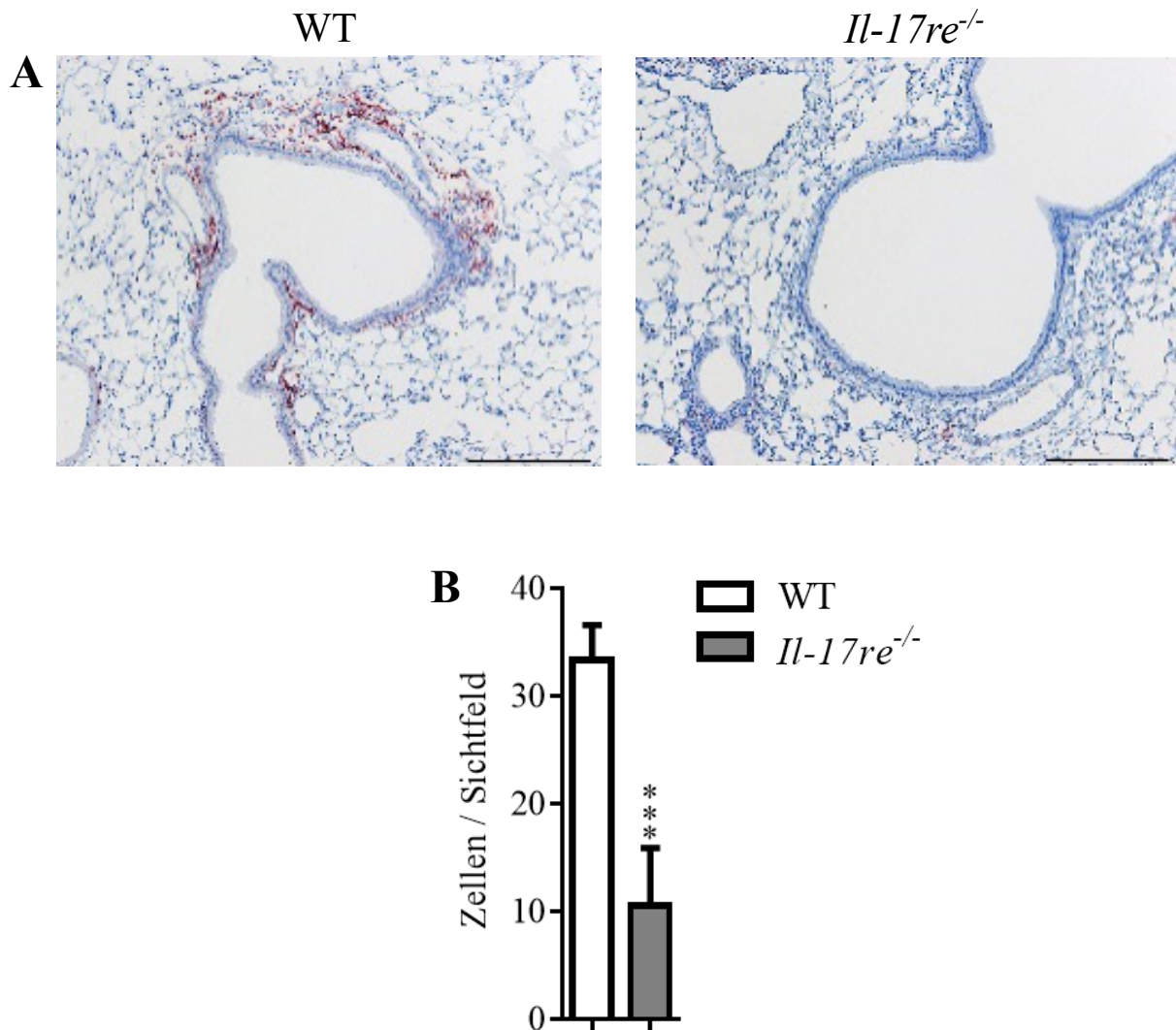


Abbildung 11: Die Defizienz für IL-17RE führt zu einer verminderten Anzahl TNF- α positiver Zellen in der Lunge

WT- (weiß) und *Il-17re*^{-/-}- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Tiere euthanasiert und die Lungen Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet und TNF- α immunhistologisch angefärbt. (A) Repräsentative immunohistochemische Färbung von TNF- α positiven Zellen (Skalierungsbalken: 200 μ m). (B) Quantifizierung der TNF- α Färbung. Statistik: Zweiseitiger t-Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen infizierten WT- und *Il-17re*^{-/-}-Mäusen (Signifikanzniveau: *** $p < 0,001$).

5.1.8 Die Defizienz für IL-17RE hat keinen Einfluss auf das Differentialblutbild nach Pneumokokken-Exposition

Um mögliche Unterschiede in der Leukozytenverteilung des peripheren Blutes ersichtlich zu machen, wurde 24 h nach *S. pneumoniae* Infektion ein Differentialblutbild von *Il-17re^{-/-}* - und WT-Tieren angefertigt (Abb. 12). Im Vergleich zu den WT-Mäusen führte die Absenz von IL-17RE nicht zu einer signifikanten Veränderung in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im Blut. Im Vergleich zu den Kontrollen war allein die Anzahl neutrophiler Granulozyten in *Il-17re^{-/-}*-Mäusen 24 h nach Infektion signifikant höher. Die restlichen Zellzahlen haben sich in Bezug auf die PBS infizierten Tiere nicht signifikant verändert.

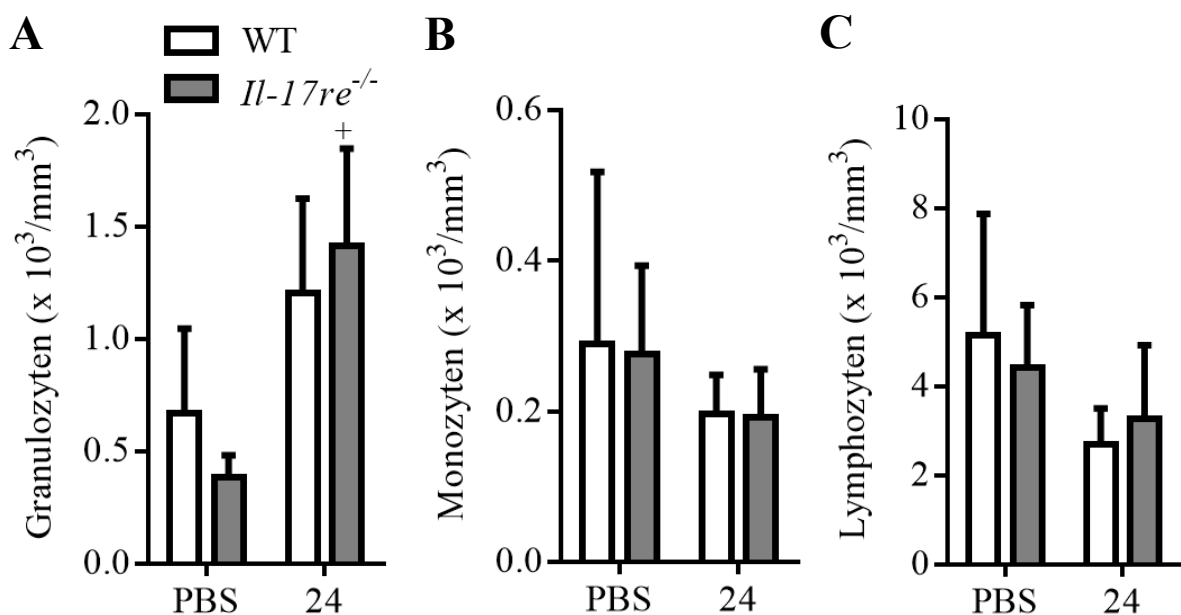


Abbildung 12: Die Defizienz für IL-17RE hat keinen Einfluss auf die Leukozyten im Blut nach Infektion

WT- (weiß) und *Il-17re^{-/-}* - Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4 \cdot 7 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. 24 h nach Infektion erfolgte die Anfertigung eines Differentialblutbildes durch lichtmikroskopisches Auszählen der jeweiligen Leukozytenpopulation im Blutausschlag. (A) Anzahl der neutrophilen Granulozyten, (B) Monozyten und (C) Lymphozyten. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen PBS-Kontrollen und infizierten Mäusen (Signifikanzniveau: $+p < 0,05$).

5.1.9 *Il-17c*^{-/-}-Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Exposition eine geringere Anzahl Entzündungszellen in der Lunge

Zuvor konnte gezeigt werden, dass der Verlust von IL-17RE zu einem reduzierten Einstrom neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum führt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch in Abwesenheit von IL-17C eintritt, wurden *Il-17c*^{-/-}- sowie WT-Tiere mit *S. pneumoniae* infiziert und nach 24 h analysiert. Wie bei IL-17RE defizienten Mäusen war 24 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* die Anzahl intrapulmonaler Leukozyten in den *Il-17c*^{-/-}-Tieren verglichen mit WT-Mäusen signifikant vermindert (Abb. 13).

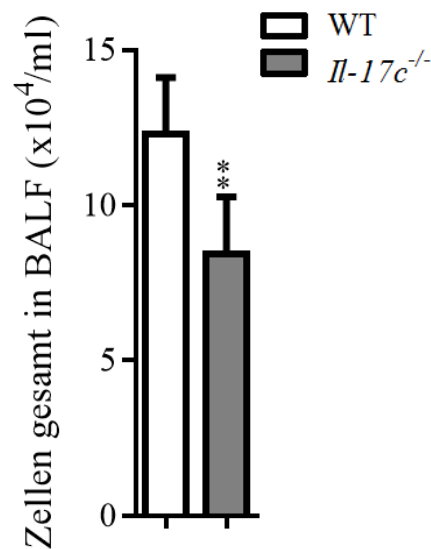


Abbildung 13: Die Gesamtanzahl der Entzündungszellen in der BALF ist nach Infektion bei *Il-17c*^{-/-}-Mäusen vermindert

WT- (weiß) und *Il-17c*^{-/-}- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* (8x10⁶ CFU/ml) infiziert. Die Gesamtanzahl der Leukozyten (in x 10⁴ /ml) in der BALF wurde 24 h nach Infektion durch Auszählen in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Statistik: Zweiseitiger t-Test (n = 6 pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen WT- und *Il-17c*^{-/-}-Mäusen (Signifikanzniveau: **p<0,01).

5.1.10 *Il-17c*^{-/-}-Mäuse zeigen nach Pneumokokken-Infektion eine geringere Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum

Auch bei der Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den Versuchen mit *Il-17re*^{-/-}-Mäusen. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF war bei *Il-17C* defizienten Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren nach 24 h signifikant erniedrigt (Abb. 14A). Bei der Makrophagen- und Lymphozytenzahl waren keine signifikanten Unterschiede zu registrieren (Abb. 14B und C). Es bestand jedoch die Tendenz zu weniger Makrophagen sowie Lymphozyten bei den *Il-17c*^{-/-}-Mäusen.

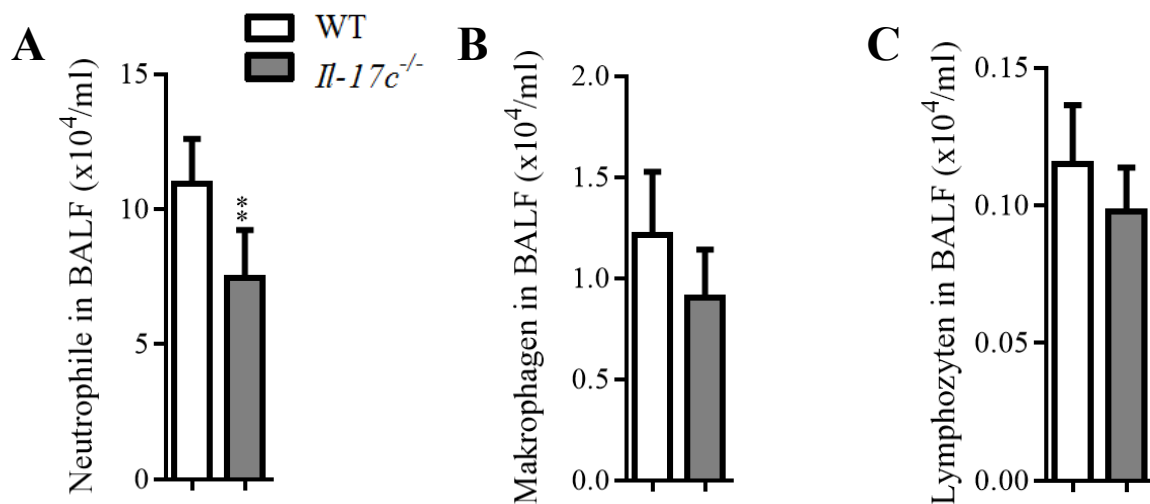


Abbildung 14: IL-17C vermittelt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge

WT- (weiß) und *Il-17c*^{-/-}- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* (8x10⁶ CFU/ml) infiziert. Mittels Cytospin-Präparate wurden (A) neutrophile Granulozyten, (B) Makrophagen und (C) Lymphozyten 24 Stunden nach Infektion lichtmikroskopisch differenziert. Statistik: Zweiseitiger t-Test (n = 6 pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen WT- und *Il-17c*^{-/-}-Mäusen (Signifikanzniveau: **p < 0,01).

5.1.11 Die Defizienz für IL-17C beeinflusst nur geringfügig die Eliminierung von *S. pneumoniae*

Hinsichtlich der CFU in der BALF und im Lungenhomogenisat unterschieden sich *Il-17c*^{-/-}- und WT-Mäuse 24 h nach Infektion nicht signifikant voneinander (Abb. 15). Es bestand die Tendenz zu einer niedrigeren Anzahl noch lebender Bakterien in den *Il-17c*^{-/-}-Mäusen.

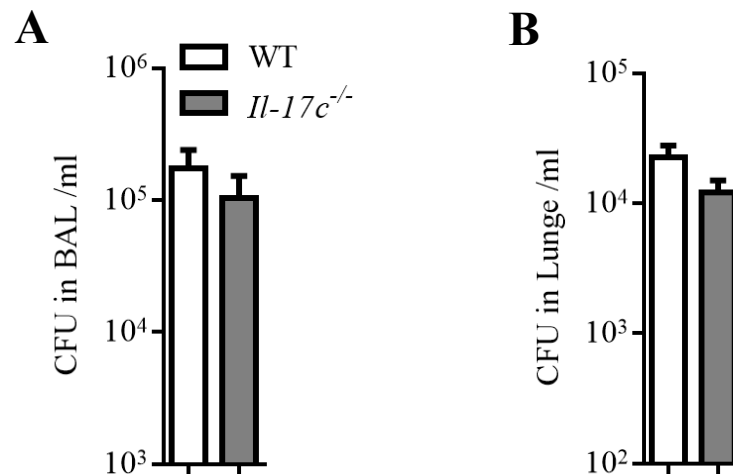


Abbildung 15: Die Defizienz für IL-17C hat nur einen geringen Einfluss auf die Eliminierung von *S. pneumoniae*

WT- (weiß) und *Il-17c*^{-/-}- Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* (8x10⁶ CFU/ml) infiziert. 24 Stunden nach Infektion erfolgte die Bestimmung der Pneumokokken CFU (/ml) aus BALF (A) und Lungenhomogenisat (B). Statistik: Zweiseitiger t-Test (n = 6 pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD).

5.1.12 Nach Pneumokokken-Exposition unterscheiden sich *Il-17re*^{-/-}- und WT-Mäuse in der Myelopoese geringfügig

Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum über die IL-17C/IL-17RE-Achse vermittelt wird. Um zu klären, ob IL-17RE bei Infektion mit *S. pneumoniae* auch die Myelopoese reguliert, wurde das Knochenmark von WT- und *Il-17re*^{-/-}-defizienten Tieren 24 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* und PBS als Kontrolle durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde der Anteil von HSPC, GMP, CMP und MPC an den *lineage*-negativen Zellen bestimmt (Abb. 16).

Nach Infektion sank der relative HSPC- und CMP-Anteil beider Gruppen im Vergleich zu den PBS-infizierten Kontrollen signifikant ab (Abb. 16 A und C). Der GMP- und MPC-Anteil verringerte sich ebenfalls signifikant in *Il-17re*^{-/-}- Mäusen, während die WT-Tiere lediglich die Tendenz zu einem erniedrigten Anteil nach Infektion zeigten (Abb. 16 B und D). Dies legt nahe, dass die Myelopoese nach Infektion über die IL-17C/IL-17RE-Achse in geringen Maßen beeinflusst wurde.

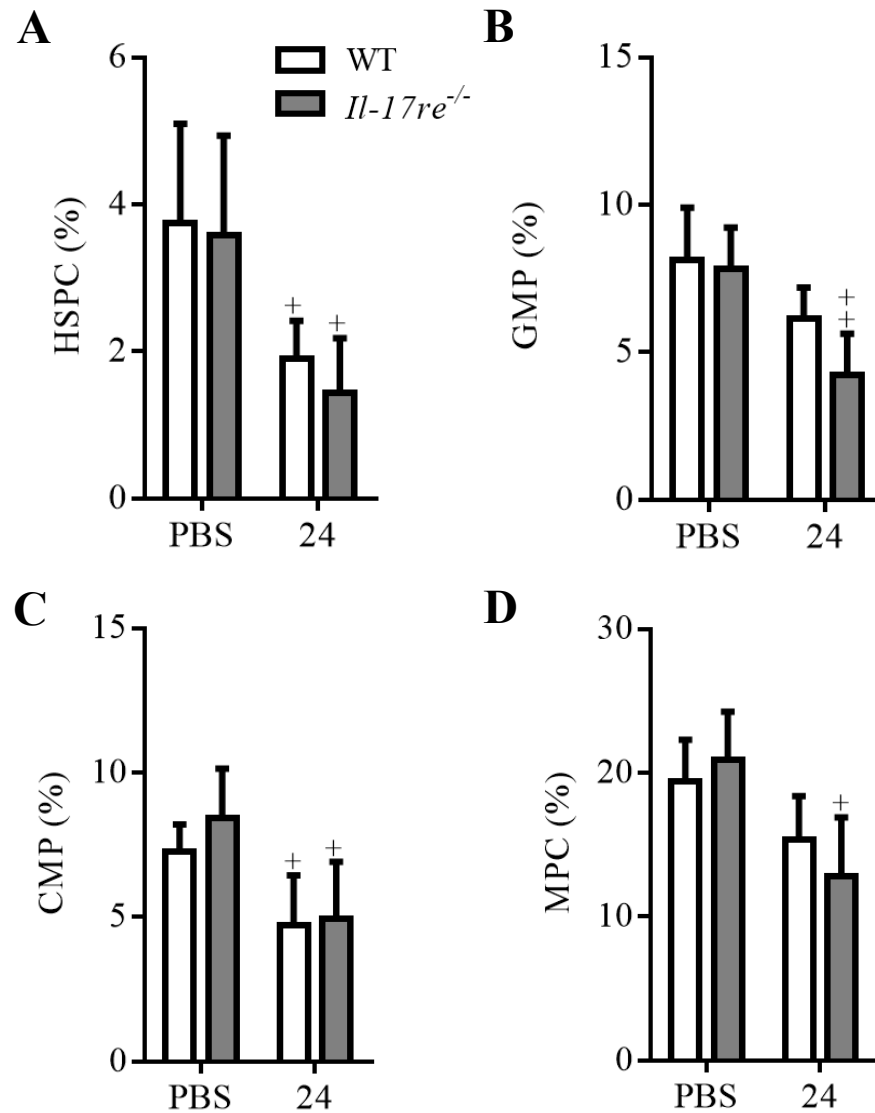


Abbildung 16: Relativer Anteil der leukozytären Vorläuferzellen an *lineage*-negativen Zellen des Knochenmarks

WT- (weiß) und *Il-17re^{-/-}*-Tiere (grau) wurden mit *S. pneumoniae* ($4,8 \times 10^6$ CFU/ml) infiziert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse des Knochenmarks wurde der Anteil (in %) von HSPC- (A), GMP- (B), CMP- (C) und MPC-Zellen (D) an *lineage*-negativen Zellen bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 4$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen PBS-Kontrollen und infizierten Mäusen (Signifikanzniveau: + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$).

5.1.13 IL-17A, IL-17C, IL-17D und IL-17RE werden bei Pneumokokken-Pneumonie vermehrt exprimiert

Um herauszufinden, ob die Interleukine IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F und der Rezeptor IL-17RE als Antwort auf die Infektion der Lunge mit *S. pneumoniae* vermehrt exprimiert werden, wurde RNS aus den Lungen von infizierten und uninfizierten WT-Tieren isoliert. Die RNS wurde in cDNA umgeschrieben und die relative mRNA-Expression von IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F und IL-17RE mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (Abb. 17). Der bakterielle Stimulus führte 4 h nach Infektion zu einem starken Anstieg der relativen IL-17A-, IL-17C-, IL-17D Expression, die gegenüber den uninfizierten Mäusen signifikant gesteigert war. Ähnliches Bild ergab sich bei der relativen Expression des Rezeptors IL-17RE, welche nach 4 h weniger stark, aber dennoch signifikant anstieg. Folglich induziert die frühe Pneumokokken-Pneumonie sowohl die Expression von IL-17A, IL-17C, IL-17D als auch die des funktionellen Rezeptors IL-17RE. IL-17B, IL-17E, IL-17F wurden hingegen *post infectionem* nicht vermehrt exprimiert (Daten nicht gezeigt).

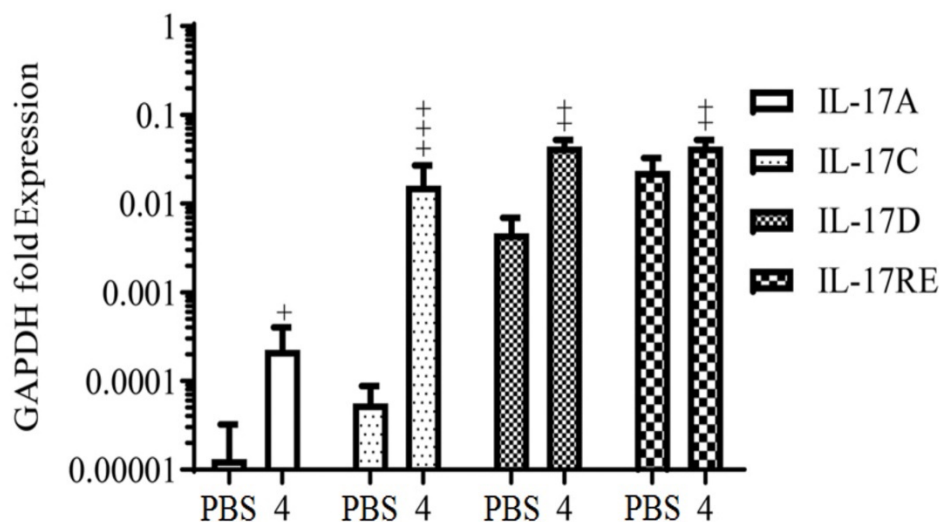


Abbildung 17: Relative Expression von IL-17A, IL-17C, IL-17D und IL-17RE

Mit *S. pneumoniae* ($4-7 \times 10^6$ CFU/ml) infizierte WT- und uninfizierte Kontrolltiere wurden nach 4 h die Lungen entnommen und die daraus isolierte Gesamt-mRNA in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR wurde die relative IL-17A-, IL-17C-, IL-17D- und IL-17RE Expression in Bezug auf die GAPDH Expression ermittelt. Statistik: Zweiseitiger t-Test ($n \geq 5$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen *S. pneumoniae* infizierten und PBS-behandelten WT-Mäusen (Signifikanzniveau: + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$)

5.2 *Ex vivo* Versuche

5.2.1 IL-17C hat keinen Einfluss auf die *S. pneumoniae*-induzierte Zytokinsekretion durch murine Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen sind in vieler Hinsicht für die frühe unspezifische Immunabwehr gegen Bakterien essenziell. Sie phagozytieren nicht nur eindringende Erreger, sondern modulieren die Immunantwort auf mehreren Ebenen [66, 241]. Darüber hinaus kommt ihnen eine bedeutende Rolle in der Auflösung der Entzündung zu, welche sie durch Phagozytose apoptotischer Granulozyten wahrnehmen und somit das Lungengewebe vor erheblichen Schäden bewahren [44, 88, 124]. Die vorherigen *in vivo* Experimente ergaben, dass IL-17C und sein funktioneller Rezeptor IL-17RE die inflammatorisch vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten während der Pneumokokken-Pneumonie vermitteln. Im Gegensatz dazu blieben die Anzahl der in der Lunge befindlichen Alveolarmakrophagen sowie deren Erholung weitestgehend von IL-17C / IL-17RE unbeeinflusst.

Um die Funktion von IL-17C in der Immunreaktion dieses Zelltypus genauer zu untersuchen, wurden Alveolarmakrophagen aus WT-Mäusen isoliert und *ex vivo* über 24 h mit rekombinantem IL-17C, lebendigen *S. pneumoniae* und der Kombination aus beidem stimuliert. Als Maß des Aktivierungszustandes wurde im Anschluss die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine MIP-2 und KC aus dem Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Es wurde ersichtlich, dass die alleinige Stimulation mit IL-17C im Vergleich zu der PBS-exponierten Kontrolle zu keiner vermehrten Zytokinsekretion führte (Abb. 18). Sowohl die Applikation von Pneumokokken als auch die Kombination IL-17C mit Pneumokokken induzierte eine signifikante Ausschüttung von MIP-2 und KC. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Pneumokokken und den IL-17C-Pneumokokken Ko-stimulierten Alveolarmakrophagen. Am Ende des Experimentes unterschied sich die CFU der mit Bakterien stimulierten Gruppen nicht (Grafik nicht gezeigt).

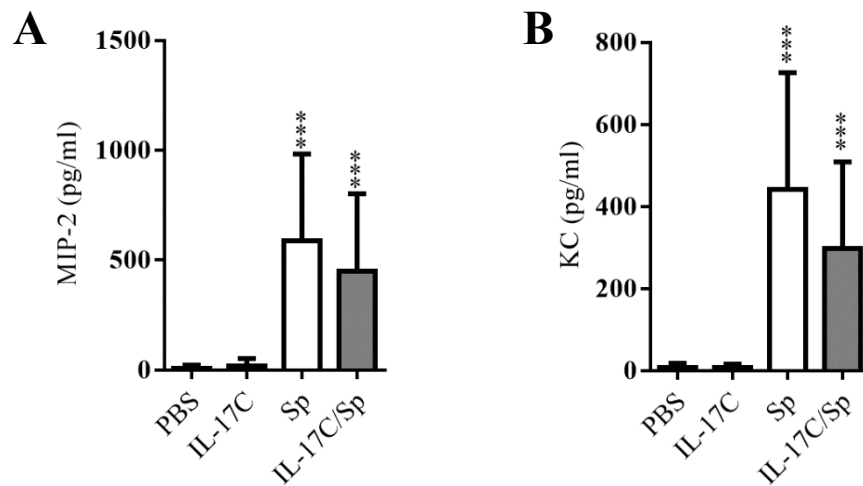


Abbildung 18: Freisetzung der Zytokine MIP-2 und KC aus Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* und IL-17C

Alveolarmakrophagen wurden aus Mäusen isoliert und *in vitro* mit PBS (Kontrollgruppe), reinem IL-17C in einer Konzentration von 100 ng/ml, Pneumokokken (CFU $2-3,5 \times 10^4$ /ml) (weiß) und IL-17C (100 ng/ml) in Kombination mit Pneumokokken (CFU $2-3,5 \times 10^4$ /ml) (grau) stimuliert. Nach 24 h wurde mittels ELISA die Konzentration von (A) MIP-2 und (B) KC aus den Zellüberständen bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test ($n \geq 3$ pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); Vergleich zwischen PBS-stimulierten Kontrollen und *S. pneumoniae* sowie *S. pneumoniae*-IL-17C-Ko-stimulierten Zellen (Signifikanzniveau: *** $p < 0,001$).

5.2.2 *Il-17re^{-/-}*- und WT-Alveolarmakrophagen phagozytieren gleich effizient

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen durch IL-17C nicht in ihrer Pneumokokken-induzierten Zytokinsekretion beeinflusst werden. Um die Funktion von IL-17RE bei der Phagozytose zu untersuchen, wurden Alveolarmakrophagen aus WT- und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen isoliert und *ex vivo* mit fluoreszierenden Mikrosphären inkubiert. Um Rückschlüsse auf die Phagozytoserate ziehen zu können, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse (Abb. 19). Es wurde der Anteil Mikrosphären-beinhaltennder Alveolarmakrophagen an den insgesamt detektierten Alveolarmakrophagen bestimmt. Bei der Kontrolle, welche mit reinem Medium inkubiert wurde, konnte kein Mikrosphärensignal registriert werden. WT- und *Il-17re^{-/-}*-Alveolarmakrophagen unterschieden sich dabei nicht im Anteil der Zellen, die Mikrosphären phagozytiert hatten. Beide Gruppen phagozytierten gleich effizient.

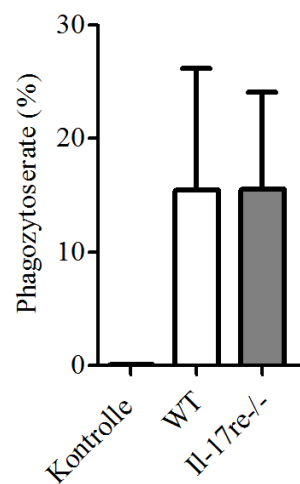


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytoserate von *Il-17re^{-/-}*- und WT-Alveolarmakrophagen

Es wurden Alveolarmakrophagen aus WT- (weiß) und *Il-17re^{-/-}*-Mäusen (grau) isoliert, *in vitro* mit fluoreszierenden Mikrosphären (Zell-Mikrosphären-Verhältnis von 1:200) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch der Anteil (in %) von Makrophagen die Mikrosphären phagozytiert hatten an allen detektierten Makrophagen bestimmt. Die Kontrolle wurde nicht mit Mikrosphären inkubiert. Statistik: Zweiseitiger t-Test (n = 5 pro Gruppe); Daten gezeigt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD).

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der IL-17RE/IL-17C-Achse bei einer akuten *S. pneumoniae*-Pneumonie im Mausmodell analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17C und der IL-17C-Rezeptor IL-17RE während der Frühphase der Infektion vermehrt exprimiert werden. Versuche mit IL-17C- und IL-17RE-defizienten Mäusen ergaben, dass die IL-17C/IL-17RE-Achse eine pulmonale Entzündung und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge vermittelt. Als ein lokaler Mediator der Neutrophilen-Rekrutierung konnte das Zytokin G-CSF identifiziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten sowie die bakterielle Klärung weitestgehend unabhängig von IL-17C/IL-17RE verlaufen. Die Defizienz für IL-17RE hatte nur einen geringen Einfluss auf die Myelopoese im Knochenmark und das leukozytäre Differentialblutbild. *In vitro* Versuche zeigten, dass die Zytokinfreisetzung durch murine Alveolarmakrophagen bei Pneumokokken-Exposition unabhängig von IL-17C verläuft. Auch die phagozytotische Aktivität von Alveolarmakrophagen blieb unbeeinflusst von IL-17RE.

6.1 Die Rolle von IL-17RE und IL-17C im murinen Pneumokokken-Pneumoniemodell

Wie zuvor erwähnt, gehören der IL-17-Familie 6 Mitglieder an, von denen IL-17A und IL-17F am besten charakterisiert sind [157]. Die Rolle von IL-17C und seinem funktionellen Rezeptor IL-17RE in der Bekämpfung einer Pneumokokken-Pneumonie ist dagegen unbekannt. In vorangegangenen Arbeiten wurde die Bedeutung von IL-17C bei Pneumonien des viralen- und gramnegativen Spektrums beobachtet, während seine Funktion bei der pulmonalen Abwehr gegen grampositive Erreger ungeklärt bleibt. Das in dieser Arbeit verwendete bakterielle Pneumoniemodell hat sich in der Erforschung der Pathophysiologie der ambulant erworbenen Lungenentzündungen mehrfach bewährt. Dabei ist die intranasale Infektion die meist genutzte Methode zur Beimpfung der tiefen Atemwege [48]. Sie ist durch eine einfache, minimalinvasive und schnelle Durchführbarkeit gekennzeichnet, was den natürlichen Infektionsweg am besten nachahmt. Im Gegensatz zu vielen anderen Gruppen wurde bei dieser Arbeit eine mittlere Infektionsdosis gewählt, um ein mildes Pneumoniemodell mit relativ geringer bakterieller Infektionslast zu erzeugen. Dies diente dazu, eine präzisere Differenzierung der Frühphase einer Pneumokokken-Infektion zu ermöglichen, wobei es ein frühzeitiges Versterben der Tiere zu verhindern galt [5, 16, 50, 72, 111, 191, 247]. Der verwendete *S. pneumoniae* Serotyp 2 Stamm, D39 hat sich als klassischer Stamm etabliert, weshalb dessen repetitive Verwendung für gleichbleibende Krankheitsmerkmale sorgt und den direkten Vergleich wissenschaftlicher Arbeiten und deren Resultate erlaubt. Er wird in zahlreichen Studien zur Erforschung der Pathogenese der Pneumokokken-Erkrankungen genutzt [16, 72, 148]. Während sich D39 im Menschen weitestgehend avirulent verhält, ruft er in der Maus eine schwere Krankheit hervor [38]. Es ist als nachteilig anzumerken, dass D39 nicht zu den häufigsten CAP verursachenden Serotypen gehört [211]. Die klinische Relevanz der Versuche ist

durch die reduzierte Übertragbarkeit auf den Menschen folglich eingeschränkt.

6.1.1 Durch *S. pneumoniae* herbeigeführter Gewichtsverlust

In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen führte die Pneumokokken-Pneumonie innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 72 Stunden zu einem signifikanten Gewichtsverlust. Ein Unterschied zwischen den WT- und IL-17RE-defizienten Tieren konnte nicht festgestellt werden. *S. pneumoniae* führte bei anderen Gruppen, die einen ähnlichen Versuchsaufbau nutzten, ebenfalls zu einer Reduktion des Körpergewichts [191]. Gewichtsverluste können dabei als prognostischer Marker der Infektionsschwere und Prädiktor des *Outcomes* genutzt werden [171, 227]. Parallel zu den hier geschilderten Ergebnissen, zeigten sich bei IL-17A-defizienten- und WT-Tieren keine signifikanten Gewichtsunterschiede über 48 Stunden [191]. Diese Resultate legen nahe, dass die gewählte Infektionsdosis eine greifbare Erkrankung erzeugt. Die Krankheitsschwere wird in der Frühphase jedoch unwesentlich durch den Verlust des Rezeptors IL-17RE beeinflusst.

6.1.2 IL-17RE und IL-17C vermitteln die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, ohne den Makrophagen-Umsatz zu beeinflussen

In dieser Arbeit wurde nach *S. pneumoniae* Inokulation ein starker intraalveolärer Leukozyteneinstrom beobachtet, der von neutrophilen Granulozyten dominiert wurde. Die Pneumokokken-Pneumonie zeichnet sich durch die überwiegende Präsenz dieser Zellen aus und wurde im Mausmodell mehrfach reproduziert [15, 191]. Der Influx war durch die IL-17RE/IL-17C-Defizienz signifikant reduziert. Somit gelang es erstmalig darzulegen, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der Frühphase einer Pneumokokken-Pneumonie im Mausmodell von epithelalem IL-17C und seinem funktionellen Rezeptor IL-17RE vermittelt wird. Dieser Zusammenhang zwischen der IL-17C/IL-17RE-Achse und der Neutrophilen-Rekrutierung in die Lunge konnte bereits mehrfach für gramnegative und virale Erreger gezeigt werden [109, 117, 192, 247]. Beispielhaft kann ein Pneumoniemodell mit dem gramnegativen Stäbchen *Pseudomonas aeruginosa*, einem häufigen Keim der nosokomialen Lungenentzündung, angeführt werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Wolf et al., dass es bei IL-17C-defizienten Tieren zu einer geringeren Anzahl von Entzündungszellen in der BAL 24 Stunden nach der intranasalen Infektion mit *P. aeruginosa* kam [247]. Zudem zeigten IL-17C-defiziente Mäuse ein gesteigertes Überleben innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Infektion mit *P. aeruginosa*. Mit Hilfe von IL-17A-defizienten Mäusen und Zellkulturexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass bei einer *P. aeruginosa* Infektion IL-17A die Expression von IL-17C reguliert [247]. Interessanterweise wird IL-17C jedoch nicht für die T-Zell- und IL-17A-unabhängige Rekrutierung von Neutrophilen und Chemokininduktion nach LPS-Installation gebraucht [252]. Weitere

Studien müssen zeigen, inwiefern IL-17A bei einer Pneumokokken-Pneumonie die Expression von IL-17C reguliert. Auch im metastatischen und primären Lungenkrebsmodell konnte gezeigt werden, dass IL-17C nach akuter und chronischer Exposition mit NTHi die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Lungenparenchym vermittelt [117, 192]. Hurst et al. zeigten zudem, dass die viral-vermittelte Überexpression von IL-17C zu einer Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge führt [103]. All diese Mausstudien weisen darauf hin, dass IL-17C die Rekrutierung Neutrophiler bei Infektionen der Lunge vermittelt. Gestützt werden die Mausstudien von zahlreichen Zellkulturstudien. Diese zeigen, dass Lungenepithelzellen bei einer Infektion im Rahmen der angeborenen Immunabwehr zur Freisetzung von IL-17C angeregt werden. Dabei reguliert IL-17C die Expression und Abgabe von neutrophilen Chemokinen. So zeigten verschiedene *in vitro* Studien, dass die Infektion von Atemwegsepithelzellen und Pneumozyten mit typischen Lungenpathogenen wie NTHi, *P. aeruginosa* und Rhinoviren, aber auch mit TLR-Liganden wie polyI:C zu einer verstärkten Sekretion von IL-17C führt. IL-17C reguliert dabei autokrin die Bildung von Zytokinen und Chemokinen, welche die Rekrutierung von Neutrophilen vermitteln [109, 110, 117, 129, 184, 247]. Darüber hinaus ist die Chemokin-induzierende Wirkung der IL-17C/IL-17RE-Achse nicht nur für das pulmonale Kompartiment, sondern auch für diverse andere Gewebe beschrieben [132, 186]. Selbst für die PMN-Rekrutierung in arteriosklerotische Plaques und in Tumorgewebe scheint sie mitverantwortlich zu sein [28, 117, 192].

In Konkordanz dazu konnten Studien zeigen, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei der Abwehr von Bakterien und Viren auch durch das verwandte IL-17A vermittelt wird [64, 155, 234]. In der Lunge konnte dies sowohl für gramnegative als auch für grampositive Erreger gezeigt werden [36, 191]. In Analogie dazu führte der Knockout von IL-17RA in einem *S. pneumoniae*-Modell zu einer signifikant verringerten Neutrophilenzahl in der BAL. Spannenderweise konnte eine Kapselabhängigkeit dargelegt werden. Bei stark-bekapselten Stämmen aggravierte der Neutrophileninflux die Krankheit. Im Gegensatz dazu zeigte IL-17A bei schwach-bekapselten Stämmen eine protektive Wirkung [191]. Dies lässt vermuten, dass die durch IL-17C hervorgerufene Immunantwort ebenfalls vom jeweiligen Kapseltyp abhängig ist. Deshalb wäre es sinnvoll, ergänzende Versuche mit anderen *S. pneumoniae* Stämmen bzw. Kapselvarianten durchzuführen.

Nahezu die gesamte IL-17-Familie hat diese Neutrophilen-rekrutierende Fähigkeit gemein. Sie konnten durch Hurst et. al. bestätigt werden. Nicht nur die Überexpression von IL-17C, sondern auch von IL-17A und IL-17F, führten zu einer Neutrophilie und Expression inflammatorischer Gene in Mauslungen. Lediglich die Installation von IL-17E induzierte eine Eosinophilie, die mit einer vermehrten Mukussekretion und bronchialer Hyperreagibilität einher ging [103].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen zusätzlich, dass die Defizienz für IL-17C und IL-17RE keine Auswirkung auf die *S. pneumoniae*-induzierte Verminderung der Alveolarmakrophagenzahl in der BAL innerhalb der ersten 24 Stunden hat. Gleiches gilt für deren Erholung nach 72 Stunden. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine derartige Kinetik nach *S. pneumoniae*-Installation beobachten. Sie ist am wahrscheinlichsten durch Pneumokokken bedingte Apoptose und Nekrose mit anschließender Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut zu erklären [91, 154, 244]. Da sich der Makrophagen-

Umsatz in WT- und *Il-17re^{-/-}/Il-17c^{-/-}* kaum unterschied, vermag die IL-17C/IL-17RE-Achse keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Blutmonozyten ins pulmonale Kompartiment und deren Erholung in der frühen Phase der Infektion zu nehmen. Auch bei der Lymphozytenzahl kam es zu keinen signifikanten Unterschieden. Dies stimmt mit bisherigen Studien überein, die keine IL-17C-Abhängigkeit von mononukleären Zellen bei *P. aeruginosa* Infektion und NTHi-Exposition aufzeigen konnten [192, 247]. Damit wird deutlich, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowohl während *S. pneumoniae*-, als auch bei gramnegativen Pneumonien von IL-17C/IL-17RE vermittelt wird, ohne die Rekrutierung von Monozyten oder Erholung der Alveolarmakrophagen zu beeinflussen.

6.1.3 IL-17RE hat keinen Einfluss auf die Sekretion von MIP-2 und KC

Während einer durch *S. pneumoniae* hervorgerufenen Lungenentzündung kommt es zu einer vermehrten Induktion inflammatorischer Zytokine. Sie dienen der Pathogen-Eliminierung durch Aktivierung und Chemotaxis von Abwehrzellen [15]. Auch in dem hier dargelegten Modell konnte eine inflammatorisch bedingte, verstärkte Expression von MIP-2, KC und G-CSF beobachtet werden, die vergleichbar mit anderen murinen *S. pneumoniae*-Modellen war [62, 123, 204].

Es ist bereits bekannt, dass neutrophilenchemotaktisch wirkende Zytokine durch IL-17C als Antwort auf gramnegative- und virale Pathogene induziert werden. IL-17C wird dabei vom Bronchialepithel und Pneumozyten sezerniert und wirkt auf eine autokrine Weise [103, 129, 184, 247]. CXCL1, KC und MIP-2 sind Beispiele für Chemokine, die nach IL-17C-Stimulation von humanen bzw. murinen Lungenepithelzellen exprimiert werden [109]. Diese Botenstoffe gelten als bedeutende Neutrophilenchemotaktika der bakteriellen Pneumonie [25, 47, 69]. Jamieson et al. konnten zeigen, dass IL-17C das Chemokin CXCL1 in humanen Atemwegsepithelzellen induziert und dass der siRNA-vermittelte *Knockdown* von IL-17C die Expression von CXCL1 und neutrophile Chemotaxis nach Infektion mit Lungenpathogenen signifikant verringert [110]. Um die beobachtete IL-17C-vermittelte Neutrophilenrekrutierung genauer zu erforschen, wurden in der vorliegenden Arbeit Chemokin-Konzentrationen nach Infektion in der BAL bestimmt. Während IL-17RE bei den hier gezeigten Infektionsversuchen mit *S. pneumoniae* keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von KC und MIP-2 zu haben schien, kam es bei Versuchen mit *P. aeruginosa* durch Wolf et al. zu einer signifikant verringerten KC-Konzentration in der BAL von *Il-17c^{-/-}*-Tieren 24 Stunden *post infectionem* [247]. Diese Diskrepanz könnte auf dem unterschiedlichen PRR-Aktivierungsmuster von *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* basieren. Hierdurch kommt womöglich eine Immunantwort mit abweichendem Zytokinspektrum zustande [60, 158, 231].

6.1.4 IL-17RE induziert G-CSF

Während MIP-2 und KC unbeeinflusst blieben, gelang es erstmalig zu zeigen, dass G-CSF bei Pneumokokken-Pneumonie durch die IL-17C/IL-17RE-Achse induziert wird. G-CSF vermittelt womöglich die Neutrophilen-Rekrutierung und Akkumulation. Das Zytokin G-CSF ist sehr vielseitig. Es ist nicht nur im Stande die Granulopoese zu beeinflussen auch lokale Effekte auf Neutrophile sind mehrfach beschrieben [123, 194, 222, 233]. Als G-CSF-Quelle könnten dabei Alveolarepithelzellen dienen. Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit ist bekannt, dass G-CSF bei bakterieller Stimulation von Alveolarepithelzellen Typ 2 und Alveolarmakrophagen sezerniert wird [13, 126, 222].

In den Versuchen der vorliegenden Studie kam es zu einem vermehrten Neutrophileneinstrom in die Atemwege. Dies kann durch mehrere Eigenschaften von G-CSF erklärt werden. Es wirkt bekanntermaßen chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [13, 126, 222, 233]. Außerdem ist es nach Sekretion durch Bronchialepithel in der Lage die Überlebenszeit von Neutrophilen durch Apoptoseverzögerung zu verlängern [45, 153, 233]. Die Fähigkeit von IL-17C über G-CSF-Expression die Rekrutierung und Instandhaltung Neutrophiler zu regulieren, konnte in anderen Studien bereits gezeigt werden. Dementsprechend führte die IL-17C-Stimulation von humanen Keratinozyten zu einer erhöhten G-CSF Expression mit neutrophiler Gewebsinvasion [186]. Ähnliches konnte bei dem Schwesterinterleukin IL-17A beobachtet werden. Ye et al. kamen zum Ergebnis, dass ein G-CSF-vermittelter Neutrophileneinstrom bei *Klebsiella pneumoniae*-Pneumonie durch IL-17A eingeleitet wird. Durch den Verlust des IL-17RA Rezeptors waren sowohl die G-CSF Konzentrationen als auch der Neutrophileninflux reduziert [255]. Eine Adenoviren-induzierte pulmonale Überexpression von IL-17A führte ebenfalls zu einem G-CSF und MIP-2 vermittelten PMN-Einstrom. Dieser ging mit einer vermehrten Klärung von *K. pneumoniae* einher [254]. Solch ein G-CSF bedingtes verbessertes Überleben mit beschleunigter bakterielle Klärung ist mehrfach auch explizit für die Pneumokokken-Pneumonie beschrieben [13, 68, 79, 123]. Eine derartige Wirkung wird durch die Neutrophilenaktivierenden, Phagozytose- und Bakterizidie-verstärkenden Eigenschaften von G-CSF intensiviert. Sie tragen zur Eliminierung der Bakterien erheblich bei [123, 194]. In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen weder eine verbesserte bakterielle Klärung noch ein Überlebensvorteil durch G-CSF bzw. IL-17RE dargestellt werden. Interessanterweise zeigten Gregory et al., dass die Absenz von G-CSF zur kompensatorischen Induktion anderer inflammatorischer Zytokine wie KC führt. Dies könnte erklären, weshalb die Expression anderer Zytokine in den Versuchen vorliegender Arbeit unwesentlich verändert war [79]. In der Literatur sind derweil nicht nur positive Effekte von G-CSF beschrieben. Auch nachteilige Folgen nach G-CSF-Installation sind anzuführen. Zu diesen gehören, beruhend auf dem Neutrophileninflux, Lungenschäden mit reduzierter Organfunktion und Hypoxämie [92]. Basierend auf der prolongierten Neutrophilenentzündung scheinen hohe G-CSF Spiegel in der Lunge sogar prognostisch für ein schlechteres Überleben bei ARDS-Patienten zu sein [2].

6.1.5 Unbeeinflusste G-CSF Plasmakonzentration und Blutneutrophilenzahl

In den Versuchen dieser Arbeit blieben die G-CSF Plasmakonzentration und Blutneutrophilenzahl von der Defizienz für IL-17RE unbeeinflusst. Es ist davon auszugehen, dass G-CSF lokal in der Lunge gebildet wurde und seine wesentliche Wirkung dort entfaltet. Solch eine lokale G-CSF Sekretion wurde auch in klinischen Studien beobachtet. Bei Pneumokokken-CAP-Patienten konnten erhöhte G-CSF Konzentrationen in der BAL nachgewiesen werden, ohne dass es zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration kam [123]. Im Gegensatz dazu scheint die IL-17A vermittelte G-CSF-Induktion systemisch zu wirken. Experimente durch Smith et al. haben gezeigt, dass IL-17A die Anzahl frei zirkulierender neutrophiler Granulozyten über G-CSF-Induktion beeinflusst. In IL-17RA defizienten Neutrophilie-Mäusen waren sowohl die Neutrophilen als auch die Plasma G-CSF-Konzentration signifikant reduziert [210]. Dies lässt vermuten, dass IL-17RA im Vergleich zu IL-17RE, stärkere Effekte verübt. Die Wirkung von IL-17C scheint hauptsächlich auf die Lunge beschränkt zu sein. Dass der IL-17RE Verlust keine systemische Relevanz zeigt, könnte dadurch erklärt werden, dass IL-17RA sowohl Rezeptor für IL-17A als auch für IL-17C ist. IL-17RE hingegen bindet lediglich letzteres [186, 226]. Darüber hinaus wird IL-17RA ubiquitär exprimiert. Im Gegensatz dazu ist IL-17RE hauptsächlich auf Schleimhäuten von Trachea, Kolon und Lunge zu finden [184, 186]. Ergänzend wurde gezeigt, dass IL-17C, zumindest bei Infektion mit *P. aeruginosa*, IL-17A-abhängig in der Lunge exprimiert wird. Damit kann sich ein Verlust von IL-17A auf beide Systeme auswirken. Bei einer akuten *S. pneumoniae*-Pneumonie hingegen lässt ein IL-17C-Defizit die IL-17A Induktion möglicherweise unbeeinflusst [247]. Dementsprechend konnte in den Versuchen vorliegender Arbeit mittels RT-PCR bewiesen werden, dass neben IL-17C- auch IL-17A-mRNA bei Pneumokokken-Pneumonie vermehrt exprimiert wird. Somit ist es möglich, dass IL-17RE nur auf die lokale G-CSF-Produktion der Lunge Einfluss nimmt, wohingegen IL-17A weiterhin auf die Neutrophilen und deren Zahl im Blut wirken kann.

6.1.6 IL-17RE/IL-17C hat einen geringen Einfluss auf die bakterielle Klärung

Trotz der stark reduzierten Neutrophilenzahl in der BAL hatten IL-17C und sein Rezeptor IL-17RE nur geringen Einfluss auf die bakterielle Klärung. Dies verdeutlicht, dass eine überschießende Neutrophilen-Antwort nicht zur Wirtsabwehr beitragen muss. Deckend hierzu war die Neutrophilenrekrutierung bei Wolf et al. von IL-17C abhängig, während die *P. aeruginosa*-Klärung davon unbeeinträchtigt schien [247]. Die Defizienz für IL-17C führte vielmehr zu einer verminderten systemischen Konzentration von IL-6 und zu einem verbesserten Überleben der Mäuse. Ähnliches konnte für IL-17RA gezeigt werden. Dessen Abwesenheit beeinflusste die Klärung von *S. pneumoniae* unwesentlich, obwohl die Neutrophilen sowohl in der Lunge als auch im Blut signifikant erniedrigt waren [247].

Die in dieser Arbeit beobachteten IL-17RE-Effekte scheinen auf einem G-CSF-induzierten PMN-Einstrom zu beruhen. Bei Knapp et al. führte die Neutralisierung von G-CSF trotz reduzierter chemotaktischer Wirkung zu einer unveränderten bakteriellen Klärung mit besserem Überleben [123].

In der Frühphase der Lungenentzündung scheint der PMN-Einstrom für eine essenzielle Kontrolle der bakteriellen Infektion zu sorgen. Eine prolongierte Neutrophilenakkumulation hingegen, führt durch pulmonale Schäden zu einer behinderten Klärung mit reduziertem Überleben. So konnten Studien zeigen, dass eine Neutrophilendepletion vor Infektion mit einer vermehrten Anfälligkeit einhergeht. Eine Depletion nach 18 Stunden verbessert dagegen das Überleben bei gleichzeitig geringerer Bakterienlast [24]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für nicht bakterielle Erreger. Bei Pilzinfektionen führte der Verlust von IL-17C ohne Beeinträchtigung der Erreger-Eliminierung zu einem besseren Überleben mit geringerem renalem Schaden [99]. Erwähnenswert ist, dass die Pneumokokken-Klärung bei geringeren Infektionsdosen ohnehin von Alveolarmakrophagen dominiert wird [29]. Die Akkumulation von Neutrophilen kann daher gegenteilige Effekte verüben und trägt lediglich zur Pathogenese bei [182]. Diese übermäßige Neutrophilenaktivierung hat eine vermehrte Gewebszerstörung zur Konsequenz. Idealerweise kommt es nach der Erregeraufnahme zur Apoptose der Neutrophilen. Durch den selbst herbeigeführten Zelltod werden schädliche Substanzen, wie Proteasen, Zytokine oder reaktive Sauerstoffspezies nicht unkontrolliert freigesetzt. Dieser Mechanismus kann unter inflammatorischen Bedingungen dysreguliert sein. Wird zugleich die Phagozytose behindert, kann es additiv zu einer Neutrophilennekrose mit Freisetzung toxischer Granula kommen. Die Entzündungsauflösung wird durch Nachrekrutierung von Immunzellen schlussendlich verzögert. Um diesem inflammatorischen Teufelskreis zu entkommen, bedarf es der Beseitigung apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen [23]. Mausexperimente mit dem in dieser Studie verwendeten *S. pneumoniae* Stamm D39 haben gezeigt, dass die Alveolarschranke durch diesen fehlregulierten Prozess relevanten Schaden erleiden kann. Als therapeutischer Ansatz konnten dabei PAR-1-Antagonisten identifiziert werden. Diese dämpfen die schädigende Wirkung Neutrophiler ab, ohne die Pneumokokken-Abwehr einzuschränken [115]. Auch IL-17A weist dieses lungenschädigende Potenzial bei Pneumonien auf. Ob es dabei zu einem protektiven oder schädigenden Effekt der IL-17A vermittelten Neutrophilenrekrutierung kommt, ist jedoch stark von der Kapseldicke und der damit einhergehenden Phagozytoseresistenz abhängig. Während IL-17A bei invasiven Stämmen schützend zu sein scheint, führt es zu einer erhöhten Letalität bei vergleichsweise gering-invasiven Stämmen [191]. Die Depletion von Neutrophilen in WT-Tieren konnte für ein verbessertes Überleben nach Pneumokokken-Infektion sorgen [191]. Andererseits sind in der Literatur auch gegenteilige Effekte beschrieben, bei denen die Depletion mit einer reduzierten Klärung und einer exazerbierten Lungeninfektion einherging [74, 123].

Dass IL-17C durch seine proinflammatorischen Eigenschaften zur Pathogenität diverser Erkrankungen beiträgt, ist schon länger bekannt. In der kollageninduzierten Arthritis führt IL-17C über entzündliche TNF- α Expression zur Exazerbation [253]. Auch in der Genese der Arteriosklerose induziert es den Einstrom von Entzündungszellen in arterielle Plaques und fördert deren Progress [28]. Gleiches konnte bei Bronchialkarzinomen beobachtet werden. Durch die Entzündung im Tumorgewebe kommt es zu einer beschleunigten malignen Proliferation. IL-17C konnte sogar als negativer Prognosefaktor bei menschlichen NSCLC identifiziert werden [117].

6.1.7 IL-17RE hat Einfluss auf die Anzahl TNF- α -positiver Zellen in der Lunge

Die histologischen Schnitte wurden mittels eines semiquantitativen inflammatorischen Scores bewertet. Nach Infektion mit *S. pneumoniae* ließen sich hiermit jedoch keine signifikanten Unterschiede in der histologischen Lungenpathologie zwischen IL-17RE-defizienten und WT-Tieren feststellen, auch wenn der inflammatorische Score bei IL-17RE-defizienten Tieren leicht vermindert ausfiel. Somit scheint IL-17C/IL-17RE nach histologischer Beurteilung keinen Einfluss auf die entzündlich bedingte pulmonale Schädigung zu nehmen. Um zu prüfen, inwiefern die Defizienz von IL-17RE und IL-17C die pulmonale Integrität beeinflusst, sind jedoch sensitivere Methoden notwendig. So kann der Übertritt von fluoreszenzmarkiertem Dextran oder Evans Blue in das Lungengewebe bestimmt werden. Hierfür wird Mäusen intravenös fluoreszenzmarkiertes Dextran oder Evans Blue in die Schwanzvene verabreicht, deren Übertritt in die Lunge nach Infektion bestimmt und ein Permeabilitätsindex berechnet [145]. Wolf et al. zeigten, dass der Gewebeschaden bei *P. aeruginosa* Pneumonie ebenfalls unabhängig von IL-17C war [247]. Lediglich in einem Modell, welches die Auswirkung von IL-17A auf die *P. aeruginosa*-Pneumonie untersuchte, führte IL-17A zur Ausbildung eines relevanten histologischen Schadens. Vermutlich aufgrund der zuvor erklärten, weiterreichenden- und IL-17C unabhängigen Wirkung [140, 247].

Allerdings kam es bei den Versuchen vorliegender Arbeit zu einer verringerten Anzahl TNF- α -exprimierender Zellen in den immunhistologisch gefärbten Lungenschnitten IL-17RE-defizienter Tiere. TNF- α zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. Es kann als Entzündungsmarker eingesetzt werden und wird bei pulmonalen Erkrankungen vermehrt exprimiert. Seine Überexpression geht wiederum mit inflammatorischen Lungenschäden einher [141]. Es ist bekannt, dass TNF- α auch bei akuten Pneumokokken-Pneumonien zunehmend in der Lunge exprimiert wird [220]. Dabei zeigte sich bereits mehrfach, dass IL-17C die Expression von TNF- α induziert [99, 135, 252, 253]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht geklärt, inwiefern IL-17C die Expression von TNF- α in Zielzellen direkt reguliert oder ob die verminderte Anzahl an TNF- α -exprimierenden Zellen aus einer verminderten Rekrutierung und einem verminderten Überleben von neutrophilen Granulozyten und anderen Entzündungszellen herrührt. Durchflusszytometrische Untersuchungen könnten darüber Aufschluss geben, welche Zellen TNF- α bilden, und ob es sich bei den TNF- α -exprimierenden Zellen um rekrutierte Zellen handelt.

6.1.8 IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die Myelopoese und das Differentialblutbild

Da die Reifung und Freisetzung granulozytärer Zellen aus dem Knochenmark über G-CSF gesteuert wird, galt es zu klären, inwiefern IL-17RE die Differenzierung hämatopoetischer Zellen während der Pneumokokken-Pneumonie beeinflusst. Bisher sind die Effekte, die IL-17C und sein Rezeptor IL-17RE auf die Myelopoese ausüben weitestgehend unbekannt. Das der IL-17-Familie angehörige IL-17A ist dies hingegen besser erforscht. IL-17A scheint sich dabei direkt auf die hämatopoetische Stammzellen

auszuwirken, indem es die Freisetzung von G-CSF durch unterschiedliche Zellen wie Fibroblasten und verschiedenen Lymphozyten-Populationen reguliert [65, 159]. IL-17A führt somit zur einer beschleunigten Granulopoese, Expansion und Stimulation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen [128, 205]. In dem Pneumoniemodell der vorliegenden Arbeit kam es bei IL-17RE-defizienten Tieren nach Infektion lediglich zu einem reduzierten Anteil der GMP's und MPC's in Bezug zu den Kontrollen. Andere Zellreihen blieben im Vergleich zum Wildtyp unbeeinflusst. In Zusammenschau mit den unveränderten Blutneutrophilen-, Monozyten- und Lymphozytenzahlen sowie unveränderten G-CSF Plasmaspiegeln, kann schlussfolgernd angenommen werden, dass die IL-17RE vermittelten Effekte bei akuter *S. pneumoniae*-Infektion lokal in der Lunge zum Tragen kommen. Über die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch G-CSF-Induktion wirkt IL-17RE im pulmonalen Kompartiment ohne systemische Konsequenz.

6.1.9 IL-17 Zytokinexpression

Studien haben gezeigt, dass IL-17C vom Bronchialepithel als Antwort auf gramnegative TLR-Stimulation sezerniert wird [129, 184]. Auch in den Versuchen dieser Arbeit führte die Infektion mit grampositiven *S. pneumoniae* zu einer signifikant gesteigerten frühen mRNA-Expression von IL-17C in der Lunge. Außerdem kam es zu einer signifikant gesteigerten Expression von IL-17A und IL-17D. IL-17A wurde auch in anderen Studien bei *P. aeruginosa* Infektion vermehrt exprimiert [247]. Wie bereits erwähnt, vermittelt IL-17A über die Induktion von Chemokinen die Rekrutierung von Neutrophilen [157]. IL-17D wird bekanntermaßen im Lungengewebe exprimiert. Neutrophilenchemotaktische Effekte sind ebenfalls beschrieben [206, 215]. Womöglich tragen IL-17A und IL-17D in der vorliegenden Studie zusätzlich zur Neutrophilenakkumulation bei. Wie bereits erwähnt, könnte dies den lediglich lokalen Einfluss von IL-17RE erklären. Die Inokulation mit *S. pneumoniae* führte hingegen zu keiner gesteigerten Expression von IL-17B-, IL-17E- oder IL-17F-mRNA. Pfeifer et al. konnten zeigen, dass humane Bronchialepithelzellen nach Bakterienkontakt nicht zur IL-17A, IL-17B, IL-17D oder IL-17E Expression angeregt werden [184]. Auch Ramirez-Carrozzi et al. kamen zum Ergebnis, dass allein IL-17C durch TLR-2 und -5 Stimulation von Epithelzellen induziert wird, während die anderen IL-17-Mitglieder keine Zunahme der Expression erfuhren [186]. In vorliegender Studie kam es zu einer signifikant gesteigerten Expression von IL-17RE mRNA in der Lunge nach Infektion. Diese Hochregulierung des Rezeptors ist wahrscheinlich auf die proinflammatorische Zytokinausschüttung und die Rekrutierung IL-17RE-exprimierender Zellen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass sowohl IL-17RE als auch IL-17RA unter anderem durch IL-6, TNF- α und IL-8 induziert werden [34, 100]. Allesamt Zytokine, die bei Pneumokokken-Pneumonien eine verstärkte Freisetzung erfahren [15, 53].

6.2 Ex vivo Versuche

6.2.1 IL-17C führt bei Pneumokokken-Exposition zu keiner vermehrten Zytokinsekretion durch murine Alveolarmakrophagen

Es ist bekannt, dass Alveolarmakrophagen eine essenzielle Rolle in der pulmonalen Abwehr gegen *S. pneumoniae* einnehmen. Ihre Aufgaben umspannen sowohl die Eliminierung, Rekrutierung anderer Immunzellen als auch die Resolution der Inflammation [23, 50, 88, 119, 124]. In den vorherigen Versuchen wurde deutlich, dass IL-17RE bzw. IL-17C die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Pneumokokken-Pneumonie vermitteln, ohne den Umsatz oder die Erholung von Alveolarmakrophagen zu beeinflussen. Nichtsdestotrotz war nicht auszuschließen, dass deren Funktion durch IL-17C und seinen Rezeptor beeinflusst wird. Durch entsprechende *in vitro* Versuche galt es herauszufinden, ob Alveolarmakrophagen durch IL-17C aktiviert werden. Ein Vorteil dieser Versuche lag dabei in der angewandten Methodik zur Isolation, Kultivierung und Stimulation der Zellen. Diese wurde bereits mehrfach erfolgreich angewandt und stellt ein zuverlässiges Verfahren zur Erforschung der Aktivierung muriner Alveolarmakrophagen dar [246–248, 258]. Bekanntermaßen führen bakterielle Stimuli zur klassischen Aktivierung von Makrophagen [81, 165, 170]. Diese klassische Aktivierung ist durch die Expression proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet. Diesem Spektrum gehören Chemotaktika wie MIP-2 und KC an [90, 101, 147, 165]. In der vorliegenden Arbeit konnten Alveolarmakrophagen, wie zu erwarten, mittels *S. pneumoniae*-Stimulation aktiviert werden. Dies war im Vergleich zu den Kontrollen an der gesteigerten Freisetzung von KC und MIP-2 ersichtlich. Eine alleinige Stimulation durch rekombinantes IL-17C induzierte keine vermehrte Zytokinausschüttung. In der Literatur sind ähnlichen Versuche mit Bronchialepithel- und Lungentumorzellen beschrieben. Hier führte ebenfalls die alleinige Stimulation mittels IL-17C zu keiner vermehrten Zytokinexpression. Erst die Kombination mit einem bakteriellen Ko-Stimulanz erbrachte eine gesteigerte Sekretion [117, 184]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit gleichzeitig mit der Kombination aus IL-17C und Pneumokokken stimuliert. Die Kombination aus Bakterien und IL-17C erzeugte keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinfreisetzung in Bezug auf Zellen, die alleinig *S. pneumoniae* exponiert wurden. Damit kann geschlossen werden, dass IL-17C keine Auswirkung auf die frühe Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch *S. pneumoniae* hat. Diese Erkenntnis wird durch Ergebnisse anderer Studien bekräftigt. Diese konnten aufzeigen, dass der Rezeptor IL-17RE nur marginal auf der Oberfläche mononukleärer Zellen exprimiert wird [186]. Die Arbeitsgruppe von Hardison et al. konnte ähnliche Ergebnisse für IL-17A vorzeigen [86]. In Zusammenschau scheinen die Ergebnisse der *in vivo*- und *ex vivo* Versuche kongruent zu sein. Dort verlief die Sekretion von MIP-2 und KC ebenfalls IL-17RE-unabhängig. Alveolarmakrophagen könnten womöglich die Hauptquelle dieser beiden Zytokine sein. Im Rahmen dessen müssten jedoch weitergehende Untersuchungen angeschlossen werden. Zudem ist bekannt, dass Alveolarmakrophagen nach bakterieller Stimulation zur G-CSF Sekretion imstande sind [222]. Daher wäre es von weiterem Interesse gewesen, die Expression von G-CSF und weiterer Zytokine durch die Alveolarmakrophagen nach Pneumokokken-Exposition zu untersuchen. Schließlich

konnte zuvor gezeigt werden, dass die G-CSF Freisetzung in der Lunge im Rahmen einer Pneumonie von IL-17RE abhängig ist. In Zukunft bedarf es weiterer Experimente, die dieser Fragestellung auf den Grund gehen. Durchflusszytometrische Untersuchungen könnten weiteren Aufschluss geben, welche Zelltypen nach Infektion *in vivo* G-CSF, MIP-2 und KC bilden.

6.2.2 *Il-17re*^{-/-}- und WT-Alveolarmakrophagen phagozytieren gleich effizient

In den vorangegangenen *in vivo* Versuchen zeigte sich, dass IL-17C und IL-17RE kaum Einfluss auf die Klärung von *S. pneumoniae* in der Lunge nahmen. Die Eliminierung dieses Erregers geschieht in der Akutphase einer Pneumonie insbesondere durch Makrophagen [119]. Daher war es von Interesse zu klären, ob Alveolarmakrophagen IL-17RE-defizienter Tiere gleich effizient phagozytieren wie jene, welche aus Wildtyp-Tieren isoliert wurden. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und IL-17RE-defizienten Mäusen detektiert werden. Der Rezeptorstatus scheint deren Funktion somit nicht zu determinieren. Da in der Literatur bisher Uneinigkeit herrscht, ob Makrophagen im Stande sind, IL-17C zu exprimieren, wäre eine Beeinflussung der Phagozytose durch autokrine, IL-17C vermittelte Mechanismen denkbar gewesen [186, 253]. Wolf et al. zeigten jedoch, dass die Stimulation von Alveolarmakrophagen mittels Pseudomonaden keine IL-17C Expression induzierte [247]. Sowohl die Frage nach einer IL-17C Induktion durch Pneumokokken als auch die Beeinflussbarkeit der Phagozytose durch IL-17C müssen in zukünftigen Versuchen geklärt werden. Hierfür wäre beispielsweise ein ähnlicher Versuchsaufbau mit Stimulation durch rekombinantes IL-17C sinnvoll.

6.3 Schlussbemerkung

In dieser Arbeit gelang es erstmalig zu zeigen, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der frühen Phase der *S. pneumoniae*-Pneumonie durch die IL-17C/IL-17RE-Achse vermittelt wird. Dies geschah ohne wesentliche Beeinflussung der Instandhaltung von Makrophagen sowie der Reifung und Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *ex vivo* Aktivierung von Alveolarmakrophagen unabhängig von IL-17C verläuft, und dass deren phagozytotische Effizienz von einer IL-17RE-Defizienz nicht beeinflusst wird. Auch wenn viele Fragen in Bezug auf die pathophysiologische Rolle von IL-17C bei der ambulant erworbenen Pneumonie ungeklärt bleiben, kann diese Arbeit als Grundlage für weitere Studien auf diesem Gebiet betrachtet werden und eröffnet ein breites Spektrum an möglichen Forschungsansätzen. Diese Erkenntnisse sollten daher durch weitere Untersuchungen belegt und erweitert werden. Es gilt unter anderem in zukünftigen Experimenten zu klären, über welche weiteren molekularen und zellulären Mechanismen IL-17RE zur Wirtsabwehr gegenüber Pneumokokken-Infektionen der tiefen Atemwege beiträgt. Die hier untersuchten Zytokine stellen nur ein schmales Spektrum an Mediatoren der angeborenen Immunabwehr dar. Es wäre deshalb sinnvoll, ein breiteres Feld an Botenstoffen zu erfassen. Außerdem sollte der Einfluss von IL-17RE auf die Th17 Differenzierung untersucht werden. Die IL-17C/IL-17RE-Achse könnte hierüber Einfluss auf die Ausbildung einer adäquaten, adaptiven Immunantwort bei einer *S. pneumoniae* Infektion nehmen. Darüber hinaus sollten in Langzeitexperimenten die Auswirkungen der von IL-17C herbeigeführten pulmonalen Neutrophilie und deren pathogene Wirkungen auf umliegende Strukturen erforscht werden. Bei der Bestimmung der pulmonalen Integrität sind hier neben histologischen Bewertungen sensitivere Methoden wie die Messung des Übertritts von Evans Blue in Lungenparenchym zu nutzen. Ergänzend wäre es von Interesse, die Wirkung von IL-17C auf Neutrophile und deren phagozytotische Eigenschaften sowie deren Überleben zu erforschen. Auch in Bezug auf den verwendeten Pneumokokken-Stamm bietet es sich an, das Augenmerk auf mehrere Kapseltypen und insbesondere humanpathogene Stämme zu legen, da sich gezeigt hat, dass die Immunabwehr von Stamm zu Stamm variieren kann. Ein genaueres Verständnis der IL-17C/IL-17RE-Achse bei Lungeninfektionen kann die Grundlage für potenziell klinisch relevante Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der schweren ambulant erworbenen Pneumonie bilden, welche auch heutzutage mit einer hohen Sterblichkeit einhergeht. Idealerweise würde hierbei die überschießende Neutrophilenantwort abgedämpft werden, ohne die Eliminierung des Pathogens zu limitieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Abeyta M, Hardy GG, Yother J(2003). Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 71(1):218–25.
2. Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL(2000). G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *European Respiratory Journal*; 15(5):895.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O(2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*; 124(4):783–801.
4. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H et al.(2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol*; 9(3):633–44.
5. Alexander JE, Lock RA, Peeters CC, Poolman JT, Andrew PW, Mitchell TJ et al.(1994). Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 62(12):5683–8.
6. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America(2005). Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*; 171(4):388–416.
7. Angus DC, Marrie TJ, Obrosky DS, Clermont G, Dremsizov TT, Coley C et al.(2002). Severe community-acquired pneumonia: use of intensive care services and evaluation of American and British Thoracic Society Diagnostic criteria. *Am J Respir Crit Care Med*; 166(5):717–23.
8. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ(1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun*; 28(3):893–8.
9. Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K et al.(2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med*; 200(2):267–72.
10. AUSTRIAN R, MacLEOD CM(1949). A type-specific protein from pneumococcus. *J Exp Med*; 89(4):439–50.
11. Avery OT, Morgan HJ(1925). IMMUNOLOGICAL REACTIONS OF THE ISOLATED CARBOHYDRATE AND PROTEIN OF PNEUMOCOCCUS. *J Exp Med*; 42(3):347–53.
12. Babaloo Z, Yeganeh RK, Farhoodi M, Baradaran B, Bonyadi M, Aghebati L(2013). Increased IL-17A but decreased IL-27 serum levels in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol*; 10(1):47–54.
13. Balamayooran G, Batra S, Theivanthiran B, Cai S, Pacher P, Jeyaseelan S(2012). Intrapulmonary G-CSF rescues neutrophil recruitment to the lung and neutrophil release to blood in Gram-negative bacterial infection in MCP-1^{-/-} mice. *J Immunol*; 189(12):5849–59.
14. Bartlett JG, Mundy LM(1995). Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*; 333(24):1618–

- 24.
15. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG(1998). Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun*; 66(3):912–22.
16. Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC(1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 57(8):2324–30.
17. Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC(1989). Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 57(7):2037–42.
18. Bhakdi S, Roth M, Sziegleit A, Tranum-Jensen J(1984). Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O. *Infect Immun*; 46(2):394–400.
19. Bhakdi S, Tranum-Jensen J(1986). Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microbial Pathogenesis*; 1(1):5–14.
20. Blauvelt A, Chiricozzi A(2018). The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol*; 55(3):379–90.
21. Bogaert D, Groot R de, Hermans PWM(2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*; 4(3):144–54.
22. Bonilla FA, Oettgen HC(2010). Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*; 125(2 Suppl 2):S33-40.
23. Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P et al.(2013). Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *International Journal of Infectious Diseases*; 17(2):e76-e83.
24. Bou Ghanem EN, Clark S, Roggensack SE, McIver SR, Alcaide P, Haydon PG et al.(2015). Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog*; 11(8):e1005126.
25. Bozic CR, Kolakowski LF, Gerard NP, Garcia-Rodriguez C, Uexkull-Guldenband C von, Conklyn MJ et al.(1995). Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *The Journal of Immunology*; 154(11):6048.
26. Briles DE, Yother J, McDaniel LS(1988). Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis*; 10 Suppl 2:S372-4.
27. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR 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*; 99(26):16969.
28. Butcher MJ, Waseem TC, Galkina EV(2016). Smooth Muscle Cell-Derived Interleukin-17C Plays an Atherogenic Role via the Recruitment of Proinflammatory Interleukin-17A+ T Cells to the Aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 36(8):1496–506.
29. Camberlein E, Cohen JM, José R, Hyams CJ, Callard R, Chimalapati S et al.(2015). Importance

- of bacterial replication and alveolar macrophage-independent clearance mechanisms during early lung infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 83(3):1181–9.
30. Cassatella MA(1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today*; 16(1):21–6.
 31. Centers for Disease Control and Prevention(2012). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 61(40):816–9.
 32. Chabaud M, Page G, Miossec P(2001). Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol*; 167(10):6015–20.
 33. Chang SH, Dong C(2009). IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*; 46(1):7–11.
 34. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C(2011). Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity*; 35(4):611–21.
 35. Chen GY, Nuñez G(2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*; 10(12):826–37.
 36. Chen K, Eddens T, Trevejo-Nunez G, Way EE, Elsegeiny W, Ricks DM et al.(2016). IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against *K. pneumoniae*. *Cell Host Microbe*; 20(5):596–605.
 37. Chetty C, Kreger A(1981). Role of autolysin in generating the pneumococcal purpura-producing principle. *Infect Immun*; 31(1):339–44.
 38. Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S(2008). Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev*; 21(4):666–85.
 39. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T et al.(2018). Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell Mol Life Sci*; 75(8):1363–76.
 40. Chipman DM, Pollock JJ, Sharon N(1968). Lysozyme-catalyzed hydrolysis and transglycosylation reactions of bacterial cell wall oligosaccharides. *J Biol Chem*; 243(3):487–96.
 41. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I et al.(2011). Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*; 131(3):677–87.
 42. Cleveland RF, Holtje JV, Wicken AJ, Tomasz A, Daneo-Moore L, Shockman GD(1975). Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. *Biochem Biophys Res Commun*; 67(3):1128–35.
 43. Colebatch HJH, Ng CKY(1992). Estimating alveolar surface area during life. *Respiration Physiology*; 88(1):163–70.

44. Cox G, Crossley J, Xing Z(1995). Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 12(2):232–7.
45. Cox G, Gauldie J, Jordana M(1992). Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 7(5):507–13.
46. Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S(2009). Neutrophil Recruitment to the Lungs during Bacterial Pneumonia. *Infect Immun*; 77(2):568.
47. Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Højberg B et al.(1999). Neutralization of Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) and MIP-1 α Attenuates Neutrophil Recruitment in the Central Nervous System during Experimental Bacterial Meningitis. *Infect Immun*; 67(5):2590.
48. Dietert K, Gutbier B, Wienhold SM, Reppe K, Jiang X, Yao L et al.(2017). Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. *PLoS One*; 12(11):e0188251.
49. Dinarello CA(2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*; 118(2):503–8.
50. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG et al.(2003). Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol*; 171(10):5380–8.
51. Drijkoningen JJC, Rohde GGU(2014). Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clin Microbiol Infect*; 20 Suppl 5:45–51.
52. Driscoll KE(2000). TNF α and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett*; 112-113:177–83.
53. Endeman H, Meijvis SCA, Rijkers GT, van Velzen-Blad H, van Moorsel, C H M, Grutters JC et al.(2011). Systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*; 37(6):1431–8.
54. Ewig S, Hrsg. (2016). *Ambulant erworbene Pneumonie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
55. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y(1997). Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis*; 175(6):1440–5.
56. Fein AM(1999). Pneumonia in the Elderly: Overview of Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Clinical Infectious Diseases*; 28(4):726–9.
57. Feldman C, Munro NC, Jeffery PK, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ et al.(1991). Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 5(5):416–23.
58. Fels AO, Cohn ZA(1986). The alveolar macrophage. *J Appl Physiol* (1985); 60(2):353–69.
59. Ferrante A, Rowan-Kelly B, Paton JC(1984). Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun*; 46(2):585–9.
60. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galán JE et al.(2006). Involvement of

- Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 103(33):12487.
61. Filippo K de, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N(2008). Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*; 180(6):4308.
 62. Fillion I, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Sato S, Bergeron MG(2001). Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte/macrophage recruitment. *J Immunol*; 166(12):7353–61.
 63. Fischer H, Tomasz A(1985). Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*; 163(1):46–54.
 64. Flannigan KL, Ngo VL, Geem D, Harusato A, Hirota SA, Parkos CA et al.(2017). IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol*; 10(3):673–84.
 65. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C et al.(1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*; 183(6):2593–603.
 66. Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, Steinmüller C, Lohmann-Matthes ML, Kobzik L(1996). Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol*; 157(7):3097–104.
 67. Franzke A(2006). The role of G-CSF in adaptive immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*; 17(4):235–44.
 68. Freeman BD, Quezado Z, Zeni F, Natanson C, Danner RL, Banks S et al.(1997). rG-CSF reduces endotoxemia and improves survival during *E. coli* pneumonia. *Journal of Applied Physiology*; 83(5):1467–75.
 69. Frevert CW, Huang S, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L(1995). Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *The Journal of Immunology*; 154(1):335.
 70. Fry AM, Shay DK, Holman RC, Curns AT, Anderson LJ(2005). Trends in hospitalizations for pneumonia among persons aged 65 years or older in the United States, 1988-2002. *JAMA*; 294(21):2712–9.
 71. Gaffen SL(2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*; 9(8):556–67.
 72. García-Suárez MdM, Cima-Cabal MD, Flórez N, García P, Cernuda-Cernuda R, Astudillo A et al.(2004). Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun*; 72(8):4534–40.
 73. Garibaldi RA(1985). Epidemiology of community-acquired respiratory tract infections in adults. Incidence, etiology, and impact. *Am J Med*; 78(6B):32–7.
 74. Garvy BA, Harmsen AG(1996). The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal

- pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation*; 20(5):499–512.
75. Gatermann S, Miksits K(2009). Streptokokken. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. S. 203–21.
 76. Geha M, Tsokos MG, Bosse RE, Sannikova T, Iwakura Y, Dalle Lucca JJ et al.(2017). IL-17A Produced by Innate Lymphoid Cells Is Essential for Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol*; 199(8):2921–9.
 77. Gordon SB, Irving GR, Lawson RA, Lee ME, Read RC(2000). Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun*; 68(4):2286–93.
 78. Gotfried M, Freeman C(2000). An update on community-acquired pneumonia in adults. *Comprehensive Therapy*; 26(4):283–93.
 79. Gregory AD, Hogue LA, Ferkol TW, Link DC(2007). Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Blood*; 109(8):3235–43.
 80. Grommes J, Soehnlein O(2011). Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*; 17(3-4):293–307.
 81. Gutierrez P, Closa D, Piñer R, Bulbena O, Menéndez R, Torres A(2010). Macrophage activation in exacerbated COPD with and without community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*; 36(2):285–91.
 82. Haczku A(2008). Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*; 122(5):861-79; quiz 880-1.
 83. Håkansson A, Roche H, Mirza S, McDaniel LS, Brooks-Walter A, Briles DE(2001). Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infect Immun*; 69(5):3372–81.
 84. Hallek M, Re D, Wolf J(2007). Grundlagen der Hämatopoese. In: Schölmerich J, Hrsg. *Medizinische Therapie 2007 | 2008*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. S. 304–7.
 85. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD et al.(2008). IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *J Immunol*; 181(5):3456–63.
 86. Hardison SE, Wozniak KL, Kolls JK, Wormley FL, JR(2010). Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*; 78(12):5341–51.
 87. Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B et al.(1998). Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*; 274(6):L958-L969.
 88. Haslett C(1999). Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*; 160(5 Pt 2):S5-11.

89. Henrichsen J(1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*; 33(10):2759–62.
90. Herbert C, Scott MM, Scruton KH, Keogh RP, Yuan KC, Hsu K et al.(2010). Alveolar macrophages stimulate enhanced cytokine production by pulmonary CD4⁺ T-lymphocytes in an exacerbation of murine chronic asthma. *Am J Pathol*; 177(4):1657–64.
91. Herbold W, Maus R, Hahn I, Ding N, Srivastava M, Christman JW et al.(2010). Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. *Infect Immun*; 78(6):2620–30.
92. Hierholzer C, Kelly E, Lyons V, Roedling E, Davies P, Billiar TR et al.(1998). G-CSF instillation into rat lungs mediates neutrophil recruitment, pulmonary edema, and hypoxia. *J Leukoc Biol*; 63(2):169–74.
93. Hippenstiel S, Witzenrath M, Opitz B, Schütte H, Rosseau S, Suttorp N(2007). New aspects of the pathophysiology of pneumonia. *Internist (Berl)*; 48(5):459–67.
94. Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL et al.(2001). The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Molecular Microbiology*; 41(6):1395–408.
95. Höltje JV, Tomasz A(1976). Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J Biol Chem*; 251(14):4199–207.
96. Höltje JV, Tomasz A(1975). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 72(5):1690–4.
97. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M(2016). Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta*; 457:46–53.
98. Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ(1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun*; 62(4):1501–3.
99. Huang J, Meng S, Hong S, Lin X, Jin W, Dong C(2016). IL-17C is required for lethal inflammation during systemic fungal infection. *Cell Mol Immunol*; 13(4):474–83.
100. Huang Q, Du J, Fan J, Lv Z, Qian X, Zhang X et al.(2014). The effect of proinflammatory cytokines on IL-17RA expression in NSCLC. *Medical Oncology*; 31(9):144.
101. Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L(1992). Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol*; 141(4):981–8.
102. Hummell DS, Swift AJ, Tomasz A, Winkelstein JA(1985). Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal lipoteichoic acid. *Infect Immun*; 47(2):384.
103. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S et al.(2002). New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol*; 169(1):443–53.
104. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P et al.(2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor

- binding. *EMBO J*; 20(19):5332–41.
105. Iida N, Grotendorst GR(1990). Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol*; 10(10):5596–9.
106. Imöhl M, van der Linden M(2014). Invasive Pneumokokken-Erkrankungen in Deutschland im Zeitalter der Pneumokokken-Konjugat-Impfung. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*; 139:1346–51.
107. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H(2008). The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev*; 226:57–79.
108. Iwasaki H, Akashi K(2007). Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*; 26(6):726–40.
109. Jamieson KC, Traves SL, Kooi C, Wiehler S, Dumonceaux CJ, Maciejewski BA et al.(2019). Rhinovirus and Bacteria Synergistically Induce IL-17C Release from Human Airway Epithelial Cells To Promote Neutrophil Recruitment. *The Journal of Immunology*; 202(1):160.
110. Jamieson KC, Wiehler S, Michi AN, Proud D(2020). Rhinovirus Induces Basolateral Release of IL-17C in Highly Differentiated Airway Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*; 10:103.
111. Jeong D-G, Jeong E-S, Seo J-H, Heo S-H, Choi Y-K(2011). Difference in Resistance to *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. *Lab Anim Res*; 27(2):91–8.
112. Johnson MK(1977). Cellular location of pneumolysin. *FEMS Microbiology Letters*; 2(5):243–5.
113. Johnson MK, Boese-Marrazzo D, Pierce WA, JR(1981). Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and platelets. *Infect Immun*; 34(1):171–6.
114. Johnston A, Fritz Y, Dawes SM, Diaconu D, Al-Attar PM, Guzman AM et al.(2013). Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J Immunol*; 190(5):2252–62.
115. José RJ, Williams AE, Mercer PF, Sulikowski MG, Brown JS, Chambers RC(2015). Regulation of neutrophilic inflammation by proteinase-activated receptor 1 during bacterial pulmonary infection. *J Immunol*; 194(12):6024–34.
116. Jounblat R, Clark H, Eggleton P, Hawgood S, Andrew PW, Kadioglu A(2005). The role of surfactant protein D in the colonisation of the respiratory tract and onset of bacteraemia during pneumococcal pneumonia. *Respir Res*; 6(1):126.
117. Jungnickel C, Schmidt LH, Bittigkoffer L, Wolf L, Wolf A, Ritzmann F et al.(2017). IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth. *Oncogene*; 36(29):4182–90.
118. Kadioglu A, Coward W, Colston MJ, Hewitt CRA, Andrew PW(2004). CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun*; 72(5):2689–97.
119. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, Kerr A, Mitchell TJ, Andrew PW(2000). Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun*; 68(2):492–501.
120. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW(2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*;

- 6(4):288–301.
121. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V(2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol*; 15:118–46.
122. Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE(1979). Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun*; 26(1):143–9.
123. Knapp S, Hareng L, Rijneveld AW, Bresser P, van der Zee, Jaring S., Florquin S et al.(2004). Activation of Neutrophils and Inhibition of the Proinflammatory Cytokine Response by Endogenous Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Murine Pneumococcal Pneumonia. *J Infect Dis*; 189(8):1506–14.
124. Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J et al.(2003). Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*; 167(2):171–9.
125. Kolls JK, Lindén A(2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*; 21(4):467–76.
126. Koyama S, Sato E, Masubuchi T, Takamizawa A, Kubo K, Nagai S et al.(1998). Alveolar type II-like cells release G-CSF as neutrophil chemotactic activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*; 275(4):L687-L693.
127. Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V(1988). Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85(16):6157–61.
128. Krstić A, Santibanez JF, Okić I, Mojsilović S, Kocić J, Jovčić G et al.(2010). Combined effect of IL-17 and blockade of nitric oxide biosynthesis on haematopoiesis in mice. *Acta Physiol (Oxf)*; 199(1):31–41.
129. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N et al.(2014). Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 50(1):30–9.
130. Lambrecht BN(2006). Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*; 24(4):366–8.
131. Lanie JA, Ng W-L, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ et al.(2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol*; 189(1):38–51.
132. Lauffer F, Jargosch M, Baghin V, Krause L, Kempf W, Absmaier-Kijak M et al.(2020). IL-17C amplifies epithelial inflammation in human psoriasis and atopic eczema. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; 34(4):800–9.
133. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C et al.(2009). RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology*; 136(1):257–67.
134. Levine H, Balicer RD, Zarka S, Sela T, Rozhavski V, Cohen D et al.(2012). Dynamics of

- pneumococcal acquisition and carriage in young adults during training in confined settings in Israel. *PLoS One*; 7(10):e46491.
135. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J et al.(2000). Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(2):773–8.
136. Li Y, Weinberger DM, Thompson CM, Trzeciński K, Lipsitch M, Pirofski L(2013). Surface Charge of *Streptococcus pneumoniae* Predicts Serotype Distribution. *Infect Immun*; 81(12):4519.
137. Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M et al.(2007). An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol*; 179(11):7791–9.
138. Lock RA, Paton JC, Hansman D(1988). Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*; 4(1):33–43.
139. Loppnow H(2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist*; 42(1):13–27.
140. Lorè NI, Cigana C, Riva C, Fino I de, Nonis A, Spagnuolo L et al.(2016). IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*; 6:25937.
141. Lundblad LKA, Thompson-Figueroa J, Leclair T, Sullivan MJ, Poynter ME, Irvin CG et al.(2005). Tumor necrosis factor- α overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*; 171(12):1363–70.
142. Magee AD, Yother J(2001). Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 69(6):3755–61.
143. Male CJ(1979). Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 26(1):254–61.
144. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM et al.(2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100(4):1966–71.
145. Mammoto A, Mammoto T, Kanapathipillai M, Wing Yung C, Jiang E, Jiang A et al.(2013). Control of lung vascular permeability and endotoxin-induced pulmonary oedema by changes in extracellular matrix mechanics. *Nature Communications*; 4(1):1759.
146. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC et al.(2007). Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*; 44 Suppl 2(Suppl 2):S27-72.
147. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M(2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*; 25(12):677–86.
148. Marra A, Brigham D(2001). *Streptococcus pneumoniae* causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a nonhematogenous route. *Infect Immun*; 69(12):7318–

- 25.
149. Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH(2008). Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med*; 8(6):497–509.
150. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL(2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*; 14(2):49.
151. MASON RJ(2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology*; 11(s1):S12-S15.
152. Masson PL, Heremans JF, Prignot JJ, Wauters G(1966). Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus. *Thorax*; 21(6):538–44.
153. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F2, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M et al.(1997). Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*; 156(6):1969–77.
154. Maus UA, Janzen S, Wall G, Srivastava M, Blackwell TS, Christman JW et al.(2006). Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 35(2):227–35.
155. McCarthy MK, Zhu L, Procaro MC, Weinberg JB(2014). IL-17 contributes to neutrophil recruitment but not to control of viral replication during acute mouse adenovirus type 1 respiratory infection. *Virology*; 456-457:259–67.
156. McDaniel LS, Yother J, Vijayakumar M, McGarry L, Guild WR, Briles DE(1987). Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J Exp Med*; 165(2):381–94.
157. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL(2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*; 50(4):892–906.
158. McIsaac SM, Stadnyk AW, Lin T-J(2012). Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J Leukoc Biol*; 92(5):977–85.
159. Mei J, Liu Y, Dai N, Hoffmann C, Hudock KM, Zhang P et al.(2012). Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest*; 122(3):974–86.
160. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins NK, Duffy LB, Ziegler T et al.(2004). Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*; 113(4):701–7.
161. Mindt BC, Fritz JH, Duerr CU(2018). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Pulmonary Immunity and Tissue Homeostasis. *Front Immunol*; 9:840.
162. Mitroulis I, Kalafati L, Hajishengallis G, Chavakis T(2018). Myelopoiesis in the Context of Innate Immunity. *J Innate Immun*; 10(5-6):365–72.
163. Mizgerd JP(2006). Lung infection--a public health priority. *PLoS Med*; 3(2):e76.
164. Mold C, Du Clos TW(2006). C-reactive protein increases cytokine responses to *Streptococcus pneumoniae* through interactions with Fc gamma receptors. *J Immunol*; 176(12):7598–604.
165. Mosser DM(2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*; 73(2):209–12.
166. Mosser JL, Tomasz A(1970). Choline-containing teichoic acid as a structural component of

- pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem*; 245(2):287–98.
167. Mould KJ, Jackson ND, Henson PM, Seibold M, Janssen WJ(2019). Single cell RNA sequencing identifies unique inflammatory airspace macrophage subsets. *JCI Insight*; 4(5).
168. Muller-Eberhard HJ(1986). The Membrane Attack Complex of Complement. *Annual Review of Immunology*; 4(1):503–28.
169. Musher DM(1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis*; 14(4):801–7.
170. Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA(2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 99(3):1503.
171. Olfert ED, Godson DL(2000). Humane endpoints for infectious disease animal models. *ILAR J*; 41(2):99–104.
172. Opal SM, DePalo VA(2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*; 117(4):1162–72.
173. Opitz B, Püschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S et al.(2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*; 279(35):36426–32.
174. O'Toole RD, Goode L, Howe C(1971). Neuraminidase activity in bacterial meningitis. *J Clin Invest*; 50(5):979–85.
175. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A(2011). The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology*; 134(1):8–16.
176. Pappu R, Rutz S, Ouyang W(2012). Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol*; 33(7):343–9.
177. Parker D, Prince A(2011). Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 45(2):189–201.
178. Paterson GK, Orihuela CJ(2010). Pneumococci: immunology of the innate host response. *Respirology*; 15(7):1057–63.
179. Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ(1993). MOLECULAR ANALYSIS OF THE PATHOGENICITY OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: The Role of Pneumococcal Proteins. *Annual Review of Microbiology*; 47(1):89–115.
180. Paton JC, Ferrante A(1983). Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun*; 41(3):1212–6.
181. Paton JC, Rowan-Kelly B, Ferrante A(1984). Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun*; 43(3):1085–7.
182. Pechous RD(2017). With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol*; 7:160.
183. Pfaffl MW(2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*; 29(9):e45.

184. Pfeifer P, Voss M, Wonnemberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM et al.(2013). IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 48(4):415–21.
185. Plaut AG, Wistar R, JR, Capra JD(1974). Differential susceptibility of human IgA immunoglobulins to streptococcal IgA protease. *J Clin Invest*; 54(6):1295–300.
186. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J et al.(2011). IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol*; 12(12):1159–66.
187. Reppe K, Radünzel P, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S et al.(2015). Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. *Infect Immun*; 83(12):4617–29.
188. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C(2010). IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*; 21(6):413–23.
189. Reynolds JM, Lee Y-H, Shi Y, Wang X, Angkasekwinai P, Nallaparaju KC et al.(2015). Interleukin-17B Antagonizes Interleukin-25-Mediated Mucosal Inflammation. *Immunity*; 42(4):692–703.
190. Richards L, Ferreira DM, Miyaji EN, Andrew PW, Kadioglu A(2010). The immunising effect of pneumococcal nasopharyngeal colonisation; protection against future colonisation and fatal invasive disease. *Immunobiology*; 215(4):251–63.
191. Ritchie ND, Ritchie R, Bayes HK, Mitchell TJ, Evans TJ(2018). IL-17 can be protective or deleterious in murine pneumococcal pneumonia. *PLoS Pathog*; 14(5):e1007099.
192. Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, Kamyschnikow A, Herr C, Li D et al.(2019). IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer. *Scientific Reports*; 9(1):10353.
193. Roberts AW(2005). G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*; 23(1):33–41.
194. Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M(1991). Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis*; 163(3):579–83.
195. Rubins JB, Duane PG, Charboneau D, Janoff EN(1992). Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infect Immun*; 60(5):1740–6.
196. Rubins JB, Duane PG, Clawson D, Charboneau D, Young J, Niewoehner DE(1993). Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun*; 61(4):1352–8.
197. Rubins JB, Pomeroy C(1997). Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. *Infect Immun*; 65(7):2975–7.
198. S. Ewig, G. Höffken, W. V. Kern, G. Rohde, H. Flick, R. Krause, S. Ott, T. Bauer, K. Dalhoff, S. Gatermann, M. Kolditz, S. Krüger, J. Lorenz, M. Pletz, A. de Roux, B. Schaaf, T. Schaberg, H. Schütte, T. Welte. S3-Leitlinie Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener

- Pneumonie und Prävention – Update 2016; Version 25.02.2016.
199. Saddawi-Konefka R, Seelige R, Gross ETE, Levy E, Searles SC, Washington A, JR et al.(2016). Nrf2 Induces IL-17D to Mediate Tumor and Virus Surveillance. *Cell Rep*; 16(9):2348–58.
200. Sanders AJ, Guo X, Mason MD, Jiang WG, Dudek A(2010). IL-17B Can Impact on Endothelial Cellular Traits Linked to Tumour Angiogenesis. *Journal of Oncology*; 2010:817375.
201. Sarma JV, Ward PA(2011). The complement system. *Cell Tissue Res*; 343(1):227–35.
202. Schlesinger RB(1982). Defense Mechanisms of The Respiratory System. *BioScience*; 32(1):45–50.
203. Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U 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. *J Biol Chem*; 278(18):15587–94.
204. Schultz MJ, van Deventer, S. J. H., van der Poll T. The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Pneumonia. In: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine 1998*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998. S. 56–64.
205. Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A et al.(1998). IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol*; 161(11):6383–9.
206. Seelige R, Saddawi-Konefka R, Adams NM, Picarda G, Sun JC, Benedict CA et al.(2018). Interleukin-17D and Nrf2 mediate initial innate immune cell recruitment and restrict MCMV infection. *Scientific Reports*; 8(1):13670.
207. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, JR, Briles DE(2004). PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin corrected. *Infect Immun*; 72(9):5031–40.
208. Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M(1999). Expression of IL-17 in human memory CD45RO⁺ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine*; 11(4):257–66.
209. Skov Sørensen UB, Blom J, Birch-Andersen A, Henrichsen J(1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun*; 56(8):1890–6.
210. Smith E, Stark MA, Zarbock A, Burcin TL, Bruce AC, Vaswani D et al.(2008). IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "short-loop" inhibition via IL-17 receptor. *J Immunol*; 181(2):1357–64.
211. Song JY, Nahm MH, Moseley MA(2013). Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *J Korean Med Sci*; 28(1):4–15.
212. Song X, Qian Y(2013). IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cell Signal*; 25(12):2335–47.

213. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD et al.(2011). IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol*; 12(12):1151–8.
214. Sørensen UBS, Henrichsen J, Chen H-C, Szu SC(1990). Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microbial Pathogenesis*; 8(5):325–34.
215. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R(2002). Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol*; 169(2):642–6.
216. Stimler NP, Hugli TE, Bloor CM(1980). Pulmonary injury induced by C3a and C5a anaphylatoxins. *Am J Pathol*; 100(2):327–48.
217. Strieter RM, Kunkel SL(1994). Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J Investig Med*; 42(4):640–51.
218. Stuckey-Schrock K, Hayes BL, George CM(2012). Community-acquired pneumonia in children. *Am Fam Physician*; 86(7):661–7.
219. Suresh MV, Singh SK, Ferguson DA, JR, Agrawal A(2006). Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection. *J Immunol*; 176(7):4369–74.
220. Takashima K, Tateda K, Matsumoto T, Iizawa Y, Nakao M, Yamaguchi K(1997). Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun*; 65(1):257–60.
221. Tan SYS, Krasnow MA(2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development*; 143(8):1318–27.
222. Tazi A, Nioche S, Chastre J, Smiéjan JM, Hance AJ(1991). Spontaneous release of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) by alveolar macrophages in the course of bacterial pneumonia and sarcoidosis: endotoxin-dependent and endotoxin-independent G-CSF release by cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 4(2):140–7.
223. Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL(2010). Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun*; 16(3):151–9.
224. Tomasz A, Waks S(1975). Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 72(10):4162–6.
225. Torres JM, Cardenas O, Vasquez A, Schlossberg D(1998). *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in a community hospital. *Chest*; 113(2):387–90.
226. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J et al.(2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol*; 177(1):36–9.
227. Trammell RA, Toth LA(2011). Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research. *Comp Med*; 61(6):492–8.
228. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ(1999). Pneumococcal surface protein A

- inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 67(9):4720–4.
229. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A(1985). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis*; 151(5):859–68.
230. Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S(1994). Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med*; 180(3):1159–64.
231. van der Poll T, Opal SM(2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*; 374(9700):1543–56.
232. van oud Alblas, A B, van Furth R(1979). Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med*; 149(6):1504–18.
233. Wang JM, Chen ZG, Colella S, Bonilla MA, Welte K, Bordignon C et al.(1988). Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony- stimulating factor. *Blood*; 72(5):1456–60.
234. Wang W, Zhou A, Zhang X, Xiang Y, Huang Y, Wang L et al.(2014). Interleukin 17A Promotes Pneumococcal Clearance by Recruiting Neutrophils and Inducing Apoptosis through a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism in Acute Otitis Media. *Infect Immun*; 82(6):2368.
235. Wani JH, Gilbert JV, Plaut AG, Weiser JN(1996). Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 64(10):3967–74.
236. Watson DA, Musher DM(1990). Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun*; 58(9):3135–8.
237. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J(1993). A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis*; 17(5):913–24.
238. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC(2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*; 16(6):355–67.
239. Welte T, Torres A, Nathwani D(2012). Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*; 67(1):71–9.
240. Weltgesundheitsorganisation(2008). The global burden of disease: 2004 update. Geneva.
241. Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, Subramanian M, Cohen TS, Prince AS et al.(2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*; 506(7489):503–6.
242. Winkelstein JA, Abramovitz AS, Tomasz A(1980). Activation of C3 via the alternative complement pathway results in fixation of C3b to the pneumococcal cell wall. *J Immunol*; 124(5):2502–6.
243. Winkelstein JA, Tomasz A(1978). Activation of the Alternative Complement Pathway by Pneumococcal Cell Wall Teichoic Acid. *The Journal of Immunology*; 120(1):174.
244. Winter C, Taut K, Länger F, Mack M, Briles DE, Paton JC et al.(2007). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand Aggravates the Lung Inflammatory Response to *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice: Role of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*; 179(5):3099.
245. Witzernath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K et al.(2006). Role of

- pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med*; 34(7):1947–54.
246. Wolf L, Herr C, Niederstraßer J, Beisswenger C, Bals R(2017). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) maintains pulmonary structure and regulates the response to cigarette smoke. *PLOS ONE*; 12(7):e0180092.
247. Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M et al.(2016). IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 311(5):L1015-L1022.
248. Wonnenberg B, Tschernig T, Voss M, Bischoff M, Meier C, Schirmer SH et al.(2014). Probenecid reduces infection and inflammation in acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Int J Med Microbiol*; 304(5-6):725–9.
249. Woodhead M(2002). Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur Respir J Suppl*; 36:20s-27s.
250. Wootton D, Aston S, Gordon S(2014). The Pathophysiology of pneumococcal pneumonia. In: *European Respiratory Monograph*. S. 42–63.
251. Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ et al.(2008). The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol*; 181(4):2799–805.
252. Yamaguchi S, Nambu A, Numata T, Yoshizaki T, Narushima S, Shimura E et al.(2018). The roles of IL-17C in T cell-dependent and -independent inflammatory diseases. *Scientific Reports*; 8(1):15750.
253. Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K et al.(2007). IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol*; 179(10):7128–36.
254. Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR et al.(2001). Interleukin-17 and Lung Host Defense against *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 25(3):335–40.
255. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P et al.(2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*; 194(4):519–27.
256. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Ohnishi Y, Matsumoto I, Ito S et al.(2008). Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int J Mol Med*; 22(3):369–74.
257. Yuste J, Botto M, Bottoms SE, Brown JS(2007). Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*; 3(9):1208–19.
258. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM(2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*; Chapter 14:Unit 14.1.

259. Ziebold C, Kries R von, Siedler A, Schmitt HJ (2000). Epidemiology of pneumococcal disease in children in Germany. *Acta Paediatr Suppl*; 89(435):17–21.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese der Pneumokokken-Erkrankungen	S. 15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	S. 16
Abbildung 3: Übersicht der IL-17 Zytokinfamilie, deren Rezeptoren und durch IL-17C induzierte Signalwege	S. 28
Abbildung 4: Die Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> führt zu einem Verlust an Körpergewicht	S. 42
Abbildung 5: Die Gesamtanzahl der Entzündungszellen in der BALF ist nach Infektion bei <i>Il-17re^{-/-}</i> -Mäusen vermindert	S. 43
Abbildung 6: IL-17RE vermittelt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge	S. 45
Abbildung 7: Die Defizienz für IL-17RE hat nur geringen Einfluss auf die Eliminierung von <i>S. pneumoniae</i>	S. 46
Abbildung 8: IL-17RE reguliert die Bildung von G-CSF	S. 48
Abbildung 9: Die Anzahl TNF- α positiver Zellen ist in <i>Il-17re^{-/-}</i> -Mäusen vermindert	S. 49
Abbildung 10: Die Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> führt zu einem Infiltrat der Lunge	S. 50
Abbildung 11: Die Defizienz für IL-17RE führt zu einer verminderten Anzahl TNF- α positiver Zellen in der Lunge	S. 51
Abbildung 12: Die Defizienz für IL-17RE hat keinen Einfluss auf die Leukozyten im Blut nach Infektion	S. 52
Abbildung 13: Die Gesamtanzahl der Entzündungszellen in der BALF ist nach Infektion bei <i>Il-17C^{-/-}</i> -Mäusen vermindert	S. 53
Abbildung 14: IL-17C vermittelt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge	S. 54
Abbildung 15: Die Defizienz für IL-17C hat nur einen geringen Einfluss auf die Eliminierung von <i>S. pneumoniae</i>	S. 55
Abbildung 16: Relativer Anteil der leukozytären Vorläuferzellen an <i>lineage</i> -negativen Zellen des Knochenmarks	S. 56
Abbildung 17: Relative Expression von Il-17A, IL-17C, IL-17D und IL-17RE	S. 57
Abbildung 18: Freisetzung der Zytokine MIP-2 und KC aus Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit <i>S. pneumoniae</i> und IL-17C	S. 59
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytoserate von <i>Il-17re^{-/-}</i> - und WT-Alveolarmakrophagen	S. 60

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verwendete Geräte	S. 30
Tabelle 2: Übersicht verwendete Software	S. 31
Tabelle 3: Übersicht verwendete Lösungen und Materialien	S. 32
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper	S. 37
Tabelle 5: Auflistung der Gene und dazugehörigen Primersequenzen, welche mittels qRT-PCR untersucht wurden	S. 38
Tabelle 6: Verwendete ELISA Kits	S. 39

10. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Steck P, Ritzmann F, Honecker A, Vella G, Herr C, Gaupp R, Bischoff M, Speer T, Tschernig T, Bals R, a Beisswenger C. Interleukin 17 Receptor E (IL-17RE) and IL-17C Mediate the Recruitment of Neutrophils during Acute Streptococcus pneumoniae Pneumonia. *Infection and Immunity*. 2019

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Christoph Beisswenger und Professor Dr. Dr. Robert Bals für die freundliche Überlassung des Themas, der herausragenden Betreuung und ermutigenden Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Anja Honecker für die ausgezeichnete Einarbeitung, Planung sowie persönliche und exzellente, technische Unterstützung der gemeinsam durchgeführten *in vivo* Versuche. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Felix Ritzmann für all die kompetente, freundschaftliche und humoristisch-euphorisierende Unterstützung sowie die investierte Zeit, insbesondere bei der Planung und Durchführung der *ex vivo* Versuche.

Bei Andreas Kamyschnikow bedanke ich mich ausdrücklich für die immunhistochemischen Färbungen, Differentialzellbilder und Ratschläge.

Giovanna Vella gilt mein Dank für ihre technische und beratende Unterstützung.

Dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene danke ich für die Zurverfügungstellung des S2 Tierstalles.

Dem Institut für Experimentelle Chirurgie danke ich für die Paraffineinbettung der Lungen.

Dem Institut für Experimentelle und Translationale Nephrologie danke ich für die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkszellen.

Dem Institut für Anatomie und Zellbiologie danke ich für die Anfertigung der inflammatorischen Scores.

Der gesamten AG Bals gilt meine große Dankbarkeit für die freundliche Integration und die schöne gemeinsame Zeit.

Besonderen Dank spreche ich an meine Lebensgefährtin Lara Sophie Westrich aus, die mir während dieser Arbeit stets geduldig und liebevoll, unterstützend zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Gudrun und Wolfgang Steck, Großeltern und Freunden, die mich zu dieser Arbeit motivierten.

12. Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Christoph Beisswenger: Bereitstellung des Themas, Supervision und Betreuung des Projekts, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. Robert Bals: Bereitstellung des Themas
3. Anja Honecker: Tierhaltung, Hilfestellung bei Präparation, technische Unterstützung bei den in vivo Versuchen
4. Felix Ritzmann: Hilfestellung bei Präparation, technische Unterstützung bei den ex vivo Versuchen
5. Andreas Kamyschnikow: Immunhistochemie, Differentialzellbilder
6. Giovanna Vella: Technische Unterstützung
7. Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes: Paraffineinbettung Lungen
8. Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes: Inflammatorische Scores
9. Institut für Experimentelle und Translationale Nephrologie der Universität des Saarlandes: Durchflusszytometrie Knochenmark

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Langenau, 13.06.2021



Unterschrift der/des Promovierenden

Eidesstattliche Versicherung Belehrung

Die Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen. Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe.

Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen. Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherungen an Eides Statt) und in § 161 StGB (fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

§ 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt

Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

§ 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt:

(1) Wenn eine der in den § 154 bis 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.

(2) Strafflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Abs. 2 und 3 gelten entsprechend.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 28. Februar 2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Beisswenger
Prof. Dr. Hans-Joachim Schäfers
Prof. Dr. Bernd Schmeck