

Aus dem Bereich Pneumologie
Theoretische Medizin
und Biowissenschaften
bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar

**IL-17C ist ein Mediator des angeborenen Immunsystems
des respiratorischen Epithels**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Philipp Pfeifer

geb. am: 29.12.1983 in Bonn

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1 Das angeborene Immunsystem.....	8
2.2 Toll-like Rezeptoren.....	9
2.3 Zytokine/ Interleukine	12
2.4 Antimikrobielle Peptide	13
2.5 IL-17 Zytokinfamilie.....	15
2.6 IL-17 Rezeptorfamilie	19
2.7 Signalwege der IL-17 Zytokinfamilie.....	22
2.8 Ziel dieser Arbeit.....	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Zellkultur.....	25
3.2 Bakterienstämme und bakterielle Produkte.....	26
3.3 RNA Isolation und qRT-PCR	26
3.4 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen.....	27
3.5 siRNA Experimente	27
3.6 Westernblot	28
3.7 Mausexperimente	28
3.8 Immunohistochemie	29
3.9 Statistische Analysen.....	29
3.10 Stimulationsversuche	30
4. Ergebnisse	37
4.1 Bakterielle Pathogene induzieren die Expression und Ausschüttung von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen	37
4.2 Atemwegsepithelzellen exprimieren die IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE.....	43

4.3	IL-17A/F verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen von respiratorischen Epithelzellen	45
4.4	IL-17C verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen von respiratorischen Epithelzellen	49
4.5	IL-17C verstärkt entzündliche Reaktionen während bakterieller Infektionen autokrin.....	51
4.6	Zigarettenrauch unterdrückt die Expression von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen.....	53
4.7	IL-17C wird durch Atemwegsepithelzellen von Patienten mit Erkrankungen des Respirationstrakts expremiert.....	60
5.	Diskussion	61
5.1	Bakterielle Pathogene induzieren die Expression und Ausschüttung von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen	61
5.2	Atemwegsepithelzellen expremieren die IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE.....	64
5.3	IL-17A/F verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen respiratorischer Epithelzellen	65
5.4	IL-17C verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen respiratorischer Epithelzellen	65
5.5	IL-17C verstärkt entzündliche Reaktionen während bakterieller Infektionen autokrin.....	66
5.6	Zigarettenrauch unterdrückt die Expression von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen.....	67
5.7	IL-17C wird durch Atemwegsepithelzellen von Patienten mit Erkrankungen des Respirationstrakts expremiert.....	69
5.8	Ausblick	70
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Publikationen/ Dank	79

Abkürzungsverzeichnis

ACT-1	Activator 1
AP-1	Activator protein 1
Calu-3	Cultured human airway epithelial cells
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CEC	Circulating endothelial cells
CFU	Colony forming units
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX	Cyclooxygenase
CSE	Cigarette smoke extract
CS	Cigarette smoke
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DMEM	Dulbecco's Modifizierte Medien
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
DSS	Dextran sulfat sodium
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EST	Expressed sequence tag
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
hBD	Human beta-defensin
HBEC	Human bronchial epithelial cells
HD	Humane defensin
Hi	Haemophilus influenza
HNP	Human neutrophil peptide
HRV	Humanes Rhinovirus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
iNKT	Invariant natural killer T-cells
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulating factors
JAK	Janus Kinase
JNK	C-Jun N-terminal kinase
kDA	Kilodalton
LB	Lysogeny broth
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich-repeat
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor

MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger RNA
MyD	Myeloid differentiation primary response gene
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NTHi	Nontypeable haemophilus influenzae
Pa	Pseudomonas aeruginosa
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate-buffered saline
PGE₂	Prostaglandin E ₂
Poly (I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern-recognition Rezeptoren
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
Reg	Regenerating islet-derived protein
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SEFIR	Similar expression to FGF receptor/ IL-17R
SEM	Standard error of the mean
siRNA	Small interfering RNA
TAK	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TANK	TRAF-family-member-associated NF- κ B activator
TBK	Tank binding kinase
TGF-β	Transforming growth factor beta
T_H	T-Helferzellen
TILL	TIR-like loop
TIR	Toll/IL-1R homology domain
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNF receptor associated factors
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β
TSP	Total suspended particles
TTP	Tristetraprolin
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction

1. Zusammenfassung

Die IL-17 (Zytokinfamilie besteht aus mindestens sechs Mitgliedern (IL-17A bis IL-17F). IL-17 Zytokine aktivieren Zielzellen über unterschiedliche Mitglieder der IL-17 Rezeptorfamilie (IL-17RA bis IL-17RE). Von Immunzellen abgegebenes IL-17A/F führt zu einer gesteigerten Bildung von Entzündungsmediatoren und antimikrobiellen Faktoren. Aktuelle Studien zeigen, dass IL-17C von Epithelzellen im Darm und in der Haut gebildet wird und dort angeborene Immunität autokrin vermittelt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der IL-17 Gene in Atemwegsepithelzellen und deren biologische Aktivität während einer Infektion zu untersuchen.

IL-17C konnte im Bronchialepithel von Patienten mit infektionsassoziierten Lungenerkrankungen wie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und zystischer Fibrose nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von humanen Atemwegsepithelzellen mit bakteriellen Pathogenen wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenzae* zu einer gesteigerten Expression und Ausschüttung von IL-17C führt. Die Expression und Ausschüttung von IL-17C wurde auch durch spezifische Liganden der Toll-like Rezeptoren 3 (poly (I:C) und 5 (Flagellin) induziert. Die Expression von IL-17A, -B, -D, -E und -F war in Atemwegsepithelzellen durch mikrobielle Stimuli nicht induzierbar. Eine gleichzeitige Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* und IL-17C führte zu einer synergistisch gesteigerten Entzündungsreaktion. Silencing von IL-17C in Atemwegsepithelzellen mit small interfering RNA führte bei bakterieller Infektion hingegen zu einer verminderten Entzündungsreaktion. Zigarettenrauch unterdrückte die Expression und Abgabe von IL-17C durch humane Atemwegsepithelzellen *in vitro* und in den oberen Atemwegen von Mäusen.

Die vorliegende Arbeit zeigt also zusammengefasst, dass IL-17C bei mikrobieller Infektion angeborene Immunmechanismen in Atemwegsepithelzellen vermittelt und akute Rauchexposition die IL-17C Expression hemmt.

IL-17 C is a Mediator of Respiratory Epithelial Innate Immune Response

The IL-17 family of cytokines consists of at least six members (IL-17A to IL-17F). IL-17 cytokines directly activate target cells through different members of the IL-17 receptor family (IL-17RA to IL-17RE). IL-17A/F released by immune cells lead to an increased expression of inflammatory mediators and antimicrobial factors.

Recent studies show that IL-17C is expressed by epithelial cells of the intestine and skin and mediates the innate immune response there in an autocrine manner.

It was the purpose of this study to examine the expression of IL-17 family members in respiratory epithelial cells and their biological activity during bacterial infection.

IL-17C could be detected in human bronchial epithelial cells of patients affected by inflammatory diseases like chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis. It could be shown that the stimulation of human bronchial epithelial cells with bacterial pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenzae*, leads to the increased expression and release of IL-17C. This expression and release of IL-17C was also induced by specific ligands of Toll-like receptors 3 (poly (I:C) and 5 (Flagellin). The expression of IL-17A, -B, -D, -E and -F was not induced by bacterial stimuli in human bronchial epithelial cells. The simultaneous stimulation of respiratory epithelial cells with *P. aeruginosa* and IL-17C enhanced synergistic inflammatory responses of respiratory epithelial cells. Silencing of IL-17C in respiratory epithelial cells with small interfering RNA resulted in decreased inflammatory response due to bacterial infection. Furthermore, it could be demonstrated that cigarette smoke suppressed the expression and release of IL-17C by human respiratory epithelial cells *in vitro* and upper airways of mice.

This study shows that IL-17C mediates innate immune response in respiratory epithelial cells during bacterial infection and that urgent exposition to smoke inhibits the expression of IL-17C.

2. Einleitung

Bakterielle Infektionen des Respirationstrakts gehören zu den weit verbreiteten Ursachen tödlicher Krankheitsverläufe in der industrialisierten Welt [21, 51]. Selbst bei Immunkompetenten sind Infektionen des oberen Respirationstrakts weit verbreitet. Unter den Todesursachen nehmen die Infektionserkrankungen des unteren Respirationstrakts und die COPD (chronic obstructive pulmonary disease) weltweit führende Positionen ein [63]. Insbesondere bei Kindern unter 5 Jahren stellen akute respiratorische Infektionen eine der häufigen Todesursachen dar [62, 64]. Zwar wird der Großteil dieser Todesfälle in Entwicklungsländern beobachtet, jedoch rangieren bakterielle Infektionen des Respirationstrakts auch in der industrialisierten Welt unter den Hauptursachen für Krankheit und Tod [21, 51]. Somit wird deutlich, dass die fundierte Erforschung der Infektionserkrankungen des Respirationstrakts und deren Abwehr durch das angeborene und adaptive Immunsystem von weltweit höchster Relevanz ist und von zentraler Bedeutung für die Ableitung effektiver Therapieansätze.

2.1 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein System aus vielen unterschiedlichen zellulären und löslichen Komponenten, die der Abwehr unterschiedlichster Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien, Viren und Pilzen dient. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass das Immunsystem körperfremde Zellen beziehungsweise Stoffe wie Mikroorganismen und deren Produkte erkennt und von körpereigenen Zellen unterscheiden kann [37]. Die Immunantwort kann in eine humorale, durch lösliche Komponenten und eine zelluläre, durch Zellen des Immunsystems vermittelte, unterteilt werden. Außerdem kann die Immunantwort in eine angeborene, zum Zeitpunkt der Geburt bereits voll ausgeprägte und eine adaptive, im Laufe der Entwicklung des Individuums lernfähige und damit selbst einer Entwicklung unterworfenen Form unterschieden werden [37].

Angeborene Immunmechanismen verschiedener Zelltypen wie residente Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten sind notwendig, um die Lunge frei von Pathogenen zu halten und die bakterielle Kolonisation der oberen Atemwege zu kontrollieren. Auch Atemwegsepithelzellen sind zentrale Bestandteile dieses funktionellen Netzwerkes aus angeborenen Immunmechanismen. Professionelle Immunzellen sind wie

Atemwegsepithelzellen in der Lage, Mikroben direkt über pattern-recognition Rezeptoren (PPRs) zu erkennen und diese durch die Expression proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide zu bekämpfen [18, 24].

Antimikrobielle Peptide werden von Atemwegsepithelzellen auf die epithelialen Oberflächen des Respirationstrakts abgegeben und schützen diese vor mikrobiellen Infektionen [54]. Auch mechanische Komponenten sind als Teil des angeborenen Immunsystems bei der Abwehr von Mikroorganismen im Respirationstrakt von Bedeutung. So bilden sekretorische Zellen des Trachea auskleidenden Epithels Muzine, welche Wasser binden, um als Schleim Pathogene über die Bewegung des Flimmerepithels abzutransportieren und schließlich aus der Lunge zu entfernen [1]. Dies geschieht, indem die im Schleim gebundenen Pathogene zum Rachen transportiert, verschluckt und schließlich durch die Magensäure abgetötet werden.

2.2 Toll-like Rezeptoren

Ein weiterer fundamentaler Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die pattern-recognition Rezeptoren. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu der größeren Gruppe der PRRs. PRRs erkennen eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene anhand charakteristischer Merkmale. Diese Merkmale werden als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet. Namensgeber für die Toll-like Rezeptoren ist der Toll Rezeptor der Fruchtfliege. TOLL spielt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung der Fruchtfliege, vermittelt aber auch eine durch Pilzinfektionen ausgelöste angeborene Immunreaktion dieser Insekten. Die Toll-like Rezeptoren werden darüber hinaus zu der größeren IL-1 Rezeptor Familie gezählt. Mit diesen haben sie eine zytoplasmatische TIR-Domäne (Toll/IL-1R homology domain) gemeinsam, unterscheiden sich jedoch von ihnen, indem sie leucinreiche Wiederholungen (leucine-rich repeat-Domäne, LRR-Domäne) in ihrer extrazellulären Region aufweisen. Mit der LRR-Domäne sind die TLRs in der Lage, eine Reihe unterschiedlicher Pathogene zu erkennen, obwohl diese Region in ihrem eigenen Aufbau stark konserviert ist [2]. TLRs spielen auch eine wichtige Rolle für die Funktion des adaptiven Immunsystems. So sind heutzutage viele Wechselwirkungen zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem bekannt [38].

Insgesamt sind bis heute 13 TLRs bei Säugetieren entdeckt worden. Von diesen exprimiert der Mensch TLR 1 bis 10 (Abbildung 1) und die Maus TLR-1 bis 9 und TLR-11 bis 13 [26, 38]. Ein Teil der TLRs finden sich auf der Plasmamembran (TLR-1, -2, -5 und -6) und ein Teil auf der Membran von Endosomen (TLR-3, -7, -8, -9 und -11, -12 und -13). TLR-4 und TLR-10

bilden in diesem Zusammenhang eine Ausnahme, denn TLR-4 findet sich sowohl auf der Plasmamembran als auch auf der Membran von Endosomen und die Lokalisation von TLR-10 in der Zelle ist bis heute unbekannt [38, 53, 68].

Alle vom Menschen exprimierten TLRs, mit Ausnahme von TLR3 und TLR 10, aktivieren MyD88 (myeloid differentiation primary response gene). Eine Aktivierung der TLRs, deren Signalwege über MyD88 verlaufen, führt letztlich zur Expression von proinflammatorischen Genen, wie TNF (Tumor Nekrose Faktor), IL-1 β , IL-6 und CXCL8 (chemokine (C-X-C motif) ligand) [42]. TLR-4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS) und aktiviert einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg, wobei der MyD88-unabhängige Signalweg über TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) verläuft. Erst kommt es auf der Plasmamembran zur Aktivierung des MyD88 abhängigen Signalwegs und nach Internalisierung von TLR-4 und Transport zum Endosom zur Aktivierung des TRIF abhängigen Signalwegs [26]. TLR-5 wird durch bakterielles Flagellin aktiviert und aktiviert ausschließlich den MyD88 abhängigen Signalweg. Der Signalweg von TLR3 verläuft hingegen über einen MyD88 unabhängigen Signalweg. Dieser verläuft über TRIF, IKK- ϵ (I κ B kinase) und TBK1 (Tank-binding kinase 1) und führt über die Aktivierung von IRF3 (interferon regulatory factor) beispielsweise zur Produktion von Typ I Interferonen (IFN) und inflammatorischen Zytokinen [2, 42].

Toll-like Rezeptoren	Ligand	Herkunft des Liganden	Lokalisation des Rezeptors	Aktivierte Signalwege
TLR-1	Triacyl-Lipopeptide	Gram-positive Bakterien Gram- negative Bakterien	Plasmamembran	MyD88/ MAL
TLR-2	Lipoprotein Peptidoglykan Lipoteichnonsäure	Gram-positive Bakterien Gram- negative Bakterien	Plasmamembran	MyD88/ MAL
TLR-3	Doppelsträngige RNA	Viren	Endosom	TRIF
TLR-4	Lipopolysaccharid	Gram negative Bakterien	Plasmamembran/ Endosom	MyD88/ TRIF/ TRAM
TLR-5	Flagellin	Bakterien	Plasmamembran	MyD88
TLR-6	Diacyl-Lipopeptide Lipoteichnonsäure	Gram-positive Bakterien Gram- negative Bakterien	Plasmamembran	MyD88/MAL
TLR-7	Einzelsträngige RNA	Viren	Endosom	MyD88
TLR-8	Einzelsträngige RNA	Viren	Endosom	MyD88
TLR-9	CpG-haltige DNA	Bakterien und Viren	Endosom	MyD88
TLR-10	Unbekannt	<i>L. monocytogenes</i>	intrazellulär	Unbekannt
TLR-11	Profilin Bakterielle RNA	Parasiten Bakterien	Endosom	MyD88
TLR-12	Profilin Bakterielle RNA	Parasiten Bakterien	Endosom	MyD88
TLR-13	Bakterielle RNA	Bakterien	Endosom	MyD88

Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren

Quellen: [2, 38, 53, 68]

2.3 Zytokine/ Interleukine

Zytokine sind kleine Signalpeptide, welche der Signaltransduktion zwischen Zellen dienen und ein Gewicht von 8 bis 30 - 40 kDa besitzen [8, 9]. Sie können parakrin auf der Ursprungszelle benachbarter Zellen, autokrin auf die Ursprungszelle zurück oder endokrin über das Blut auf weiter entfernte Zellen wirken [8]. Unter dem Begriff der Zytokine werden eine ganze Reihe unterschiedlicher Mediatoren zusammengefasst. Dazu gehören Chemokine, Interferone, Interleukine (IL), Lymphokine und Tumor Nekrose Faktoren. Bis heute sind mehr als 80 Zytokine bekannt und es werden laufend neue Zytokine entdeckt [8]. Zytokine unterscheiden sich von Hormonen hauptsächlich dadurch, dass letztere von spezialisierten Drüsenzellen gebildet werden und Zytokine im Prinzip von allen kernhaltigen Zelltypen gebildet werden können [8, 9]. Besonders starke Produzenten von Zytokinen sind dabei Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen [8].

Ein Teil der Zytokine wird als Interleukine bezeichnet. Der Name Interleukin rührt von der Erkenntnis, dass es Peptide gibt, die von Leukozyten gebildet werden und auf andere Leukozyten als Zielzellen wirken. Diese bis heute gültige, historische Bezeichnung für diese Zytokine basiert also auf der überholten Ansicht, dass Interleukine nur zwischen Leukozyten wirken. Inzwischen ist bekannt, dass viele Interleukine auch von anderen Zellen als Leukozyten gebildet werden und diese auch häufig auf andere Zelltypen als Leukozyten wirken [8].

Zytokine sind bedeutsam für Immunantworten, welche durch Infektionen, Trauma und Entzündungen ausgelöst werden und vermitteln regulatorische Effekte, welche proinflammatorisch oder anti-inflammatorisch sein können. Dazu gehören Fieber, Entzündungsreaktionen, Gewebeerstörung, Schock und sogar Tod als mögliche Folge proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1 oder TNF.

Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehören IL-8, IL-1 und TNF. IL-8 lockt neutrophile Granulozyten chemotaktisch an und bringt sie zur Degranulation. Zur Aufgabe von IL-1 und TNF gehört die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen, welche die Adhäsion von Leukozyten ermöglichen. IL-1 führt unter anderem zur verstärkten Transkription von COX-2 (Cyclooxygenase-2) und damit zu einer erhöhten Menge von PGE₂ (Prostaglandin E₂), welches zu Fieber, Kopfschmerzen, Myalgie und Arthralgie führt. IL-1 verstärkt weiterhin die Bildung antimikrobieller Peptide sowie Entzündungsmediatoren. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β (transforming growth factor beta) supprimieren die Expression von IL-1 und TNF [9].

2.4 Antimikrobielle Peptide

Einen weiteren wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort des Menschen stellen die antimikrobiellen Peptide dar. Antimikrobielle Peptide finden sich hauptsächlich auf epithelialen Oberflächen. Sie stammen entweder aus direkter Bildung der entsprechenden Epithelzellen oder aus den Speichern mobiler zirkulierender Zellen, wie zum Beispiel Granulozyten und Monozyten [23]. Die beiden wichtigsten Gruppen der antimikrobiellen Peptide des Menschen sind die Defensine und die Cathelicidine [15]. Zu den antimikrobiellen Peptiden zählen aber auch Lysozym und Lactoferrin. Von humanen Atemwegsepithelzellen werden Defensine, Lysozym und Lactoferrin in den die epithelialen Oberflächen auskleidenden Flüssigkeitsfilm abgegeben [5]. Antimikrobielle Peptide werden konstitutiv, also stetig, oder als Reaktion auf Mikroorganismen beziehungsweise Pathogene gebildet [23]. Das Abtöten von Bakterien durch antimikrobielle Peptide geschieht innerhalb weniger Minuten und im Falle von Defensinen und Cathelicidinen durch Bildung von Poren in der Zellmembran. Hierdurch kommt es zur Depolarisation und schließlich zum Absterben des entsprechenden Organismus [18, 23].

Defensine sind kleine antimikrobielle Peptide mit einer Größe von 3 bis 5 kDA, welche durch eine β -Faltblattstruktur mit drei Disulfidbrücken charakterisiert sind [15, 16, 18]. Die humanen Defensine (HD) können in zwei große Gruppen unterteilt werden, die α -Defensine und die β -Defensine [15, 23]. α -Defensine haben eine Größe von 29-35 Aminosäuren und finden sich in großer Häufigkeit in intrazellulären Granula [18]. Von den humanen α -Defensinen sind bis heute sechs Mitglieder entdeckt worden. HNP 1 bis 4 (human neutrophil peptide) und HD-5 und HD-6. HNP 1 bis 4 werden hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten und HD-5 und HD-6 hauptsächlich von Panethzellen des Magen-Darmtraktes exprimiert [18]. Die Expression von HNP-1 bis 4 erfolgt konsekutiv und ihre antimikrobielle Aktivität umfasst grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien und Viren [16]. β -Defensine haben eine Größe von 36 - 42 Aminosäuren [18, 23]. Bis heute sind 28 Gene, welche für β -Defensine codieren, entdeckt worden, von denen bisher nur wenige genauer untersucht worden sind [18]. Die Defensine werden als prepro-Defensine gebildet, aus denen erst nach proteolytischer Reifung die antimikrobiell aktiven Defensine entstehen, welche dann von der entsprechenden Zelle an ihre Umgebung abgegeben oder in Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert werden [18]. Die am besten erforschten menschlichen β -Defensine sind hBD (human beta-defensin) 1 bis 4 [18]. Diese werden hauptsächlich von Epithelzellen des oberen Respirationstrakts und des Darms gebildet [16, 18, 23]. hBD-1 ist ein 36-

aminosäurengroßes Peptid, welches konstitutiv beispielsweise vom Epithel der Niere und der Lunge gebildet wird. Sein antimikrobielles Wirkungsspektrum ist sehr breit [16, 23]. Im Gegensatz zu hBD-1 lässt sich die Expression von hBD-2, -3 und -4 beispielsweise durch Stimulation mit *P. aeruginosa* (Pa), LPS, TNF- α , *Streptococcus pneumoniae* und IL-1 β induzieren [16, 18]. hBD-2 ist ein 41-aminosäurengroßes Peptid, das im Epithel der Haut und der Trachea gebildet wird. Es wirkt stark gegen *P. aeruginosa* und *Candida albicans*, aber nur schwach gegen *Staphylococcus aureus*. Insgesamt ist auch das Wirkungsspektrum von hBD-2 sehr breit [16, 23]. Im Falle von hBD-2 ist nachgewiesen, dass seine Expression in respiratorischem Atemwegsepithel über einen NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) abhängigen Signalweg erfolgt. Cathelicidine werden als Propeptide in den Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und bei Aktivierung der neutrophilen Granulozyten proteolytisch in das aktive antimikrobielle Peptid umgewandelt [16, 23]. Die Cathelicidine haben alle ein sehr stark konserviertes N-terminales Propeptidsegment gemeinsam. Cathelicidine bestehen aus circa 100 Aminosäuren und ähneln in ihrer Sequenz dem Protein Cathelin, wovon sich der Name dieser antimikrobiellen Peptide ableitet [23]. Cathelicidine besitzen eine α -helikale Struktur und sind kationisch [22]. Das humane Cathelicidin besteht aus 37 Aminosäuren und wird von neutrophilen Granulozyten, respiratorischem Atemwegsepithelzellen und Keratinozyten gebildet [23]. Den Defensinen und Cathelicidinen ist gemeinsam, dass ihr antimikrobielles Wirkungsspektrum sehr breit ist und dass sie chemotaktisch auf eine Reihe von Immunzellen wirken [22].

Lysozym ist ein Protein, was die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminresten in Peptidoglykanen spaltet und somit gegen grampositive Bakterien wirkt [42]. Lactoferrin ist ein Protein, dass in die Atemwege der Lunge abgegeben wird und das bakterielle Wachstum hindert, indem es zum einen Eisen bindet und zum anderen direkt antimikrobielle Effekte ausübt [42].

Antimikrobielle Peptide haben aber nicht nur direkte abtötende Wirkung auf Mikroorganismen, sondern vermitteln auch indirekte proinflammatorische Effekte und chemotaktische Eigenschaften. So führt zum Beispiel bei Keratinozyten hBD-2, -3 und -4 zu einer verstärkten Expression von typischen proinflammatorischen Interleukinen, wie IL-6, IL-10 und IFN- γ [18], hBD-1 zur chemotaktischen Anziehung von Monozyten und hBD-3 und -4 zu einer chemotaktischen Anziehung von Mastzellen [18].

2.5 IL-17 Zytokinfamilie

Fast zwanzig Jahre bestand die allgemeine Annahme, dass sich sowohl die T-Helferzellen als auch die Interleukine lediglich in zwei Unterkategorien einteilen lassen, respektive T-Helferzellen-1 (T_H -1) und T-Helferzellen-2 (T_H -2) und T_H -1- und T_H -2-Interleukine. Mittlerweile ist bekannt, dass es noch weitere Unterkategorien von T-Helferzellen als auch eine ganze Reihe weiterer Interleukine gibt, die nicht in diese Einteilung passen. Im Folgenden soll die IL-17 Zytokinfamilie genauer charakterisiert werden.

IL-17A wurde als erstes Mitglied der IL-17 Zytokinfamilie durch ein subtraktives Hybridisierungsscreening in einer T-Zell Bibliothek von Nagetieren entdeckt. In der Folge führte eine genomische Sequenzierung zur Entdeckung einer Reihe von IL-17A Homologen, die später als IL-17B, -C, -D, -E und -F bezeichnet wurden, sodass bis heute diese sechs Zytokine bekannt sind [14, 39, 40, 55].

Alle IL-17 Zytokine teilen eine konservierte Sequenz am Carboxylende und verfügen über fünf Cysteinreste, über die eine Dimerisierung zu Homodimeren erfolgen kann, wobei IL-17A und F zusätzlich Heterodimere miteinander bilden können [40].

IL-17A und -F sind nicht nur die als erste entdeckten, sondern auch die am besten erforschten IL-17 Zytokine. IL-17A und IL-17F vermitteln Immunität gegenüber extrazellulärer bakterieller Pathogene [17, 35, 40, 56, 67, 70]. Es gibt drei Formen in denen IL-17A/F vorkommt: Zum einen als Homodimere, bestehend aus zwei Molekülen IL-17A oder zwei Molekülen IL-17F und zum anderen als Heterodimere, die aus je einem IL-17A und einem IL-17F Molekül bestehen. IL-17A und IL-17F werden von aktivierten $CD4^+$ Memory-T-Zellen (cluster of differentiation), $CD8^+$ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und iNKT-Zellen (invariant natural killer T-cells) freigesetzt und wirken auf Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und Adipozyten. Bei diesen führen sie zu einer Ausschüttung von zahlreichen inflammatorischen Mediatoren und antimikrobiellen Peptiden wie CXCL1, CXCL8, CXCL10, TNF- α , IL-1, IL-6, G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), Muzinen, β -Defensinen, S100 A7 bis 9, SAA, MMP1 (Matrix-Metalloprotease) und RANKL (receptor activator of NF- κ B Ligand) [25, 31, 39, 40, 69]. Es sind auch eine Reihe synergistischer Effekte von IL-17 mit anderen Entzündungsmediatoren beschrieben. IL-17A und -F wirken beispielsweise zusammen mit TNF- α und IL-1 β synergistisch auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Epithelzellen und Fibroblasten [40]. Damit sind IL-17A und -F maßgeblich an der Aktivierung der Immunmechanismen ihrer Zielzellen beteiligt. Die IL-17-abhängige Immunantwort ist bei der

Abwehr von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen von Bedeutung. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Hemmung von IL-17A durch Antikörper zu einer Verstärkung einer *Pneumocystis carinii* Infektion führte und eine durch Adenovireninfektion hervorgerufene Überexpression von IL-17A Mäuse vor einer letalen Dosis von *C. albicans* schützen konnte [39]. Ein Fehlen von IL-17A bei einer dextran sulfat sodium (DSS)-induzierten Kolitis führt zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes [46]. Dabei übt in Bezug auf die nachgeschaltete Genaktivierung das IL-17A Homodimer den stärksten Effekt, das Heterodimer aus IL-17A und IL-17F einen mittelmäßig starken Effekt und das Homodimer bestehend aus zwei IL-17F Molekülen den schwächsten Effekt aus [40, 46]. IL-17A vermittelt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Barrierefunktion des Darmepithels, indem es die Synthese des tight-junction Proteins Claudin erhöht [40]. Für IL-17A und -F sind aber auch negative Effekte für die Homöostase des Organismus beschrieben worden. So ist eine unkontrollierte IL-17 Immunreaktion an einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Psoriasis, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose und chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt [40, 46]. Es ist auch eine Beteiligung von IL-17A bei atherosklerose-assoziierten Erkrankungen beschrieben. So wurde IL-17A in T-Zellen, welche aus atherosklerotischen Plaques gewonnen wurden, nachgewiesen und bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom fanden sich erhöhte Werte von T_H-17-Zellen im Blut [39].

Momentan werden eine Reihe von Studien durchgeführt, die den therapeutischen Nutzen der Neutralisation von IL-17A bei Autoimmunerkrankungen untersuchen [39].

Eine Expression von IL-17B wurde in Chondrozyten, Neuronen, Pankreas, Darm, Magen und Hoden nachgewiesen [39, 47]. Es wurde beobachtet, dass die Expression von IL-17B durch proinflammatorische Stimuli beeinflusst wird und umgekehrt IL-17B die Expression von proinflammatorischen Zytokinen auslöst. So fand sich beispielsweise eine Expression von IL-17B in Chondrozyten, welche aus den Pfoten von Mäusen gewonnen wurden, bei denen zuvor eine kollageninduzierte Arthritis ausgelöst wurde [65]. Darüber hinaus fand sich bei Stimulation von Monozyten und Fibroblasten mit IL-17B eine verstärkte Expression von TNF- α und IL-1 β . Weiterhin führte eine Stimulation von Myofibroblasten mit IL-17B zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-6, -8, LIF (leukemia inhibitory factor) und MMP-3 [39]. In einer Studie wurde gezeigt, dass IL-17B die Zell-Matrix Adhäsion, die zelluläre Migration humaner Endothelzellen und die Angiogenese negativ beeinflusst [47].

Über IL-17C ist bekannt, dass es hauptsächlich durch Epithelzellen als Reaktion auf Stimulation mit Bakterien und TLR-2-, TLR-4- und TLR-5-Agonisten exprimiert wird [40, 44, 46]. So konnte gezeigt werden, dass murine Kolonepithelzellen verstärkt IL-17C exprimieren,

wenn sie mit Flagellin (TLR-5 Ligand) stimuliert werden [39, 46] und humane Keratinozyten und murine Kolonepithelzellen verstärkt IL-17C bei Stimulation mit TNF- α exprimieren [39, 46]. Die Steigerung der Expression von IL-17C geschieht also sowohl über einen MyD88 abhängigen Signalweg als auch über inflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel TNF- α . IL-17C findet sich im Lungengewebe von Mäusen bei *Mycoplasma pneumoniae* Infektion und in der Haut von Patienten mit Psoriasis Läsionen oder Infektion mit *S. aureus* [39]. In einem Psoriasismodell konnte nachgewiesen werden, dass IL-17C oder IL-17RE defiziente Mäuse eine geringere Aktivität der Psoriasis, gemessen an der Proliferationsrate und der Leukozyteninfiltration, zeigten [40]. Wie oben bereits für IL-17B beschrieben löste auch eine Stimulation von Myofibroblasten mit IL-17C eine verstärkte Ausschüttung von IL-6, -8, LIF und MMP-3 aus [39]. Weiterhin zeigte eine Studie, dass eine Stimulation von THP-1 Zellen (eine humane Monozytenzelllinie) mit IL-17C zu einer Ausschüttung von TNF und IL-1 β führt [32]. Des Weiteren führte, wie auch schon für IL-17A beschrieben, ein Fehlen von IL-17C bei einer DSS-induzierten Kolitis zu einer Verschlimmerung der Erkrankung [40, 46]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass IL-17C in epidermalen Keratinozyten und im Darmepithel angeborene epitheliale Immunmechanismen in einer autokrinen und parakrinen Art und Weise aktiviert [46]. Damit ist gemeint, dass IL-17C von Epithelzellen beispielsweise als Reaktion auf Pathogene ausgeschüttet wird und dieses IL-17C in der Folge sowohl die Zelle selbst, als auch der Ursprungszelle benachbarte Epithelzellen aktiviert. Diese aktivierten Epithelzellen exprimieren dann wiederum ihrerseits verstärkt proinflammatorische Zytokine und antimikrobielle Peptide. Somit bewirkt IL-17C, dass es bei Kontakt von Epithelzellen mit Bakterien zu einer raschen Aktivierung einer großen Menge benachbarter Epithelzellen kommt und in der Folge zu einer gemeinsamen, hoch effektiven Aktivierung des angeborenen Immunsystems und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Faktoren [40]. Es existieren auch Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass IL-17C als Reaktion auf Stimulation mit *Citrobacter rodentium* von CECs (circulating endothelial cells) ausgeschüttet wird und das IL-17C mit IL-22 zu einer synergistisch verstärkten Expression der für antimikrobielle Peptide codierenden mRNA (messenger RNA) S100A8, S100A9, RegIII β und RegIII γ (regenerating islet-derived protein) durch CECs führt [55]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TNF, IL-1 β , IL-17A und IL-17F in der Lage sind, die Expression von IL-17C durch CECs und SW480 Zellen (Kolonkarzinomzelllinie) zu erhöhen [55]. IL-17C spielt auch eine Rolle bei multipler Sklerose. So zeigte sich in einem Mausmodell für multiple Sklerose, dass IL-17C Knockout Mäuse eine schwächer ausgeprägte autoimmune Enzephalomyelitis als die Kontrollmäuse zeigten [40]. Die bisherigen Erkenntnisse über das Vorkommen des IL-17C

beschränkten sich also bis auf wenige Ausnahmen auf Epithelzellen des Colons und Keratinozyten. Nur wenige Arbeiten beschreiben, dass IL-17C auch durch Epithelzellen der Lunge exprimiert wird und die Arbeiten, die sich mit diesem Thema beschäftigen, tun dies nur am Rande. Deshalb war es ein wichtiger und logischer Schritt, die Expression von IL-17C in der Lunge und im Speziellen durch Atemwegsepithelzellen genauer zu untersuchen und zu charakterisieren. Aus diesem Grund widmet sich diese Doktorarbeit insbesondere dieser Aufgabe.

Von IL-17D ist berichtet worden, dass die Stimulation von Myofibroblasten mit IL-17D zu einer Ausschüttung von IL-6, IL-8, LIF und MMP-3 führt [3]. Außerdem, dass humanes IL-17D mit FGFR1 (fibroblast growth factor receptor) interagiert und darüber die FGF (fibroblast growth factor) abhängige Proliferation und die Aktivierung von ERK (extracellular signal-regulated kinase) unterdrücken kann, wobei der genaue Mechanismus nicht geklärt ist [14].

IL-17E, auch als IL-25 bezeichnet, wird von Epithelzellen und einer Reihe von Immunzellen, wie zum Beispiel Alveolarmakrophagen, Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen gebildet [14]. IL-17E unterscheidet sich in seiner Struktur am stärksten von allen IL-17 Zytokinen und besitzt nur 25-35% Strukturgleichheit mit den anderen IL-17 Zytokinen [39]. IL-17E führt zu einer Ausschüttung der T_H-2 Zytokine, IL-4, -5, -9 und -13 durch die Zielzellen [40]. IL-17E wird durch Epithelzellen als Reaktion auf eine Exposition gegenüber Parasiten, Viren, Pilzen und Proteaseallergenen ausgeschüttet [40]. Interessanterweise hemmt IL-17E die Entwicklung von T_H-17 Zellen, indem es die Expression von IL-13 durch dendritische Zellen induziert und die Produktion von IL-23 durch Makrophagen hemmt [14, 40]. Außerdem reguliert IL-17E die Produktion von IL-17A und -F durch Leukozyten herunter [40]. Es ist beschrieben, dass eine Infektion von Mäusen mit Nematoden (*Nocardia brasiliensis*) zu einer Expression von IL-17E im Gastrointestinaltrakt führt. Eine Infektion mit *Aspergillus fumigatus* führt ebenso wie eine Exposition gegenüber Protease-Allergenen beziehungsweise Ovalbumin zu einer verstärkten Expression von IL-17E in der Lunge [39]. Bei Mäusen erzeugt eine Überexpression von IL-17E durch leberspezifische Promotoren eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen und Neutrophilen und erhöht die Werte von IgE, IgA, IgG1 (Immunglobuline) und T_H-2 Zytokinen im Blut [39]. In der Lunge verstärkt IL-17E allergische Atemwegsentzündungen indem es verstärkt T_H-2 Signalwege aktiviert [40, 57]. Es ist weiterhin beschrieben, dass eine Überexpression von IL-17E zur Entwicklung einer atopischen Dermatitis beiträgt [40]. Durch knockout von IL-17E bei Mäusen verlieren diese die Möglichkeit, die Wurmbefall zu eradizieren [39]. Im Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung ist die Expression von IL-17E herunterreguliert [39].

2.6 IL-17 Rezeptorfamilie

Eine Reihe von Strukturmerkmalen wird von allen IL-17 Rezeptoren geteilt. So besitzen alle IL-17 Rezeptoren eine Transmembrandomäne, eine extrazelluläre Fibronectin III-like Domäne und eine zyttoplasmatische SEFIR-Domäne (similar expression to FGF receptor /IL-17R). Ihre Größe liegt zwischen 499 - 866 Aminosäuren [14]. Die Familie der IL-17 Rezeptoren besteht aus fünf Untereinheiten: IL-17A bis -E, welche sich zu Heteromultimeren zusammensetzen, um ihre Liganden zu binden [14, 55] (Abbildung 2). Dem Rezeptorbestandteil IL-17RA kommt eine besondere Stellung unter den IL-17 Rezeptoruntereinheiten zu, weil er am Aufbau der meisten, vielleicht sogar am Aufbau aller IL-17 Rezeptoren, beteiligt ist. Nachgewiesen ist eine Beteiligung von IL-17RA an der Detektion der Interleukine IL-17A, -C, -E und -F [40] (Abbildung 2). Der IL-17RA Rezeptor wird ubiquitär expremiert [14, 59].

IL-17A, -F oder -A/F binden an einen Rezeptorkomplex, welcher aus den Untereinheiten IL-17RA und -RC besteht [14, 39, 40, 55]. Dieser wird auf vielen Zelltypen wie zum Beispiel Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und Adipozyten expremiert [40, 46]. Die genaue Zusammensetzung dieses Rezeptorkomplexes ist nicht bekannt. Native Gelanalysen mit IL-17RC zeigen aber, dass sich der Rezeptorkomplex zur Detektion von IL-17A, -F und -A/F aus zwei IL-17RA Untereinheiten und einer IL-17RC Untereinheit zu einem trimeren Komplex zusammensetzen könnte [14]. Der IL-17RC Rezeptor wurde durch Suche nach IL-17RA ähnlichen Molekülen in EST (expressed sequence tag) Datenbanken von Säugetieren gefunden [14]. Der IL-17RC Rezeptor wird verstärkt in der Prostata, Leber, Niere, Schilddrüse und in Gelenken expremiert [14]. Da gezeigt werden konnte, dass IL-17RC stärker an IL-17F als an IL-17A bindet, ist es denkbar, dass Gewebe, die stärker IL-17RC expremieren, stärker auf IL-17F reagieren als auf IL-17A [14]. Der IL-17RC Rezeptor enthält wie alle IL-17 Rezeptoren eine SEFIR-Domäne, aber keine TILL (TIR-like loop) -Domäne, welche sich nur als Bestandteil des IL-17RA Rezeptor findet.

An den IL-17RB Rezeptor binden IL-17B und IL-17E (Abbildung 2). Wie die genaue Zusammenstellung des Rezeptorkomplexes über den IL-17B detektiert wird, ist nicht bekannt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass IL-17RA auch am Aufbau eines Rezeptorkomplexes mit IL-17RB zur Detektion von IL-17B beteiligt ist [14, 40]. IL-17RB wird von Gewebe der Nieren, der Leber, der Lunge, des Knochens, TH-2 Zellen, Fibroblasten und basophilen Granulozyten expremiert [14, 39]. Im Gegensatz zum IL-17RA Rezeptor besitzt der IL-17RB Rezeptor ein zytoplasmatisches TRAF6 (TNF receptor associated factor) Bindungsmotiv und wie alle IL-17 Rezeptoren eine SEFIR- Domäne, über die es ACT-1 (activator 1) binden kann [14].

IL-17C wird über einen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus den Bestandteilen IL-17RA und IL-17RE detektiert [40, 46, 55] (Abbildung 2). Der IL-17RE Rezeptor wird beim Menschen vorwiegend im Epithel des Kolons und der Haut expremiert und bei Mäusen im Epithel von Kolon, Haut, Trachea und Lunge [46, 55]. Eine Co-Expression von IL-17RA und -RE fand sich beim Menschen in Keratinozyten und Kolonepithelzellen [46].

Über welchen Rezeptor oder Rezeptorkomplex IL-17D detektiert wird, ist bis heute unbekannt [14, 39, 40, 55]. IL-17E bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex bestehend aus IL-17RA und IL-17RB [14, 39, 40]. Dieser heterodimere Rezeptorkomplex wird auf einer Reihe von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, wie zum Beispiel CD4⁺-Th2-Zellen und T_H-9 Zellen, Fibroblasten, basophile Granulozyten, Makrophagen, ILC2 Lymphozyten und iNK T-Zellen expremiert [39, 40].

Der IL-17RD Rezeptor scheint ein sehr früh in der Evolution entstandener Rezeptor zu sein, da er in Meerneunaugen, Fröschen und *Caenorhabditis elegans* vorkommt. Er scheint ursprünglich eine Funktion in der Ontogenese gespielt zu haben und zeigt damit neben der gemeinsamen Induktion der Expression proinflammatorischer Zytokine eine weitere interessante Parallele zwischen den Toll-like Rezeptoren und den IL-17 Rezeptoren auf, denn auch die Toll-like Rezeptoren spielen eine Rolle in der Ontogenese bei der Festlegung der dorsoventralen Polarität in der Entwicklung von *Drosophila*. Der IL-17RD Rezeptor kommt auf Endothel- und Epithelzellen vor [39]. Bis heute ist kein Ligand für den IL-17RD Rezeptor gefunden worden. IL-17RD kann mit IL-17RA und IL-17RD interagieren, wobei die physiologische Bedeutung dieser Beobachtungen noch ungeklärt ist [14].

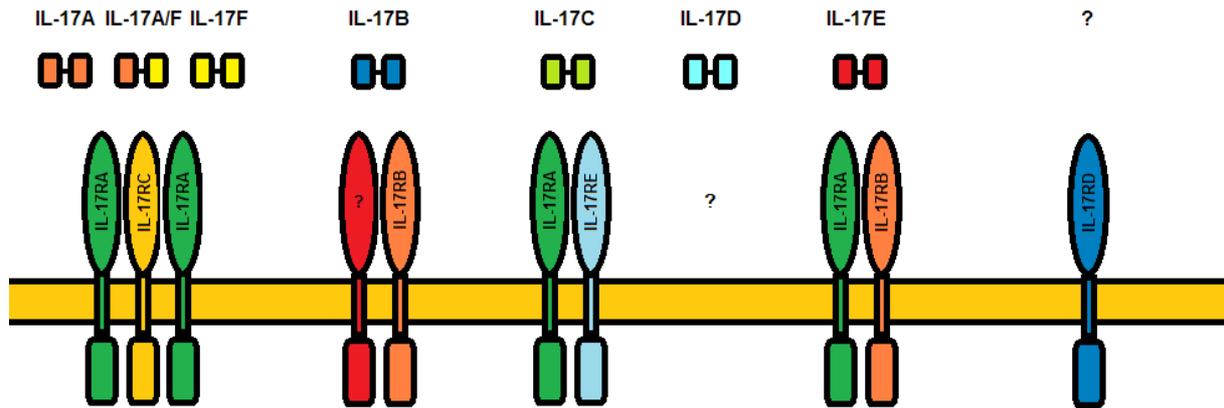


Abbildung modifiziert nach [14, 40]

Abbildung 2: Übersicht der IL-17 Rezeptoren mit den entsprechenden Liganden:

Die sechs bis heute bekannten IL-17-Zytokine IL-17A, -B, -C, -D, -E und -F binden an unterschiedliche IL-17 Rezeptor-Multimere, welche aus den fünf bis heute bekannten IL-17 Rezeptoren IL-17RA, -RB, -RC, -RD und -RE bestehen. IL-17RA ist am Aufbau der meisten IL-17 Rezeptoren, vielleicht sogar am Aufbau aller IL-17 Rezeptoren beteiligt. Der IL-17 Rezeptor, welcher IL-17A, IL-17F und IL-17A/F detektiert, hat wahrscheinlich einen trimeren Aufbau, bestehend aus zwei IL-17RA Rezeptoren und einem IL-17RC Rezeptor. IL-17B bindet an den IL-17RB Rezeptor. Welcher weitere Rezeptor am Aufbau des Rezeptormultimers zur Detektion von IL-17B beteiligt ist, ist bis heute unbekannt. IL-17C bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RE. Wie der IL-17 Rezeptor, über den IL-17D detektiert wird, aufgebaut ist, ist bis heute unbekannt. IL-17E wird über einen heterodimeren Rezeptorkomplex bestehend aus IL-17RA und IL-17RB detektiert. Welches Interleukin an den IL-17RD Rezeptor bindet, ist bis heute ebenfalls unbekannt.

2.7 Signalwege der IL-17 Zytokinfamilie

Aktivierung des IL-17RA Rezeptors führt zur Genexpression proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide. IL-17A aktiviert NF- κ B über einen Signalweg, der sich von den durch TLR und IL-1R aktivierten Signalwegen unterscheidet. IL-17A induziert die Expression von I κ B ζ und es ist daher wahrscheinlich, dass I κ B ζ an der IL-17A induzierten Genexpression beteiligt ist. I κ B ζ ist ein positiver Regulator der Transkription der TLR und IL-1R Signalwege. In der zytoplasmatischen Region von IL-17RA findet sich eine konservierte Region, die alle IL-17 Rezeptoren teilen. Diese Domäne ähnelt in ihrem Aufbau der TIR-Domäne der Toll-like Rezeptoren und wird SEFIR-Domäne genannt. Darüber hinaus findet sich innerhalb des IL-17RA Rezeptors eine innerhalb der IL-17 Rezeptorfamilie einzigartige Domäne, die TILL-Domäne genannt wird und deren Funktion bis heute unbekannt ist. Möglicherweise dient die TILL-Domäne der Interaktion mit einem bisher unbekanntem Signalmolekül. In der Folge der Aktivierung von IL-17RA wird unter anderem ACT-1 aktiviert (Abbildung 3). ACT-1 verfügt über ein TRAF6 Bindungsmotiv, über welches es TRAF6, TRAF3 und TAK1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1) binden kann [14, 45]. IL-17A führt zu einer Aktivierung einer Reihe von MAP-Kinase (mitogen activated protein) Signalwegen. Als Reaktion auf eine Stimulation von humanen Atemwegsepithelzellen mit IL-17A kommt es beispielsweise zur Phosphorylierung von ERK und p38, wobei ERK am schnellsten und stärksten aktiviert wird [30, 31] (Abbildung 3). In der Folge der Aktivierung dieser MAP-Kinasen kommt es zu einer Stabilisierung der mRNA-Transkripte der durch IL-17A induzierten Gene. Dies geschieht zum Beispiel durch Phosphorylierung und damit der Hemmung mRNA destabilisierender Proteine wie TTP (tristetraprolin). Außerdem führt IL-17A zur Induktion der Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP β und C/EBP δ (CCAAT/enhancer-binding protein) [14]. In einer Studie ist gezeigt worden, dass die durch Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit IL-17A ausgelöste hBD-2 Expression nicht nur durch eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges stattfindet, sondern auch durch Aktivierung eines JAK-(Janus Kinase) abhängigen Signalweges [25].

Über IL-17RD weiß man weder, welcher Ligand an ihn bindet, noch welche Signalwege genau durch ihn aktiviert werden. Studien haben gezeigt, dass der humane IL-17RD Rezeptor eine FGF abhängige Aktivierung von ERK und eine FGF induzierte Proliferation hemmen kann. Bei IL-17RD von Mäusen konnte gezeigt werden, dass IL-17RD mit TAK1 interagiert und den MKK4-JNK (mitogen-activated protein kinase kinase 4-c-Jun N-terminal kinase) Signalweg aktiviert [14].

IL-17C vermittelt über die Aktivierung des heterodimeren IL-17RA /-17RE Rezeptors die Aktivierung von NF- κ B und MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalwegen. Die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs geschieht durch Phosphorylierung der NF- κ B Untereinheit p65 und des NF- κ B inhibitors I κ B α und die Aktivierung der MAP-Kinase Signalwege durch Phosphorylierung von p38, ERK und JNK [55] (Abbildung3).

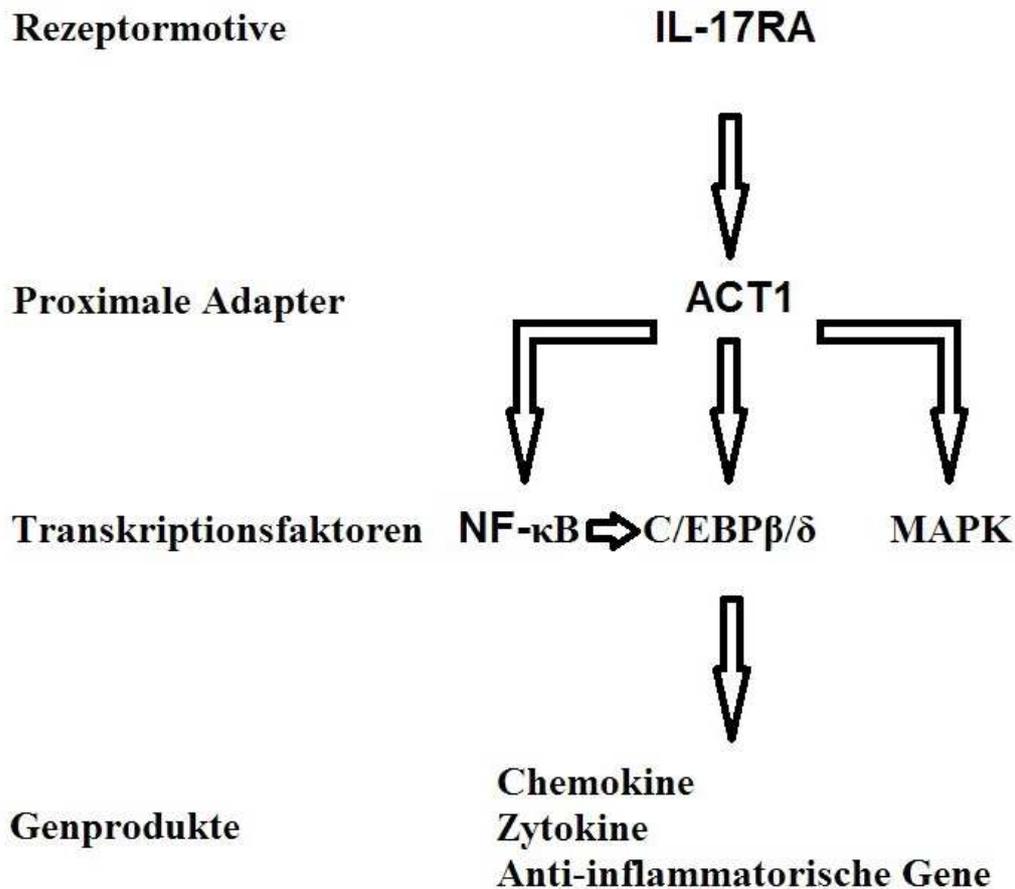


Abbildung modifiziert nach [14]

Abbildung 3: Signalwege des IL-17RA Rezeptors:

Der am besten erforschte IL-17 Rezeptor ist der IL-17RA Rezeptor. Aktivierung von IL-17RA führt über ACT-1 zur Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen NF- κ B, C/EBP β und $-\delta$ und MAP-Kinasen wie P38, JNK und ERK. Über diese Transkriptionsfaktoren kommt es dann wiederum zur Transkription von Chemokinen, Zytokinen und anti-inflammatorischen Genen.

2.8 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und Abgabe der IL-17-Zytokinfamilie in Atemwegsepithelzellen als Reaktion auf die Stimulation mit unterschiedlichen Bakterien und mikrobiellen Pathogenen zu charakterisieren. Auch die Untersuchung der Expression der spezifischen Rezeptoren für IL-17C IL-17RE und IL-17RA durch Atemwegsepithelzellen war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Von besonderem Interesse war darüber hinaus die Untersuchung des kürzlich für epidermale Keratinozyten und Darmepithel beschriebenen autokrinen Mechanismus, durch welchen angeborene epitheliale Immunmechanismen als Reaktion auf bakterielle Pathogene autokrin verstärkt werden. Weiterhin wurde der Einfluss akuter Rauchexposition auf die Expression von IL-17C *in vitro* und *in vivo* und auf die Expression IL-6 *in vitro* untersucht. Zu guter Letzt wurde die Beteiligung von IL-17C an der Entzündungsreaktion im Atemwegsepithel von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Calu-3 Zellen (cultured human airway epithelial cells) wurde mit DMEM/F12 (Dulbecco's Modifizierte Medien, Life Technologies, Germany) Medium durchgeführt, welchem 10 % FCS (fetal calf serum, Life Technologies, Germany), 100IU/ml Penicillin G (Life Technologies, Germany) und 100 IU/ml Streptomycinsulphat (Life Technologies, Germany) zugesetzt wurde. Sie wurden auf 12-Well-Platten (Greiner Bio-One, Germany) bei 37°C inkubiert und das Medium alle zwei Tage gewechselt, bis sie sich auf eine Konfluenz von ca. 70 – 90 % geteilt hatten, um schließlich für die entsprechenden Experimente genutzt zu werden. Die primären humanen Atemwegsepithelzellen wurden von fünf individuellen Patienten gewonnen, welche aufgrund eines Bronchialkarzinoms in der Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes operiert wurden. Zuvor wurde von diesen ihre informierte Einwilligung eingeholt und das Protokoll durch das Ethikkomitee der Universitätsklinik des Saarlandes genehmigt. Die Zellen wurden von den großen oberen Atemwegen isoliert und kultiviert wie bereits beschrieben [52]. Die primären Atemwegsepithelzellen wurden mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) kultiviert, auf 12-Well-Platten ausgesät, bei 37°C inkubiert und alle zwei Tage das Medium gewechselt, bis sie sich bis auf eine Konfluenz von ca. 70 – 90 % geteilt hatten, um schließlich für die entsprechenden Experimente genutzt zu werden. Da Einflüsse von Zytotoxizität ausgeschlossen werden sollten, wurde diese durch ein LDH-Cytotoxicity Assay Kit (Laktat-Dehydrogenase, Abcam, UK) bestimmt, welches nach den Herstellerangaben benutzt wurde (Abcam, Germany).

Zigarettenrauchextrakt (CSE) wurde wie folgt hergestellt. Der Rauch von zwei 3R4F Referenzzigaretten (College of Agriculture, Reference Cigarette Program, University of Kentucky, Lexington, USA) wurde durch 20 ml PBS (phosphate-buffered saline) in einer Geschwindigkeit von 2 Zigaretten innerhalb von 5 Minuten gesprudelt. Um die gewünschte Konzentration für die durchgeführten Experimente zu erhalten, wurde das CSE in Kulturmedium 1:100 verdünnt und danach unverzüglich gebraucht. Die auf Transwelleinlagen (Corning, USA) kultivierten Calu-3 Zellen wurden für 5 Minuten volatiltem Rauch ausgesetzt, wie zuvor beschrieben [10].

3.2 Bakterienstämme und bakterielle Produkte

Für die durchgeführten Experimente wurden folgende Bakterienstämme verwendet: Der *P. aeruginosa* Stamm PAO1, *H. influenzae* (Hi; Typ B) und ein Patientenisolat eines nicht näher bestimmten *H. influenzae* (NTHi). Der *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 wurde über Nacht bei 37°C auf LB (lysogeny broth) Agar-Platten inkubiert, am nächsten Tag erneut in LB-Medium für 2 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert und schließlich mit PBS (Life Technologies, Germany) gewaschen und in PBS resuspendiert. Die beiden *H. influenzae* Stämme wurden über Nacht bei 37°C auf Chocolate Agar-Platten bei 5 % CO₂-Gehalt der Luft im Brutschrank wachsen gelassen, um am nächsten Tag direkt von den Platten für die Experimente entnommen zu werden. Es wurden jeweils passende Verdünnungen ausplattiert, um die bakteriellen Titer, mit denen gearbeitet wurde, zu bestimmen. Für die Gewebekulturexperimente wurden hitzeinaktivierte Bakterien verwendet. Dafür wurden sie für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und danach bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Calu-3- und HBECs (human bronchial epithelial cells) wurden also mit hitzeinaktivierten Bakterien und bakteriellen Faktoren, gelöst im entsprechenden Kulturmedium, versetzt. Die Bezugsquellen der verwendeten bakteriellen Faktoren sind folgende: poly (I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid) und Flagellin (Invitrogen, Frankreich) und IL-17C (R&D, USA).

3.3 RNA Isolation und qRT-PCR

Die Gesamt-RNA der untersuchten Zellen wurde gemäß Herstellerangaben mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Machery-Nagel, Germany) isoliert. Danach wurde 1µg der isolierten Gesamt-RNA mit dem RevertAid First Strand cDNA (complementary DNA) Synthesis Kit (Thermo Scientific, Germany) gemäß den Herstellerangaben revers zu cDNA transkribiert. Die qRT-PCRs (quantitative real-time polymerase chain reaction) wurden mit einem Reaktionsansatz durchgeführt, welcher den SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, Germany) enthielt. Als Gerät wurde der iCycler (Bio-Rad Laboratorys, Germany) mit einem zwei Stufen Protokoll verwendet (15sec bei 95°C/ 45 sec bei 60°C). Um die Spezifität der Amplifikationen zu kontrollieren, wurden Schmelzkurvenanalysen und Gelelektrophoresen durchgeführt. Als Analyseverfahren der qRT-PCR Resultate bediente man sich der $\Delta\Delta CT$ -Methode [43]. Als interner Standard wurde β -Actin zur Normalisierung der mRNA Menge benutzt. Folgende Primersequenzen wurden eingesetzt: h β -Actin: 5'-AGA GCT ACG AGC

TGC CTG AC-3' (forward), 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3' (reverse); hIL-17B: 5'-CAA CTT GCA GCT GTG GAT GT -3' (forward), 5'- ACA GGA ACC TGG CTG AAC AC -3' (reverse); hIL-17D: 5'- GGG CCA ATT TGT GGT TAA GA-3' (forward), 5'- GCC TCC AGA TTG ATC TCT GC -3' (reverse); hIL-17E: 5'- CGA CCC AGA TTA GGT GAG GA -3' (forward), 5'- TCC ATC TTC ACT GGC CCT AC -3' (reverse); mGAPDH: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3' (forward), 5'- CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA -3' (reverse). h/mIL-17C, IL-17RA und IL-17RE TaqMan qRT-PCRs wurden durchgeführt wie zuvor beschrieben [4, 14]. Alle Primer wurden von Metabion (Germany) bezogen.

3.4 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-17A/F, IL-17C und IL-6 wurden enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) durchgeführt. Als Reader wurde ein Tecan Ultra 384 ELISA Reader und als Software Magellan (Tecan, Germany) verwendet. Die ELISA-Kits wurden von R&D (USA) bezogen und nach den Anweisungen des Herstellers benutzt.

3.5 siRNA Experimente

Bei den siRNA (small interfering RNA) Experimenten wurden Calu-3 Zellen mit siRNA spezifisch für IL-17C (50nM, Santa Cruz Biotechnology, USA) unter Zuhilfenahme von Lipofectamine RNAiMAX Transfectionsreagent (Qiagen, Germany) transfiziert. Es wurden Kontrollen gebildet, indem Calu-3 Zellen mit 50 nM unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Dann wurden die Zellen über Nacht in DMEM/F12-Medium ohne FBS (fetal bovine serum) und Antibiotika inkubiert und am nächsten Tag zwei Stunden mit oder ohne *P. aeruginosa* behandelt. Nach zweimaligem waschen (PBS) wurde für weitere 24 Stunden mit frischem DEMEM/F12 ohne FBS inkubiert. Schließlich wurden die Überstände gewonnen und bei -80°C eingefroren.

3.6 Westernblot

Die HBECs wurden für 72 Stunden mit oder ohne *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit RIPA (radioimmunoprecipitation assay)-Buffer versetzt und schließlich mit Protease-Inhibitor (Roche, Swiss) lysiert. Die totalen Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) bestimmt, um eine Beladung mit äquivalenten Proteinenmengen zu gewährleisten. Die Proteine wurden durch ein 10%iges Polyacrylamidgel separiert und danach auf eine Nitocellulosemembran (Biorad, Germany) transferiert. Der IL-17RA Rezeptor wurde mit einem polyklonalen Antikörper von der Ziege detektiert, welcher von R&D (USA) bezogen wurde und der IL-17RE Rezeptor mit einem polyklonalen Antikörper vom Hasen, welcher von Proteintech (UK) bezogen wurde. Als sekundäre Antikörper wurden HRP-Konjugierte Esel Anti-Ziege und Esel Anti-Hase-Antikörper verwendet, welche beide von Santa Cruz Biotechnology (USA) bezogen wurden.

3.7 Mausexperimente

Weibliche C57BL/6N Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und alle Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes entsprechend der nationalen Richtlinien zur Behandlung von Tieren überwacht. Um die IL-17C Expression in den Lungen als Reaktion auf eine bakterielle Infektion zu bestimmen, wurden die Mäuse leicht mit einer intraperitonealen Injektion von 2,6 Milligramm Ketaminhydrochlorid (Ketanest; Pfizer, Germany) und 0,18 Milligramm Xylazinhydrochlorid (Ropun; Bayer, Germany) pro Maus betäubt und danach mit hitzeinaktivierten Bakterien gelöst in PBS oder nur PBS als Kontrolle intranasal infiziert. Zum Ende der bakteriellen Stimulation wurden die Tiere euthanasiert und die Lungen zur Isolation der RNA entfernt. In einem anderen Experiment wurden die Mäuse in einer Plexiglas Box Zigarettenrauch exponiert (CS, 3R4F Referenzzigaretten). Die Rauchkonzentration in der Box betrug zwischen 400 - 500 mg/m³ TSP (total suspended particles). Nach der finalen Rauchexposition wurden die oberen Atemwege der Mäuse mit Bakterien infiziert, wie zuvor beschrieben [6]. In Kürze, die Mäuse wurden ohne Betäubung mit 10 µl einer Lösung intranasal inokuliert, welche mit PBS gewaschene Bakterien in der mittleren Log-Phase enthielten. Nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, die Trachea kanüliert und 400 ml PBS instilliert. Aus den Nasen wurde Spülflüssigkeit entnommen um die Anzahl der lebenden Bakterien als CFU (colony forming units) mittels einer auf

Chocolate-Agar ausplattierten Verdünnungsreihe zu bestimmen. Die RNA des die oberen Atemwege auskleidenden Gewebes wurde gewonnen, indem wie zuvor beschrieben [6], 400 µl Lysepuffer (Macherey-Nagel, Deutschland) instilliert wurde.

3.8 Immunohistochemie

Bronchialgewebe wurde von Patienten gewonnen, die aufgrund einer Lungentransplantation (Patienten mit Zystischer Fibrose oder COPD), einer Resektion eines Bronchialkarzinoms oder eines Asperilloms operiert wurden. Die Patienten mit COPD und Zystischer Fibrose hatten zum Zeitpunkt der Transplantation keine akute infektiöse Exazerbation. Das Protokoll ist vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums des Saarlandes genehmigt worden und von den Patienten wurde informierte Einwilligung eingeholt. Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch gefärbt, wie zuvor beschrieben [6]. IL-17C (R&D) wurde mit primären Antikörpern 1:50 verdünnt in PBS (1x PBS (pH 7,2), 0.1% bovine serum albumin) detektiert, wobei dazu ein biotinylierter sekundärer Antikörper (Dako, Denmark) gefolgt von einem avidin-horseradish peroxidase reagent (EnVision System (AEC), DAKO, Denmark) eingesetzt wurde.

3.9 Statistische Analysen

Die Werte sind als Durchschnittswerte \pm Standardfehler angegeben. Die Gruppen wurden mittels T-Test (two-sided), Mann-Whitney rank sum Test oder ANOVA verglichen, wenn es sich um Experimente mit mehr als zwei Subgruppen handelte. Post hoc range Tests wurden mit einem two sided T-Test mit Bonferroni Anpassung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0.05$. Alle statistischen Tests wurden mit der Software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

3.10 Stimulationsversuche

Auswirkung bakterieller Infektion und Stimulation mit TLR-Liganden auf die Ausschüttung und Expression von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils für folgende Zeiträume mit Bakterien beziehungsweise bakteriellen oder viralen Pathogenen stimuliert. Einmal wurde für 4 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* und einmal mit 1mg/ml Flagellin inokuliert. Des Weiteren wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen jeweils einmal für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, mit 1mg/ml Flagellin oder mit 1mg/ml poly (I:C) inokuliert. Darüber hinaus wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 48 Stunden mit 10^8 CFU/ml *H. influenzae* inokuliert. Als Kontrollen dienten jeweils primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für die entsprechenden Zeiträume nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne entsprechende Bakterien oder bakterielle Faktoren inokuliert wurden. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die Konzentration von IL-17C in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen jeweils einmal für 4 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, mit 1mg/ml Flagellin oder mit 1mg/ml poly (I:C) inokuliert und einmal für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, mit 1mg/ml Flagellin oder mit 1mg/ml poly (I:C). Als Kontrollen dienten wieder jeweils primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für die entsprechenden Zeiträume nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne entsprechende Bakterien oder bakterielle Faktoren inokuliert wurden. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die epitheliale RNA isoliert und durch quantitative RT-PCR die Induktion von IL-17C bestimmt.

Auswirkung bakterieller Infektion auf die Ausschüttung von IL-17C durch die Tumorzelllinie Calu-3

Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 wurden jeweils einmal für 4 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* und für 4 Stunden mit 10^8 CFU/ml *H. influenzae* inokuliert. Als Kontrollen dienten jeweils Zellen der Tumorzelllinie Calu-3, die für 4 Stunden nur mit DMEM/F12 (Life Technologies, Germany) Medium ohne entsprechende Bakterien inokuliert wurden. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die Konzentration von IL-17C in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Untersuchung der Expression und Induktion der sechs bekannten IL-17 Zytokine durch primäre humane Atemwegsepithelzellen und Calu-3 Zellen

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils einmal für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, poly (I:C) (1 μ g/ml) oder Flagellin (1 μ g/ml) stimuliert. Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 wurden einmal für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* stimuliert. Als Kontrollen dienten im Falle der primären humanen Atemwegsepithelzellen Zellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne entsprechende Bakterien oder bakterielle Faktoren inokuliert wurden und im Falle von Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 Zellen, die für 4 Stunden nur mit DMEM/F12 (Life Technologies, Germany) Medium ohne entsprechende Bakterien inokuliert wurden. Im Anschluss wurden zum einen die Überstände auf die entsprechenden ELISA aufgetragen und zum anderen die epitheliale RNA isoliert. Daraufhin wurde die Induktion der entsprechenden Zytokine durch quantitative qRT-PCR und die Ausschüttung der entsprechenden Zytokine mittels ELISA bestimmt.

Untersuchung der Expression der Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE durch primäre humane Atemwegsepithelzellen mittels qRT-PCR und Westernblot

In einem Versuch wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* stimuliert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden ohne *P. aeruginosa*, nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Expression der Rezeptoren IL-17 RA und –RE durch qRT-PCR bestimmt. In einem weiteren Versuch wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 72 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* stimuliert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 72 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Expression von IL- 17RA und IL-17RE mittels Westernblot, wie weiter oben beschrieben, bestimmt.

Darüber hinaus wurde auch ein Versuch mit Calu-3 Zellen unternommen, bei dem Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* stimuliert wurden. Als Kontrollen dienten Zellen der Tumorzelllinie Calu-3, die für 24 Stunden nur mit DMEM/F12 (Life Technologies, Germany) Medium ohne *P. aeruginosa* inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Expression von IL- 17RA mittels qRT-PCR bestimmt.

Auswirkung serieller Stimulation primärer humaner Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17A/F auf die Ausschüttung von IL-8

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden einmal für 76 Stunden mit 10×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und im Anschluss an die Ruhephase erneut 16 Stunden unter Zugabe von 50 ng/ml IL-17A/F inkubiert. In wieder einem anderen Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit 10×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von 50 ng/ml IL-17A/F inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 76 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* inkubiert wurden, danach mit frischem Medium gewaschen wurden, für 24 Stunden ruhen gelassen wurden und im Anschluss an die Ruhephase erneut für 16 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne IL-17A/F inkubiert wurden.

Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die Konzentration von IL-8 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung serieller Stimulation primärer humaner Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17A/F auf die Ausschüttung von IL-6

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden einmal für 76 Stunden mit 10×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und im Anschluss an die Ruhephase erneut 16 Stunden unter Zugabe von 50 ng/ml IL-17A/F inkubiert. In wieder einem anderen Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit 10×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium

gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von 50 ng/ml IL-17A/F inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 76 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* inkubiert wurden, danach mit frischem Medium gewaschen wurden, für 24 Stunden ruhen gelassen wurden und im Anschluss an die Ruhephase erneut für 16 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne IL-17A/F inkubiert wurden. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die Konzentration von IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung simultaner Stimulation primärer humaner Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17A/F auf die Ausschüttung von IL-6

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils einmal für 72 Stunden mit 10×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, 10 ng/ml IL-17A/F oder 10×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* zusammen mit 10 ng/ml IL-17A/F inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 72 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* oder IL-17A/F inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Konzentration von IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung simultaner Stimulation primärer humaner Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17C auf die Ausschüttung von IL-6

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils einmal für 24 Stunden mit 0.5×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, 50 ng/ml IL-17C oder 0.5×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* zusammen mit 50 ng/ml IL-17C inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* oder IL-17C inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Konzentration von IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung simultaner Stimulation primärer humaner Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17C auf die Expression von hBD-2

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils einmal für 24 Stunden mit 5×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, 50 ng/ml IL-17C oder 5×10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* zusammen mit 50 ng/ml IL-17C inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen,

die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* oder IL-17C inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Expression von hBD-2 mittels qRT-PCR bestimmt.

Auswirkung der Suppression von IL-17C durch siRNA auf die Ausschüttung von IL-17C durch Zellen der Tumorzelllinie Calu-3

Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 Zellen wurden jeweils einmal für 24 Stunden mit 50 nM unspezifischer Kontroll-siRNA, 50 nM unspezifischer Kontroll-siRNA und 10^7 CFU /ml *P. aeruginosa*, 50nM spezifischer siRNA für IL-17C oder 50nM spezifischer siRNA für IL-17C und 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert. Im Anschluss wurde die Ausschüttung von IL-17C in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung der Suppression von IL-17C durch siRNA auf die Ausschüttung von IL-6 durch Zellen der Tumorzelllinie Calu-3

Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 Zellen wurden jeweils einmal für 24 Stunden mit 50 nM unspezifischer Kontroll-siRNA, 50 nM unspezifischer Kontroll-siRNA und 10^7 CFU /ml *P. aeruginosa*, 50nM spezifischer siRNA für IL-17C oder 50nM spezifischer siRNA für IL-17C und 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert. Im Anschluss wurde die Ausschüttung von IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung der Exposition primärer humaner Atemwegsepithelzellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt auf die Ausschüttung und Expression von IL-17C bei Stimulation mit *P. aeruginosa* beziehungsweise poly (I:C)

In einem ersten Versuch wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen jeweils einmal für 6 Stunden mit 1%igem Zigarettenrauchextrakt, 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* oder 1%igem Zigarettenrauchextrakt zusammen mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 6 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne *P. aeruginosa* oder Zigarettenrauchextrakt inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Ausschüttung von IL- 17C mittels ELISA bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen jeweils einmal für 24 Stunden gegenüber 1%igem Zigarettenrauchextrakt, 1mg/ml poly (I:C) oder 1% igem Zigarettenrauchextrakt zusammen mit 1mg/ml poly (I:C) exponiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth

Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne Zigarettenrauchextrakt oder poly (I:C) inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Ausschüttung von IL-17C mittels ELISA bestimmt.

Darüber hinaus wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem primäre humane Atemwegsepithelzellen jeweils einmal für 24 Stunden mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa*, $1\mu\text{g/ml}$ poly (I:C), 1%igem Zigarettenrauchextrakt, 1%igem Zigarettenrauchextrakt zusammen mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* oder 1%igem Zigarettenrauchextrakt zusammen mit $1\mu\text{g/ml}$ poly (I:C) inkubiert wurden. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne Zigarettenrauchextrakt, poly (I:C) oder *P. aeruginosa* inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Expression von IL-17C mittels qRT-PCR bestimmt.

Auswirkung der Exposition primärer humaner Atemwegsepithelzellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt auf die Ausschüttung von IL-6 bei Stimulation mit *P. aeruginosa*

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils einmal für 24 Stunden mit 1%igem Zigarettenrauchextrakt, 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* oder 1%igem Zigarettenrauchextrakt zusammen mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) ohne Zigarettenrauchextrakt, poly (I:C) oder *P. aeruginosa* inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Ausschüttung von IL-6 mittels ELISA bestimmt.

Auswirkung der Exposition von Calu-3 Zellen gegenüber volatiltem Zigarettenrauch auf die Ausschüttung von IL-17C

In Transwells kultivierte Calu-3 Zellen wurden einmal in einer Rauchbox für 5 Minuten direkt volatiltem Rauch ausgesetzt und im Anschluss für 24 Stunden apikal nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) inkubiert. Außerdem wurden in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen einmal 5 Minuten Raumluft ausgesetzt und danach für 24 Stunden apikal mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* infiziert. Weiterhin wurden in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen einmal für 5 Minuten in einer Rauchbox direkt volatiltem Zigarettenrauch (CS) ausgesetzt und danach für 24 Stunden apikal mit 10^7 CFU/ml *P. aeruginosa* infiziert. Als Kontrollen dienten in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen die 5 Minuten Raumluft ausgesetzt und danach für 24 Stunden apikal mit Epithelial Cell Growth

Medium mit zugegebenem Supplement Pack (PromoCell, Germany) inkubiert wurden. Anschließend wurde die basolaterale Abgabe von IL-17C mittels ELISA bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Bakterielle Pathogene induzieren die Expression und Ausschüttung von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen

Atemwegsepithelzellen erkennen virale und bakterielle Pathogene mit Hilfe von PRRs wie zum Beispiel TLRs, was wiederum zur Expression und Abgabe verschiedener inflammatorischer Mediatoren und antimikrobieller Peptide führt. Die Bildung von IL-17 Zytokinen durch Immunzellen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht [14, 41, 67]. Über die Expression der IL-17 Zytokine in Atemwegsepithelzellen bei bakterieller und viraler Infektion ist bisher jedoch wenig bekannt. Um die Expression und Ausschüttung von IL-17A bis -F in Atemwegsepithelzellen zu untersuchen, wurden daher primäre humane Atemwegsepithelzellen und Zellen der epithelialen Tumorzelllinie Calu-3 mit bakteriellen Pathogenen, bakteriellen und viralen Faktoren infiziert. Eine Infektion humaner Atemwegsepithelzellen mit dem *P. aeruginosa* Stamm PAO1, einem Patientenisolat eines unbekapselten *H. influenzae* (NTHi), Flagellin (TLR5 Ligand) und poly (I:C) (TLR3 Ligand) führte zu einer verstärkten Expression und Abgabe von IL-17C, wie durch ELISA (Abbildung 4) und qRT-PCR (Abbildung 5) gezeigt. Die Ausschüttung von IL-17C in die Überstände primärer humaner Atemwegsepithelzellen konnte bereits 4 Stunden nach Infektion mit *P. aeruginosa* und Flagellin nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei Stimulation mit *H. influenzae* oder poly (I:C) noch kein IL-17C in den Überständen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass es bei verlängerter, 24 stündiger Stimulation mit *P. aeruginosa* und Flagellin zu einer entsprechend der Dauer der Stimulation gesteigerten Konzentration von IL-17C in den Überständen kam. Bei dieser verlängerten Stimulation auf 24 Stunden konnte schließlich auch mit poly (I:C) eine Ausschüttung von IL-17C in den Überständen nachgewiesen werden. Um eine Ausschüttung von IL-17C in die Überstände durch Stimulation mit *H. influenzae* zu erreichen, war eine 48 stündige Stimulation nötig.

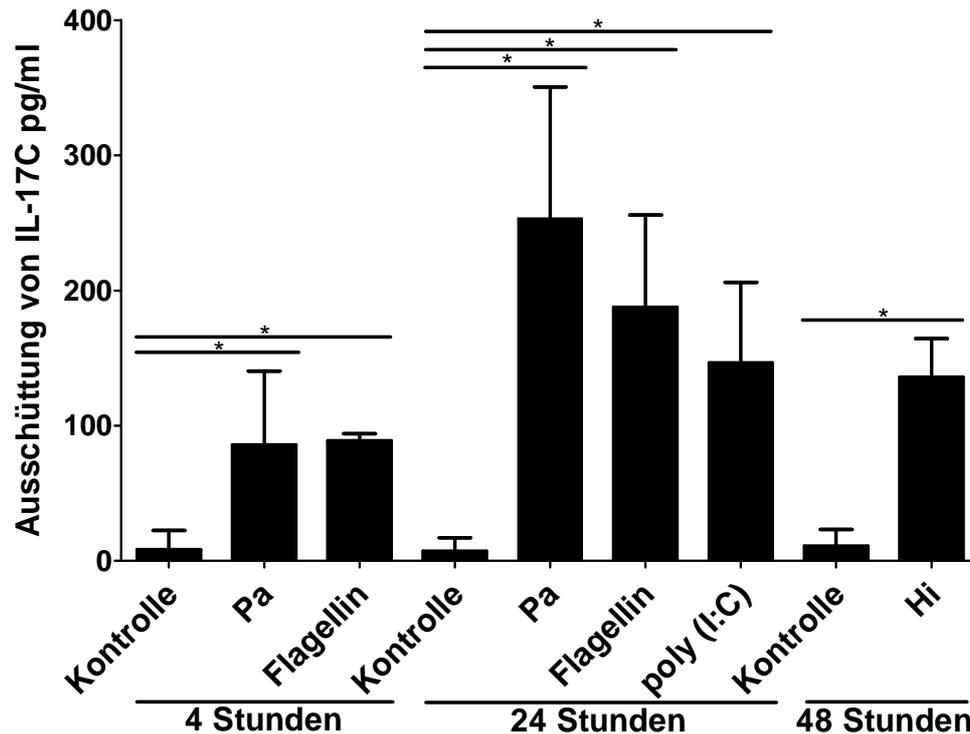


Abbildung 4: Bakterielle Infektion und TLR-Liganden induzieren die Ausschüttung von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen:

Humane Atemwegsepithelzellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Flagellin (1 mg/ml), poly (I:C) (1 mg/ml), *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) oder *H. influenzae* (Hi; 10^8 CFU/ml) inokuliert und die IL-17C Konzentrationen in den Überständen der Zellen mittels ELISA bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für die entsprechenden Zeiträume nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne entsprechende Bakterien oder bakterielle Faktoren inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) (standard error of the mean) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Übereinstimmend mit den ermittelten Konzentrationen von IL-17C in den Zellkulturüberständen konnte bei 4 stündiger Stimulation mit *P. aeruginosa*, Flagellin oder poly (I:C) auch eine verstärkte Expression von IL-17C mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Nach 24 stündiger Stimulation mit *P. aeruginosa* oder poly (I:C) zeigte sich eine in Übereinstimmung mit den durch ELISA erhobenen Daten entsprechend der verlängerten Dauer der Stimulation gesteigerte Expression der IL-17C mRNA. Bei der längeren Stimulationsdauer mit Flagellin für 24 Stunden zeigte sich eine geringere Expression von IL-17C als bei der kürzeren Stimulationsdauer für 4 Stunden.

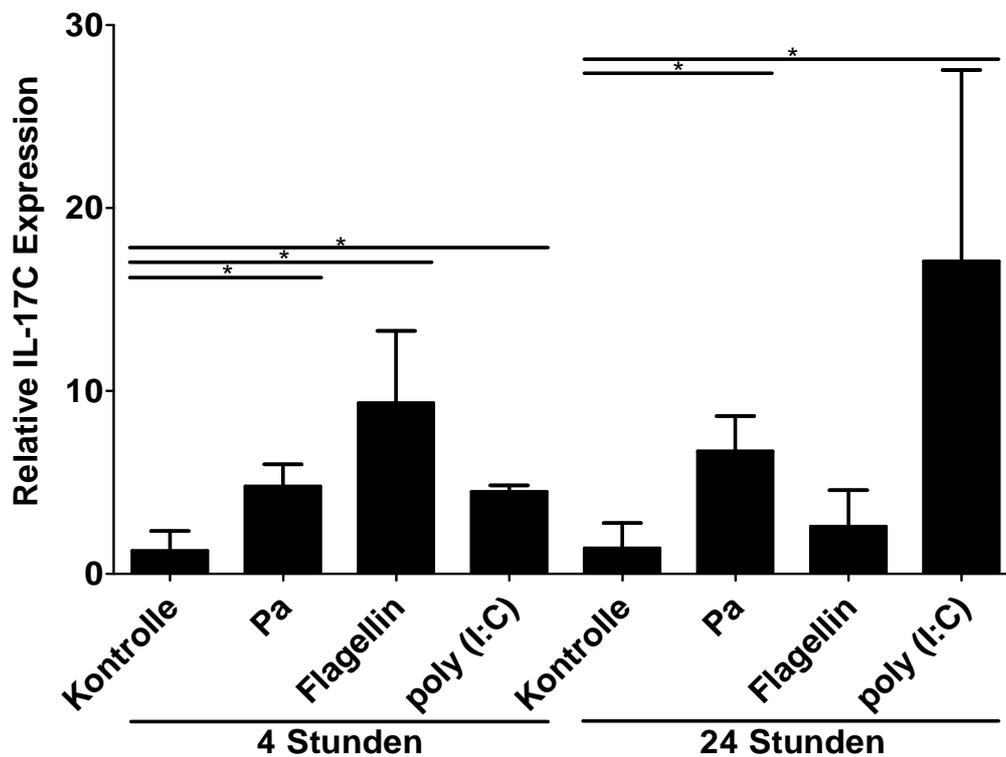


Abbildung 5: Bakterielle Infektion induziert die Expression von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Flagellin (1 mg/ml), poly (I:C) (1 mg/ml), *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) oder *H. influenzae* (Hi; 10^8 CFU/ml) inokuliert. Danach wurde die epitheliale RNA isoliert und durch qRT-PCR die Induktion von IL-17C bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für die entsprechenden Zeiträume nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne entsprechende Bakterien oder bakterielle Faktoren inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Als nächstes wurde untersucht, ob es auch bei Stimulation der Tumorzelllinie Calu-3 mit *P. aeruginosa* oder *H. influenzae* (NTHi) zu einer Ausschüttung von IL-17C kommt. Bei beiden Bakterienstämmen konnte bereits nach 4 stündiger Stimulation eine verstärkte Ausschüttung von IL-17C mittels ELISA nachgewiesen werden (Abbildung 6).

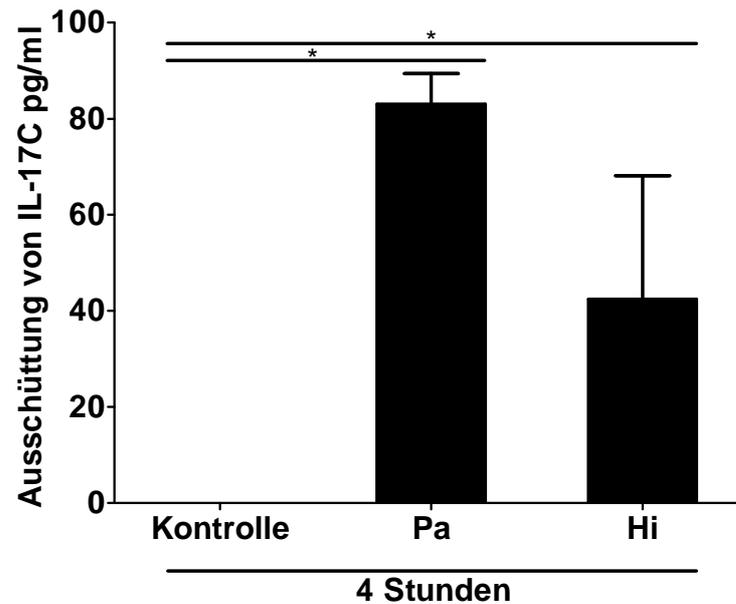


Abbildung 6: Bakterielle Infektion induziert die Ausschüttung von IL-17C durch die epitheliale Tumorzelllinie Calu-3:

Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 wurden für 4 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) beziehungsweise *H. influenzae* (Hi; 10^8 CFU/ml) inokuliert und die IL-17C Konzentrationen in den Überständen der Zellen mittels ELISA bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils Zellen der Tumorzelllinie Calu-3, die für 4 Stunden nur mit DMEM/F12 Medium ohne entsprechende Bakterien inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Des Weiteren wurde die Expression der übrigen 5 Mitglieder der IL-17-Familie untersucht. Dabei zeigte sich, dass IL-17D von humanen Atemwegsepithelzellen und Calu-3 Zellen konstitutiv expremiert wird, eine Infektion von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa*, poly (I:C) oder Flagellin und eine Infektion von Calu-3 mit *P. aeruginosa* aber nicht zu einer weiteren Induktion von IL-17D führte. Die Expression von IL-17A, -B, -E und -F lag bei gleicher Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen und Calu-3 Zellen unter der Nachweisgrenze und war dementsprechend auch nicht induzierbar (Abbildung 7).

IL-17 Zytokine	Calu-3		Atemwegsepithelzellen	
	expremiert	induziert	expremiert	induziert
IL-17A (1)	Nein	Nein	Nein	Nein
IL-17B (2)	Nein	Nein	Nein	Nein
IL-17C (1,2)	Ja	Ja	Ja	Ja
IL-17D (2)	Ja	Nein	Ja	Nein
IL-17E (2)	Nein	Nein	Nein	Nein
IL-17F (1)	Nein	Nein	Nein	Nein

1= ELISA; 2= qRT-PCR

Abbildung 7: Primäre humane Atemwegsepithelzellen und Calu-3 Zellen expremieren von den insgesamt sechs bekannten IL-17 Zytokinen nur IL-17C und IL-17D, darüber hinaus induzierbar ist nur IL-17C:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml), poly (I:C) (1µg/ml) oder Flagellin (1µg/ml) stimuliert. Calu-3 Zellen wurden für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) stimuliert. Im Anschluss wurden die Überstände auf die entsprechenden ELISA aufgetragen, die epitheliale RNA isoliert und durch qRT-PCR die Induktion der entsprechenden Zytokine bestimmt. Als Kontrollen dienten im Falle der primären humanen Atemwegsepithelzellen Zellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne entsprechende Bakterien oder bakterielle Faktoren inokuliert wurden. Die Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 Zellen wurden als Kontrolle nur mit DMEM/F12 Medium ohne entsprechende Bakterien inokuliert.

Insgesamt belegen diese Daten, dass IL-17C das einzige Mitglied der IL-17 Familie ist, das in humanen Atemwegsepithelzellen durch bakterielle Stimuli und spezifische Liganden für TLRs induziert werden kann.

Auch im Lungengewebe von Mäusen, welche mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, wurde die Expression von IL-17C untersucht. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *P. aeruginosa* zu einer verstärkten Expression von IL-17C im Lungengewebe führt (Abbildung 8).

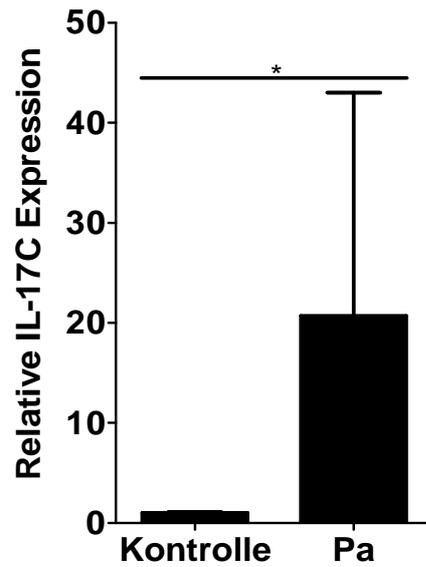


Abbildung 8: IL-17C wird im Lungengewebe von Mäusen expremiert, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden:

Die Lungen weiblicher C57BL/6N Mäuse wurden für 3 Stunden mit *P. aeruginosa* (23×10^7 CFU) gelöst in PBS infiziert. Als Kontrollen dienten Mäuse, die mit reinem PBS scheininfiziert wurden. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Lungen zur Isolation der RNA entnommen und die Expression von IL-17C mittels qRT-PCR bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

4.2 Atemwegsepithelzellen exprimieren die IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE

IL-17C wird durch einen dimeren Rezeptorkomplex aus den Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE erkannt. Die beiden Rezeptoren konnten in primären humanen Atemwegsepithelzellen mittels qRT-PCR (Abbildung 9) und Western Blot Analyse (Abbildung 10) nachgewiesen werden. In Calu-3 Zellen wurde IL-17RA mittels qRT-PCR nachgewiesen (Abbildung 11).

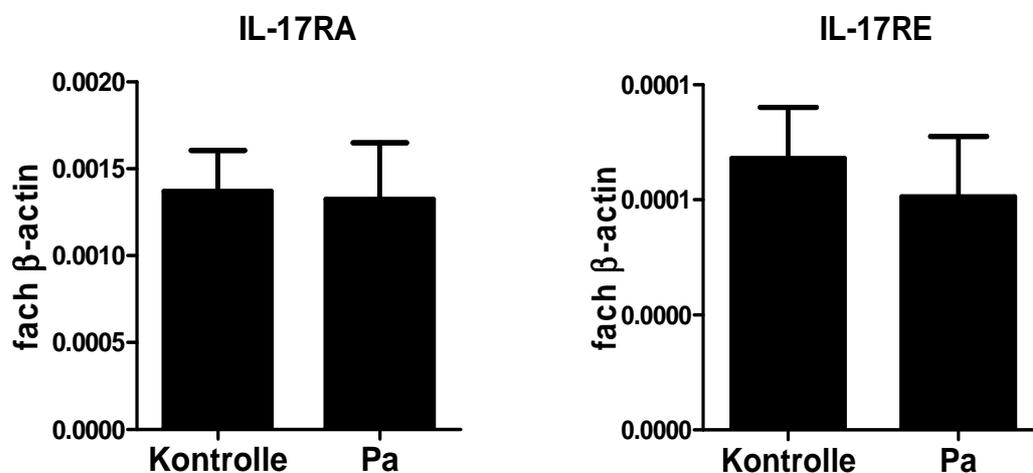


Abbildung 9: Primäre Atemwegsepithelzellen exprimieren die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) stimuliert und die Expression der Rezeptoren IL-17 RA und -RE durch qRT-PCR bestimmt. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe).

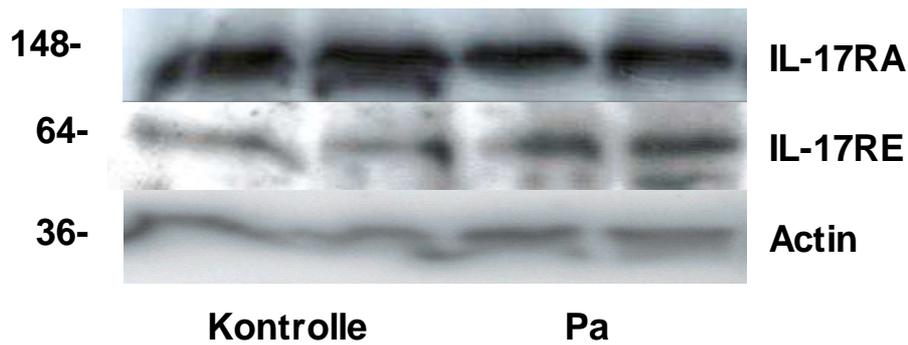


Abbildung 10: Primäre Atemwegsepithelzellen exprimieren die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE:

Primäre Atemwegsepithelzellen wurden für 72 Stunden mit oder ohne *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) stimuliert und im Anschluss die Expression von IL-17RA und IL-17RE mittels Westernblot bestimmt. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 72 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack inokuliert wurden.

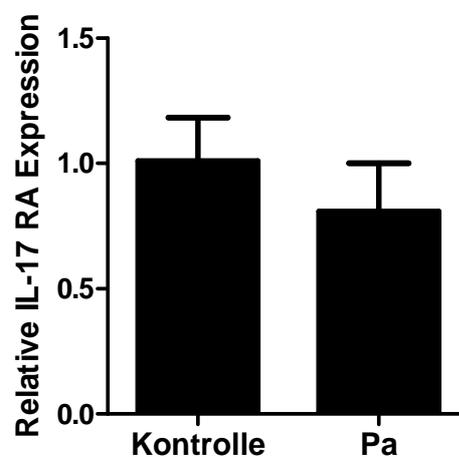


Abbildung 11: Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 exprimieren den IL-17RA Rezeptor:

Calu-3 Zellen wurden für 24 Stunden mit oder ohne *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) stimuliert und im Anschluss die Expression von IL-17RA mittels qRT-PCR bestimmt. Als Kontrollen dienten Zellen der Tumorzelllinie Calu-3, die für 24 Stunden nur mit DMEM/F12 Medium ohne *P. aeruginosa* inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe).

4.3 IL-17A/F verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen von respiratorischen Epithelzellen

Es ist bekannt, dass IL-17A zusammen mit HRV-16 (humanes Rhinovirus) synergistisch die Expression von IL-8 und hBD-2 erhöht [25, 60]. Deshalb wurde untersucht, ob eine serielle Stimulation mit *P. aeruginosa* und IL-17A/F zu einer synergistischen Ausschüttung von IL-6 oder IL-8 führt. Es zeigte sich, dass eine 76 stündige Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* und nachfolgender 16 stündiger Stimulation mit IL-17A/F mit intermittierender 24 stündiger Stimulationspause zu einer synergistischen Ausschüttung von IL-8 (Abbildung 12) und einer additiven Ausschüttung von IL-6 führte (Abbildung 13).

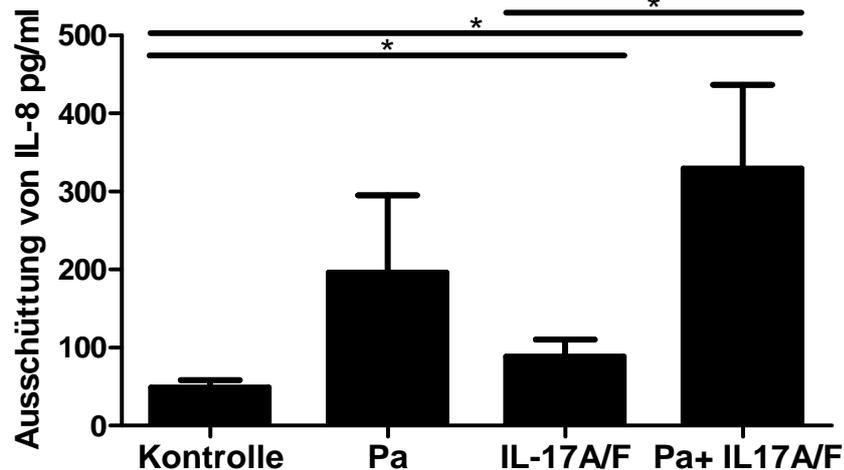


Abbildung 12: Serielle Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17A/F induziert eine synergistische Ausschüttung von IL-8:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden einmal für 76 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10×10^7 CFU/ml) inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und im Anschluss an die Ruhephase erneut 16 Stunden unter Zugabe von IL-17A/F (50 ng/ml) inkubiert. In wieder einem anderen Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10×10^7 CFU/ml) inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von IL-17A/F (50 ng/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 76 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* inkubiert wurden, danach mit frischem Medium gewaschen wurden, für 24 Stunden ruhen gelassen wurden und im Anschluss an die Ruhephase erneut für 16 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne IL-17A/F inkubiert wurden. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die Konzentration von IL-8 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n = 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

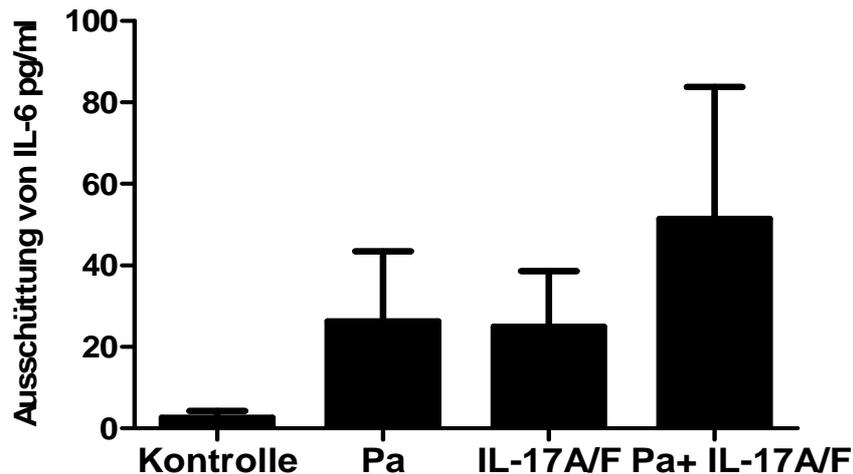


Abbildung 13: Serielle Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17A/F induziert eine additive Ausschüttung des Zytokins IL-6:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden einmal für 76 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10×10^7 CFU/ml) inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und im Anschluss an die Ruhephase erneut 16 Stunden unter Zugabe von IL-17A/F (50 ng/ml) inkubiert. In wieder einem anderen Ansatz wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen für 76 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10×10^7 CFU/ml) inkubiert, danach mit frischem Medium gewaschen, für 24 Stunden ruhen gelassen und erneut 16 Stunden unter Zugabe von IL-17A/F (50 ng/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 76 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* inkubiert wurden, danach mit frischem Medium gewaschen wurden, für 24 Stunden ruhen gelassen wurden und im Anschluss an die Ruhephase erneut für 16 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne IL-17A/F inkubiert wurden. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiträume wurde die Konzentration von IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) (n = 4 pro Gruppe).

Als nächstes wurde nicht seriell, sondern simultan mit *P. aeruginosa* und IL-17A/F für 72 Stunden stimuliert. In diesem Versuch konnte herausgestellt werden, dass eine gleichzeitige Stimulation mit *P. aeruginosa* und IL-17A/F zu einer synergistischen Ausschüttung von IL-6 führt (Abbildung 14).

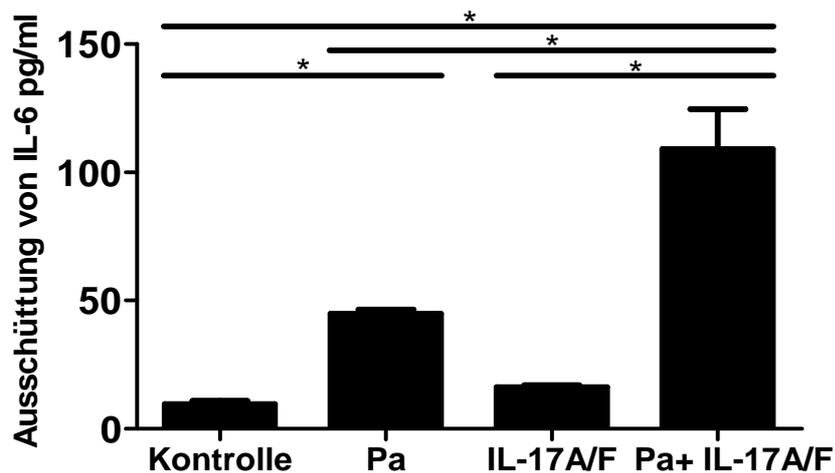


Abbildung 14: Simultane Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und IL-17A/F induziert eine synergistische Ausschüttung des entzündlichen Zytokins IL-6:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils einmal für 72 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 10×10^7 CFU/ml), IL-17A/F (10 ng/ml) oder *P. aeruginosa* (Pa; 10×10^7 CFU/ml) zusammen mit IL-17A/F (10 ng/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 72 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* oder IL-17A/F inokuliert wurden. Im Anschluss wurde die Konzentration von IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) (n = 4 pro Gruppe; *P, 0.05).

4.4 IL-17C verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen von respiratorischen Epithelzellen

Als nächstes wurde untersucht, ob IL-17C die Expression von inflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Faktoren in respiratorischen Epithelzellen induziert, ob diese Induktion autokrin geschieht und ob es zu einer synergistischen Verstärkung der Expression der inflammatorischen Zytokine durch einen autokrinen Mechanismus kommt, wie zuvor bereits für Keratinozyten und Kolonepithelzellen beschrieben. Zu diesem Zweck wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen mit IL-17C inkubiert, was nicht zu einer verstärkten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 führte. Es zeigte sich jedoch, dass es bei einer Co-Inkubation von humanen Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* und IL-17C zu einer synergistisch gesteigerten Ausschüttung von IL-6 kommt (Abbildung 15).

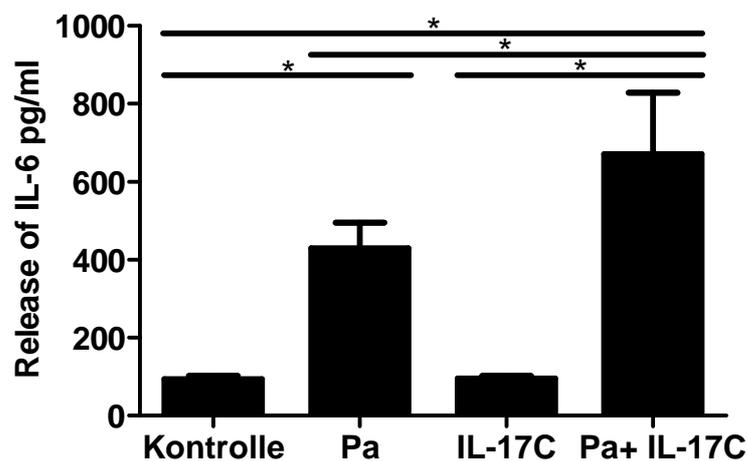


Abbildung 15: IL-17C und Bakterien induzieren synergistisch die Ausschüttung des entzündlichen Zytokins IL-6 durch primäre humane Atemwegsepithelzellen:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 0.5×10^7 CFU/ml), IL-17C (50 ng/ml) oder Pa (0.5×10^7 CFU/ml) zusammen mit IL-17C (50 ng/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* oder IL-17C inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Des Weiteren wurden untersucht, ob eine gleichzeitige Stimulation von humanen Atemwegsepithelzellen mit IL-17C und *P. aeruginosa* auch zu einer synergistischen Expression von hBD-2 führt. Dazu wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen gleichzeitig für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* und IL-17C stimuliert. Es zeigte sich, dass diese gleichzeitige Stimulation zu einer synergistischen Expression von hBD-2 führt. Als Nachweismethode diente die qRT-PCR (Abbildung 16).

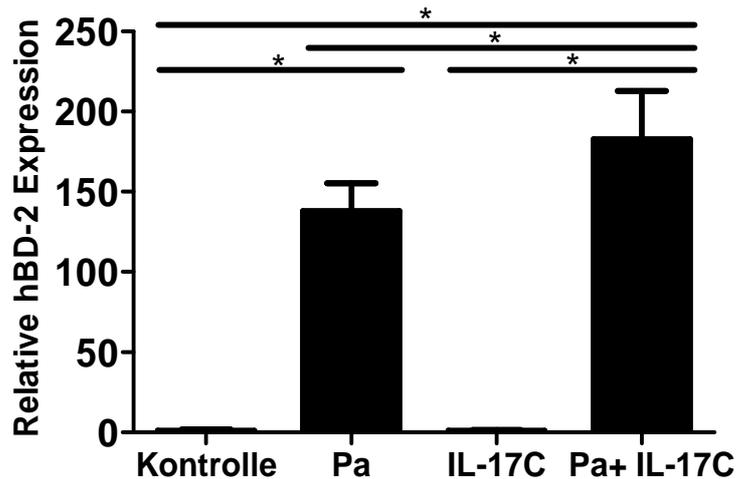


Abbildung 16: Simultane Stimulation primärer humaner Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* und IL-17C induziert eine synergistische Expression von hBD-2:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa; 5×10^7 CFU/ml), IL-17C (50 ng/ml) oder *P. aeruginosa* (Pa; 5×10^7 CFU/ml) zusammen mit IL-17C (50 ng/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* oder IL-17C inokuliert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) (n = 4 pro Gruppe; *P, 0.05).

4.5 IL-17C verstärkt entzündliche Reaktionen während bakterieller Infektionen autokrin

Das Ziel der folgenden Versuche war es, Hinweise dafür zu finden, ob durch primäre humane Atemwegsepithelzellen ausgeschüttetes IL-17C entzündliche Reaktionen während bakterieller Infektionen autokrin verstärkt. Dazu wurden Calu-3 Zellen, in denen die IL-17C Expression durch spezifische siRNA gegen IL-17C mRNA effektiv unterdrückt wurde, auch auf ihre Ausschüttung von IL-6 bei Stimulation mit *P. aeruginosa* untersucht (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass es bei Unterdrückung der Expression von IL-17C durch spezifische siRNA für IL-17C-mRNA auch zu einer reduzierten Ausschüttung von IL-6 kommt (Abbildung 18).

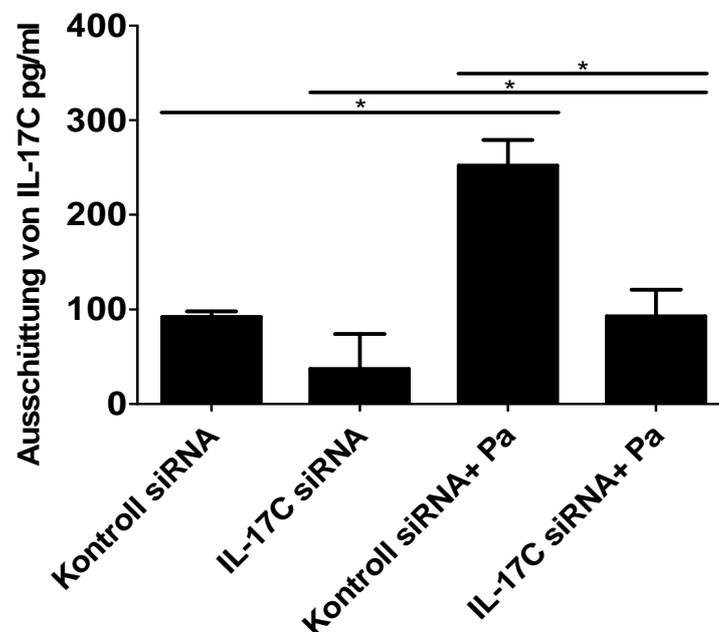


Abbildung 17: Die Ausschüttung von IL-17C durch Zellen der Tumorzelllinie Calu-3 konnte mit spezifischer small interfering RNA effektiv unterdrückt werden:

Calu-3 Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder mit spezifischer siRNA für IL-17C mRNA und mit oder ohne *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) inkubiert. Im Anschluss wurde die IL-17C Konzentration in den Überständen durch ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

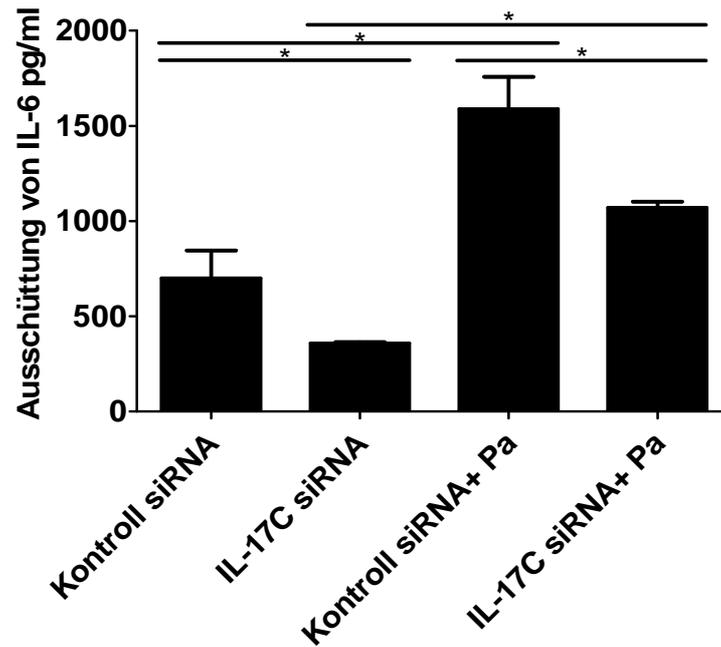


Abbildung 18: IL-17C reguliert bei bakterieller Infektion die Ausschüttung von IL-6 durch Zellen der Tumorzelllinie Calu-3:

Calu-3 Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder mit spezifischer siRNA für IL-17C mRNA und mit oder ohne *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) inkubiert. Darauf wurde die IL-6 Konzentration in den Überständen durch ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

4.6 Zigarettenrauch unterdrückt die Expression von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch die angeborenen Immunmechanismen von respiratorischen Epithelzellen als Reaktion auf bakterielle Pathogene unterdrückt [21, 27]. Um zu untersuchen, ob Zigarettenrauch auch die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen unterdrückt, wurden primäre humane Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* beziehungsweise poly (I:C) unter Anwesenheit von Zigarettenrauchextrakt infiziert. Dabei zeigte sich im ELISA, dass Zigarettenrauchextrakt auch die durch *P. aeruginosa* (Abbildung 19) und poly (I:C)-induzierte Ausschüttung (Abbildung 20) von IL-17C durch humane Atemwegsepithelzellen unterdrückt.

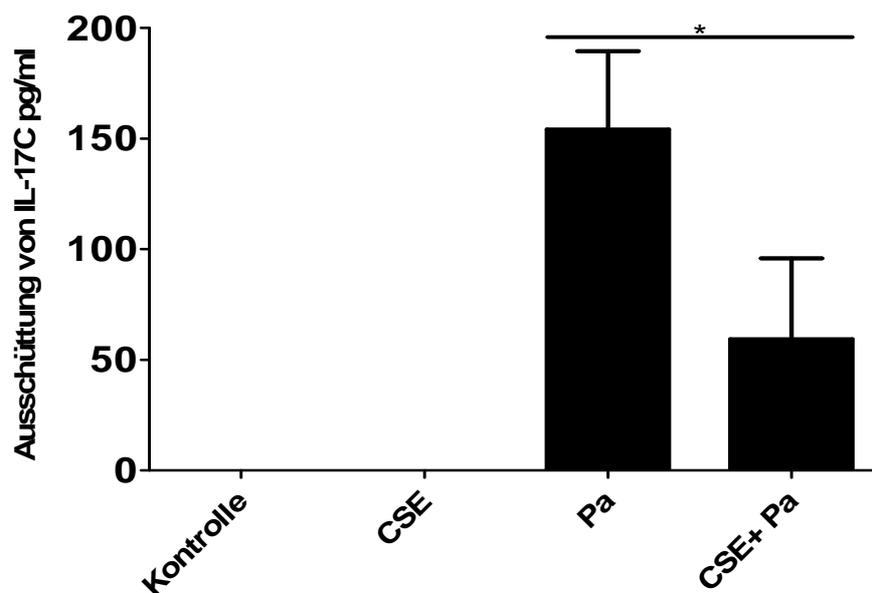


Abbildung 19: Zigarettenrauchextrakt unterdrückt die Ausschüttung von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen bei Infektion mit *P. aeruginosa*:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 6 Stunden mit Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%), *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) oder Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%) zusammen mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) inkubiert. Im Anschluss wurde die Konzentration von IL-17C in den Überständen durch ELISA bestimmt. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 6 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne *P. aeruginosa* oder Zigarettenrauchextrakt inkubiert wurden. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

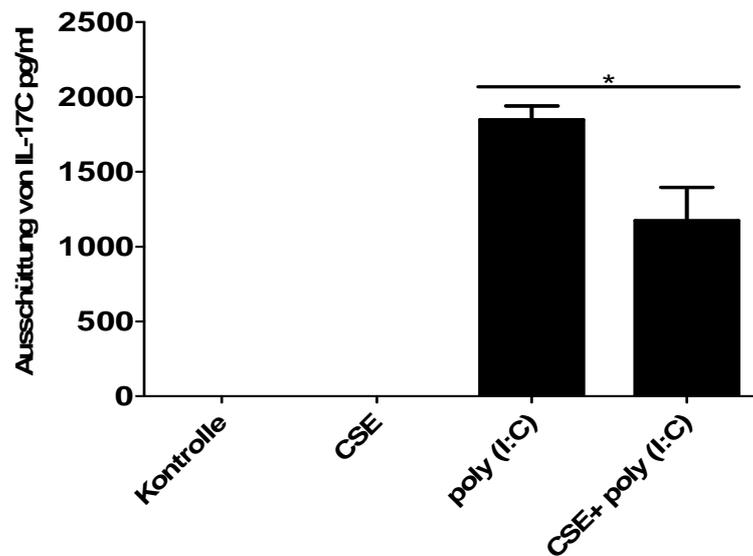


Abbildung 20: Zigarettenrauchextrakt unterdrückt die Ausschüttung von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen bei Infektion mit poly (I:C):

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 24 Stunden mit Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%), poly (I:C) (1mg/ml) oder Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%) zusammen mit poly (I:C) (1mg/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack inkubiert wurden. Danach wurde die Konzentration von IL-17C in den Überständen durch ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

In einem weiteren Versuch konnte zudem durch qRT-PCR gezeigt werden, dass Zigarettenrauchextrakt die IL-17C Expression durch primäre humane Atemwegsepithelzellen auf ein transkriptionelles Niveau unterdrückt (Abbildung 21).

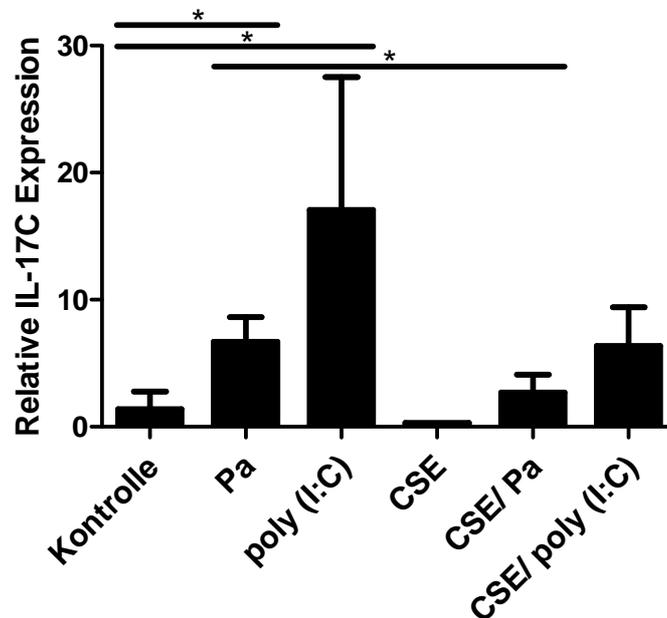


Abbildung 21: Zigarettenrauchextrakt unterdrückt die Ausschüttung von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen bei Stimulation mit *P. aeruginosa* oder poly (I:C):

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden jeweils für 24 Stunden mit *P. aeruginosa* (Pa: 10^7 CFU/ml), mit poly (I:C) ($1\mu\text{g/ml}$), mit Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%), mit Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%) und *P. aeruginosa* (Pa: 10^7 CFU/ml) oder mit Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%) und poly (I:C) ($1\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 24 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Konzentration von IL-17C in den Überständen durch ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch *P. aeruginosa* induzierte Ausschüttung von IL-6 durch primäre humane Atemwegsepithelzellen bei gleichzeitiger Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt signifikant unterdrückt wird (Abbildung 22). Ein LDH -Assay zeigte, dass die beobachteten Effekte nicht auf durch Zigarettenrauch ausgelösten zytotoxischen Effekten beruhen.

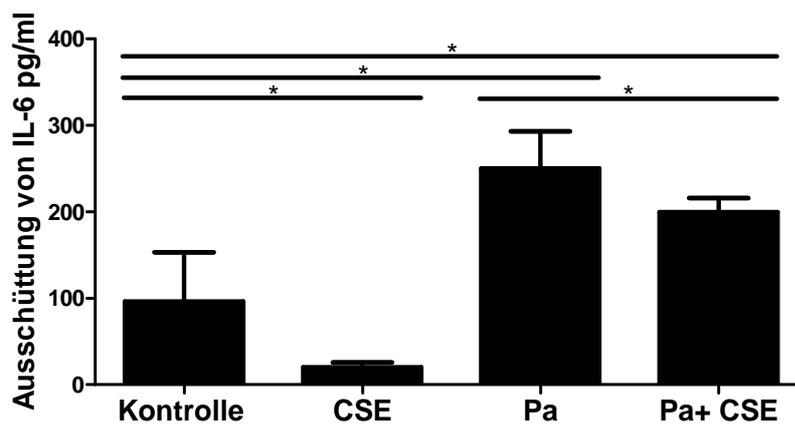


Abbildung 22: Zigarettenrauchextrakt unterdrückt die Ausschüttung von IL-6 durch primäre humane Atemwegsepithelzellen bei Stimulation mit *P. aeruginosa*:

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden für 6 Stunden mit Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%), *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) oder Zigarettenrauchextrakt (CSE; 1%) zusammen mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) inkubiert. Als Kontrollen dienten primäre humane Atemwegsepithelzellen, die für 6 Stunden nur mit Epithelial Cell Growth Medium mit zugegebenem Supplement Pack ohne Zigarettenrauchextrakt, poly (I:C) oder *P. aeruginosa* inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Ausschüttung von IL-6 durch ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Auch in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen, die gleichzeitig in einer Rauchbox direkt volatiltem Zigarettenrauch und *P. aeruginosa* ausgesetzt wurden [7] zeigten eine im Vergleich zu ausschließlich durch *P. aeruginosa* stimulierten Zellen inhibierte Freisetzung von IL-17C (Abbildung 23).

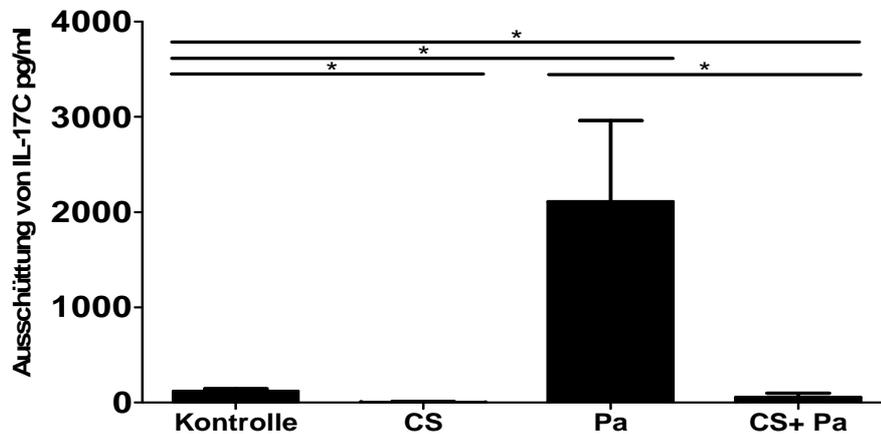


Abbildung 23: Volatiler Zigarettenrauch unterdrückt die Ausschüttung von IL-17C durch Zellen der Tumorzelllinie Calu-3:

In Transwells kultivierte Calu-3 Zellen wurden einmal in einer Rauchbox für 5 Minuten direkt volatiltem Rauch ausgesetzt und im Anschluss für 24 Stunden apikal nur mit DMEM/F12 Medium mit 10% FCS, 100IU/ml Penicillin G und 100 IU/ml Streptomycinsulphat inkubiert. Außerdem wurden in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen einmal 5 Minuten Raumluft ausgesetzt und danach für 24 Stunden apikal mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) infiziert. Weiterhin wurden in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen einmal für 5 Minuten in einer Rauchbox direkt volatiltem Zigarettenrauch ausgesetzt und danach für 24 Stunden apikal mit *P. aeruginosa* (Pa; 10^7 CFU/ml) infiziert. Als Kontrollen dienten in Transwells kultivierte Calu-3 Zellen die 5 Minuten Raumluft ausgesetzt und danach für 24 Stunden apikal mit DMEM/F12 Medium mit 10% FCS, 100IU/ml Penicillin G und 100 IU/ml Streptomycinsulphat inkubiert wurden. Anschließend wurde die basolaterale Abgabe von IL-17C mittels ELISA bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P, 0.05).

Um festzustellen, ob Zigarettenrauch auch die Induktion von IL-17C in Respirationstrakt *in vivo* beeinflusst, wurde ein etabliertes Mausmodell einer Kolonisation [6] mit einem Modell, in dem durch Zigarettenrauch eine Entzündung ausgelöst wird, kombiniert. Dazu wurden weibliche C57BL/6N Mäuse für vier aufeinanderfolgende Tage Zigarettenrauch ausgesetzt und im Anschluss die oberen Atemwege mit einem Typ B Stamm von *H. influenzae* kolonisiert. 24 Stunden nach Kolonisierung bestand kein Unterschied der Stärke der Kolonisierung zwischen Zigarettenrauchexponierten und Luftexponierten Mäusen (Abbildung 24).

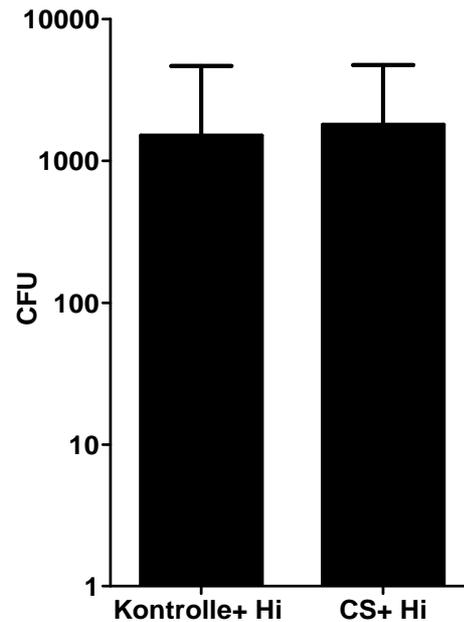


Abbildung 24: Die Kolonisation der Zigarettenrauchexponierten und RaumlufTEXponierten Mäuse war gleich stark ausgeprägt:

Weibliche C57BL/6N Mäuse wurden für 4 aufeinanderfolgende Tage 5-mal am Tag für 20 Minuten in einer Rauchbox volatil oder RaumlufTEXponiert. Unmittelbar nach der letzten Zigarettenrauch-, beziehungsweise RaumlufTEXponierung wurden von beiden Gruppen jeweils die oberen Atemwege der Mäuse entweder mit einem Typ B Stamms von *H. influenzae* (Hi; 2×10^7 CFU/ml), gelöst in PBS infiziert oder mit nur mit PBS scheininfiziert. 24 Stunden später wurde die Kolonisationsdichte der Atemwege der mit *H. influenzae* infizierten Mäuse mittels Verdünnungsreihe bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe).

Bei denselben Mäusen wurde die IL-17C Expression im auskleidenden Gewebe des oberen Respirationstrakts mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expression von IL-17C in den oberen Atemwegen, von *H. influenzae* infizierten Mäusen wurde durch Zigarettenrauchexposition auf ein transkriptionelles Niveau unterdrückt (Abbildung 25).

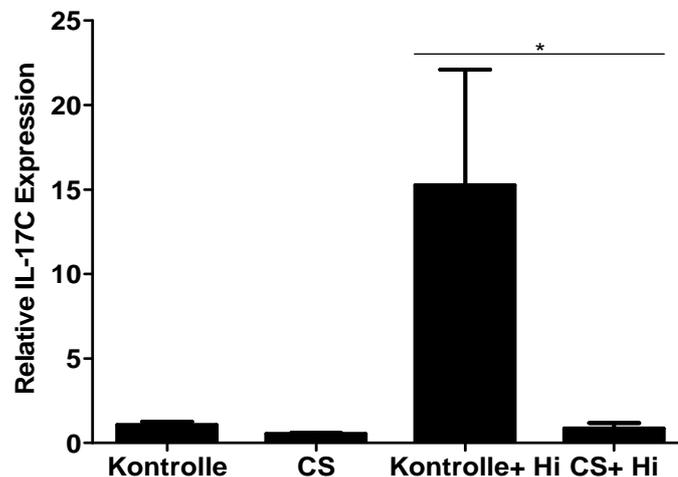


Abbildung 25: Zigarettenrauch unterdrückt die IL-17C Expression in den oberen Atemwegen von Mäusen:

Weibliche C57BL/6N Mäuse wurden für 4 aufeinanderfolgende Tage 5-mal am Tag für 20 Minuten in einer Rauchbox volatilem Zigarettenrauch oder 5-mal am Tag für 20 Minuten Raumluft ausgesetzt. Unmittelbar nach der letzten Zigarettenrauch, beziehungsweise Raumluftexposition wurden von beiden Gruppen jeweils die oberen Atemwege der Mäuse entweder mit einem Typ B Stamms von *H. influenzae* (Hi; 2×10^7 CFU/ml), gelöst in PBS infiziert oder mit nur mit PBS scheininfiziert. 24 Stunden nach Infektion wurde die Induktion von IL-17C im die oberen Atemwege auskleidenden Epithel mittels qRT-PCR bestimmt. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n > 4$ pro Gruppe; *P 0.05).

Diese Daten zeigen, dass Zigarettenrauch die angeborenen Immunmechanismen von respiratorischen Epithelzellen, wozu auch die Expression von IL-17C gehört, unterdrückt.

4.7 IL-17C wird durch Atemwegsepithelzellen von Patienten mit Erkrankungen des Respirationstrakts expremiert

In weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, ob IL-17C im Atemwegsepithel von Patienten mit infektionsassoziierten Lungenerkrankungen zu finden ist. Es zeigte sich, dass IL-17C in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von Patienten, welche sich aufgrund einer zystischen Fibrose, einem Bronchialkarzinom, einer COPD oder einer Aspergillose einer Operation unterzogen haben, durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden konnte. Die stärkste Färbung für IL-17C fand sich im Gewebe von Patienten mit zystischer Fibrose. Auch Gewebeschnitte von zwei unterschiedlichen Patienten mit COPD und einem Patienten mit *A. fumigatus* Infektion zeigte eine starke Färbung für IL-17C. Die am schwächsten ausgeprägte, aber immer noch deutlich sichtbare Färbung zeigte das Atemwegsepithel eines Patienten mit Bronchialkarzinom der zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch rauchte (Abbildung 26).

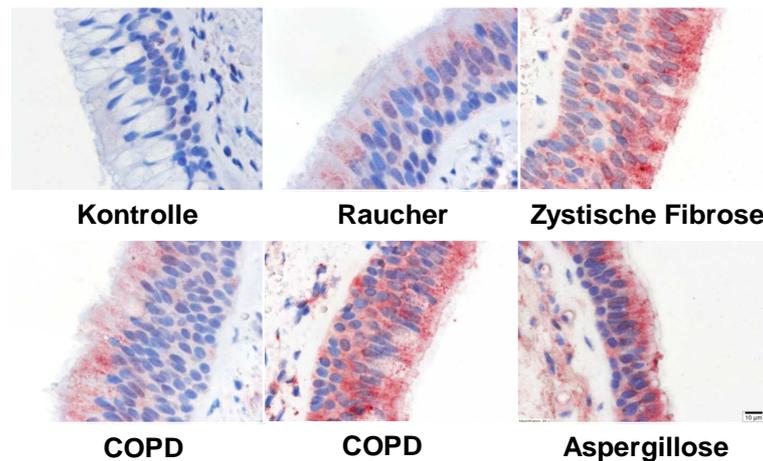


Abbildung 26: IL-17C findet sich in humanem Atemwegsepithel:

IL-17C wurde in formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem humanem Atemwegsepithel nachgewiesen. Ein Patient ohne chronische Lungenerkrankung (Kontrolle), ein Raucher, ein Patient mit Bronchialkarzinom (das dargestellte Gewebe ist nicht Tumorbefallen), zwei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), ein Patient mit Aspergillose und ein Patient mit zystischer Fibrose wurden miteinander verglichen. IL-17C ist rot angefärbt.

5. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde systematisch das Expressionsprofil der IL-17 Zytokinfamilie in Atemwegsepithelzellen bei mikrobieller Infektion und die Wirkung der IL-17-Zytokine IL-17A/F und IL-17C auf humane primäre Atemwegsepithelzellen untersucht. *In vitro* Studien haben ergeben, dass IL-17C das einzige Zytokin der IL-17 Zytokinfamilie ist, das nach Stimulation humaner Atemwegsepithelzellen mit bakteriellen Pathogenen oder mikrobiellen PAMPs verstärkt exprimiert und abgegeben wird. Die Expression der Rezeptoren IL-17RA und -RE, die der Detektion von IL-17C dienen, wurde in Atemwegsepithelzellen nachgewiesen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass IL-17C in den oberen und unteren Atemwegen von Mäusen bei bakterieller Infektion verstärkt exprimiert wird. Zellkulturstudien zeigten darüber hinaus, dass IL-17A/F und IL-17C zusammen mit *P. aeruginosa* synergistisch angeborene Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen aktivieren und dass diese Aktivierung im Fall von IL-17C autokrin erfolgt. Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich äußere Faktoren wie Zigarettenrauch bei Infektionen auf die Bildung von IL-17C durch Atemwegsepithelzellen auswirken. *In vitro* Experimente demonstrierten, dass Zigarettenrauch bzw. Zigarettenrauchextrakt die Expression von IL-17C unterdrückt. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass volatiler Zigarettenrauch die Expression von IL-17C in den oberen Atemwegen von mit *H. influenzae* infizierten Mäusen unterdrückt. IL-17C war im Atemwegsepithel von Patienten mit chronischen Erkrankungen der Lunge, die mit einer chronischen Entzündung assoziiert sind, nachweisbar.

5.1 Bakterielle Pathogene induzieren die Expression und Ausschüttung von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen

Wie in der Einleitung erwähnt, besteht die IL-17 Zytokinfamilie aus mindestens sechs Mitgliedern (IL-17A bis -F). IL-17A und IL-17F sind die am besten untersuchten IL-17 Zytokine [14, 39]. IL-17A und -F werden von professionellen Immunzellen wie T-Helfer Zellen und Makrophagen abgegeben und sind bei der Immunantwort gegen bakterielle Pathogene von Bedeutung. Studien zeigten bereits, dass IL-17A/F in Atemwegsepithelzellen eine Entzündungsreaktion auslöst, was eine gesteigerte Bildung von inflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden zur Folge hat [25, 40, 55, 60]. Neue Studien zeigen, dass im Gegensatz zu IL-17A/F IL-17C primär von Epithelzellen gebildet wird [46]. Von besonderem

Interesse im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist eine Publikation von Ramirez-Carrozzi et al. [46]. Sie konnten darlegen, dass *Escherichia coli* die Ausschüttung von IL-17C in epidermalen Keratinozyten, Kolonepithel und primären humanen Trachealepithelzellen induziert [46]. Die Autoren fanden Belege dafür, dass das nach bakterieller Infektion ausgeschüttete IL-17C autokrin auf die Ursprungszellen zurückwirkt und dass diese Aktivierung durch die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE vermittelt wird [46]. Trotz der beschriebenen bisher erfolgten Untersuchungen sind weiterhin noch viele Zusammenhänge in Bezug auf die wichtige Familie der Interleukin IL-17 Zytokine und Atemwegsepithel ungeklärt. Besonders hervorzuheben ist, dass eine Wissenslücke um die Funktion von IL-17C bei infektiösen Erkrankungen des Respirationstrakts bestand und es ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, die Lücke um dieses Wissen zu schließen. Es wurde also die Expression und Abgabe der IL-17 Zytokine und im speziellen die von IL-17C durch Atemwegsepithelzellen bei mikrobieller Infektion untersucht. In Übereinstimmung mit der Studie von Ramirez-Carrozzi et al. konnte gezeigt werden, dass bakterielle Pathogene und mikrobielle PAMPs zu einer gesteigerten Expression und Ausschüttung von IL-17C in Atemwegsepithelzellen und in der Lunge führen. IL-17C war das einzige IL-17 Zytokin, das nach Stimulation von Toll-like Rezeptoren durch Atemwegsepithelzellen ausgeschüttet wird und autokrin die angeborene Immunreaktion dieser Zellen verstärkt. So führte eine Infektion von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, Flagellin (TLR-5 Ligand) und poly (I:C) (TLR-3 Ligand) ebenso wie eine Infektion der Atemwegsepithelzelllinie Calu-3 mit *P. aeruginosa* und *H. influenzae* zu einer Induktion der Abgabe von IL-17C. Weiterhin konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine bakterielle Infektion der oberen und unteren Atemwege mit *P. aeruginosa* sowie mit *H. influenzae* die Expression von IL-17C *in vivo* induziert. Besonders interessant war, dass erstmals gezeigt werden konnte, dass auch der synthetische TLR-3 Ligand (poly (I:C)) die Ausschüttung und Expression von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen induziert. Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass eine Stimulation von Keratinozyten mit poly (I:C) nicht zu einer gesteigerten Abgabe von IL-17C führt [44, 46]. Bei viralen Infektionen kommt es zur Bildung von dsRNA (double-stranded ribonucleic acid). Diese wird von den Atemwegsepithelzellen über den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) registriert, was zur Ausschüttung Zytokinen, wie beispielsweise IFN- α , - β und IL-6 durch diese Zellen führt [3]. Eine Stimulation von Zielzellen mit poly (I:C) simuliert eine virale Infektion, da poly (I:C) ein synthetischer Ligand für TLR-3 ist und in seiner Struktur doppelsträngiger viraler RNA (dsRNA) ähnelt. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass die Ausschüttung von IL-17C durch poly (I:C) im Vergleich zu Zellen, die mit Flagellin oder *P.*

aeruginosa stimuliert wurden, relativ spät erfolgte, nämlich nicht schon innerhalb der ersten vier Stunden, sondern erst nach über vier Stunden. Die Erkenntnis, dass poly (I:C) in der Lage ist eine verstärkte Expression und Ausschüttung von IL-17C durch primäre humane Atemwegsepithelzellen auszulösen, wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt und in einer im Anschluss an diese Arbeit erfolgten Publikation durch Hideki Kusagaya et al. bestätigt [28, 44]. Kusagaya et al. zeigten, dass die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit poly (I:C) (TLR-3 Ligand) MyD88 unabhängig über den TLR3/TRIF/NF- κ B-Signalweg erfolgt [28]. Darüber hinaus ist ein weiterer Mechanismus denkbar, der zu einer indirekten Induktion der IL-17C Expression nach poly (I:C) Stimulation der führen könnte. Denn poly (I:C) Stimulation führt auch zu einer verstärkten Expression von TNF- α , dass wiederum zu einer verstärkten NF- κ B Aktivierung und somit schließlich ebenfalls zu einer verstärkten Expression von IL-17C beitragen könnte [19, 24]. Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente mit *P. aeruginosa*, *H. influenzae* und Flagellin lassen vermuten, dass die Expression von IL-17C bei Infektion von Atemwegsepithelzellen mit diesen Bakterien und Pathogenen über den MyD88 abhängigen Signalweg erfolgt. Bei Aktivierung von TLR-2, -4 und -5 auf der Oberfläche von Atemwegsepithelzellen durch die entsprechenden Liganden kommt es zur Aktivierung eines MyD88 abhängigen Signalwegs, damit zur Aktivierung von NF- κ B und schließlich zur Expression von IL-17C [42]. *P. aeruginosa* exprimiert Lipoproteine (Ligand für TLR-2), LPS (Ligand für TLR-4) und Flagellin (Ligand für TLR-5) und *H. influenzae* exprimiert LPS (Ligand für TLR-4) und Lipoproteine (Ligand für TLR-2) [61]. IL-17C ist das einzige Interleukin der IL-17 Zytokinfamilie, das bei Stimulation von Calu-3 Zellen und primären humanen Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und pathogenen Faktoren von Bakterien und Viren verstärkt ausgeschüttet wird. Untersucht wurde im Einzelnen, Stimulation von Calu-3 Zellen mit *P. aeruginosa* und Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa*, Flagellin und poly (I:C). Darüber hinaus zeigte sich, dass IL-17D das einzige weitere IL-17 Zytokin war, das konstitutiv durch beide Zellarten exprimiert wird, ohne dass sich diese Expression durch bakterielle Stimulation steigern ließ. Die Beobachtung, dass sich die Expression von IL-17D nach Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* nicht verstärkt wurde, ist in Übereinstimmung mit einer Publikation [54], in der gezeigt werden konnte, dass es auch bei Stimulation von Kolonepithelzellen mit *C. rodentium* zu einer Expression von IL-17D kam, aber keine gesteigerte Expression von IL-17D durch diese Stimulation beobachtet werden konnte [55]. Dies unterstreicht die herausragende Rolle, die IL-17C im Zusammenhang mit der angeborenen Immunreaktion humaner Atemwegsepithelzellen spielt. Die *in vitro* Stimulationsexperimente

dieser Arbeit legen nahe, dass es bei bakterieller Infektion von Atemwegsepithelzellen über MyD88 abhängige Signalwege und bei viraler Infektion über MyD88 unabhängige Signalwege zur IL-17C Expression kommt und dass IL-17C das zentrale IL-17 Zytokin im Zusammenhang der angeborenen Immunantwort humaner Atemwegsepithelzellen ist. Darüber hinaus zeigten die Experimente mit Flagellin und poly (I:C) als Repräsentanten bakterieller und viraler Stimulation, dass die Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR5 eine zentrale Stellung bei der Induktion von IL-17C durch mikrobielle Pathogene in Atemwegsepithelzellen einnehmen.

5.2 Atemwegsepithelzellen exprimieren die IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE

Ein heterodimerer Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RE vermittelt die Aktivierung von Zielzellen durch IL-17C [46, 55]. Der IL-17RA Rezeptor wird ubiquitär exprimiert und wurde beispielsweise in Lungengewebe von Mäusen mittels Northernblot und in menschlichen Atemwegsepithelzellen und Lungenparenchym mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen [36, 66, 67]. In anderen Publikationen wurde auf die Expression des IL-17RE Rezeptors bei der Maus und beim Menschen eingegangen. Dort wurde der Nachweis mittels qRT-PCR geführt [46, 55]. Bei der Maus fand sich der IL-17RE Rezeptor im Gewebe von Magen, Trachea, Lunge, Kolon, Niere und der Haut und beim Menschen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes, Kolonepithelzellen, und Keratinozyten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden der IL-17RA und -RE Rezeptor konkret auf primären humanen Atemwegsepithelzellen mittels qRT-PCR und Westernblot nachgewiesen. Für Calu-3-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des IL-17RA Rezeptors nachgewiesen, wobei davon auszugehen ist, dass Calu-3-Zellen auch den IL-17RE Rezeptor exprimieren. Darüber hinaus war zu beobachten, dass eine 24 stündige Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* zu keiner Veränderung der Expressionsstärke dieser Rezeptoren führte, so dass gesagt werden kann, dass diese Rezeptoren von den beiden Zelltypen konstant exprimiert werden, ohne durch bakterielle Stimulation in der Stärke ihrer Expression verändert zu werden. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit vorherigen Studien, in denen es nach einer Stimulation von HCT-15 Zellen (Kolonkarzinomzelllinie) mit Peptidoglycan (TLR-2 Agonist), poly (I:C) (TLR-3 Agonist), Flagellin (TLR-5 Agonist) und CPG oligodesoxynucleotiden nicht zu einer verstärkten Expression von IL-17RA oder -RE kam [46].

5.3 IL-17A/F verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen respiratorischer Epithelzellen

In zahlreichen Publikationen sind synergistische Effekte von IL-17A mit anderen Zytokinen und Pathogenen beschrieben [20, 34, 60]. So zum Beispiel, dass es zu einer synergistischen Expression von IL-8 und hBD-2 bei simultaner Stimulation von humanen Atemwegsepithelzellen mit IL-17A und HRV-16 kommt [60]. Weiterhin, dass eine synergistische Expression von CXCL5 durch Alveolarzellen Typ2 bei Co-stimulation dieser Zellen mit IL-17A und TNF- α stattfindet [34]. Darüber hinaus findet sich ein synergistischer Effekt auf die Expression von IL-6 bei simultaner Stimulation von glatten Atemwegsmuskelzellen mit TNF- α und IL-17A und es ist beschrieben worden, dass es bei gleichzeitiger Stimulation von primären Keratinozyten mit IL-17A/F und IL-22 zu einer synergistischen Expression von hBD-2 kommt [20, 33]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die simultane Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* und IL-17A/F zu einer synergistischen Ausschüttung von IL-6 und IL-8 führt. Die angeborene Immunreaktion von primären humanen Atemwegsepithelzellen auf *P. aeruginosa*, ausgedrückt durch die Ausschüttung von IL-6 und IL-8, wird also durch IL-17A/F verstärkt, das in der physiologischen Situation im Körper von Stimulierten T_H-17-Zellen ausgeschüttet wird [14].

5.4 IL-17C verstärkt durch Bakterien induzierte angeborene Immunmechanismen respiratorischer Epithelzellen

Analog zu den Ergebnissen für IL-17A/F ist auch für IL-17C beschrieben, dass es zusammen mit anderen Zytokinen synergistische Effekte auf die Expression antimikrobieller Peptide ausübt. So führt zum Beispiel eine Co-Stimulation von Kolongewebe oder zirkulierenden Endothelzellen der Maus mit IL-17C und IL-22 zu einer synergistischen Expression der für antimikrobielle Peptide codierenden mRNA S100A8, S100A9, RegIII β und RegIII γ [55]. Ein weiteres Beispiel ist die synergistische Wirkung von IL-17C mit TNF- α oder IL-1 β auf die Induktion von β -defensin-2 durch Keratinozyten [46]. In Bezug auf diese Vorergebnisse konnte in dieser Arbeit anhand von primären humanen Atemwegsepithelzellen nachgewiesen werden, dass IL-17C zusammen mit *P. aeruginosa* zu einer synergistischen Ausschüttung des inflammatorischen Zytokins IL-6 und hBD-2 führt.

5.5 IL-17C verstärkt entzündliche Reaktionen während bakterieller Infektionen autokrin

Anhand von Calu-3 Zellen wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit *P. aeruginosa* über eine Ausschüttung von IL-17C zu einer synergistischen Verstärkung der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 führt, indem gezeigt werden konnte, dass sich die durch *P. aeruginosa* induzierte Ausschüttung von IL-17C der Calu-3 Zellen durch siRNA Transfektion effektiv unterdrücken ließ und dass es in der Folge in den Überständen derselben Zellen auch zu einer reduzierten Ausschüttung von IL-6 kam. Diese Beobachtungen lassen sich nur durch einen autokrinen beziehungsweise parakrinen Rückkopplungsmechanismus von IL-17C auf diese Zellen erklären und sind wie die oben gezeigte synergistische Wirkung von IL-17C auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ein weiterer Beleg für eine autokrine Verstärkung der angeborenen Immunmechanismen primärer humaner Atemwegsepithelzellen durch IL-17C. Es ist also festzuhalten, dass als Reaktion auf eine bakterielle Stimulation von Atemwegsepithelzellen über die entsprechenden Toll-like Rezeptoren IL-17C gebildet wird, welches parakrin auf benachbarte Atemwegsepithelzellen, aber auch autokrin auf die IL-17C sezernierende Zelle selbst zurück wirkt und dadurch die durch *P. aeruginosa* hervorgerufene Ausschüttung der proinflammatorischen Enzyme IL-6, beziehungsweise IL-8, synergistisch verstärkt. Die autokrine beziehungsweise parakrine Wirkung von IL-17C auf die Expression unterschiedlicher Komponenten des angeborenen Immunsystems wurde in vorausgegangenen Publikationen bereits postuliert [46]. So schlossen Ramirez-Carrozzi et al. aufgrund folgender Beobachtungen darauf, dass IL-17C in einem autokrinen Rückkopplungsmechanismus die angeborene Immunreaktion von Epithelzellen verstärkt. IL-17C wird von Keratinozyten, Kolonepithelzellen und primären Trachealepithelzellen als Reaktion auf Stimulation mit *E. coli* verstärkt exprimiert. Die Induktion dieser Expression geschieht sehr schnell und der für IL-17C spezifische Rezeptor IL-17RE wird am stärksten im Gewebe der Trachea, der Lunge und dem Kolon des Menschen exprimiert. Versuche, die den von Ramirez-Carrozzi et al. postulierten Mechanismus beweisen konnten, wurden nicht durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Mechanismus erstmals durch die genannten Versuche für humane Atemwegsepithelzellen nachgewiesen werden. Im Anschluss an die in dieser Arbeit publizierten Beobachtungen fanden Kusagaya et al. noch weitere Belege für eine autokrine Wirkung von IL-17C. Nachdem Sie gezeigt hatten, dass sowohl eine Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit IL-17C, als auch eine Stimulation mit poly (I:C) zu einer verstärkten Ausschüttung von hBD-2, CSF3 und S100A12 führte, wurde unter Stimulation mit

poly (I:C) einmal durch siRNA Transfektion IL-17C herunterreguliert und einmal IL-17RE (spezifischer Rezeptor für IL-17C). In beiden Fällen beobachtete man eine geringere Ausschüttung von hBD-2, CSF3 und S100A12 durch die Atemwegsepithelzellen [28]. Diese Zusammenhänge lassen sich nur dadurch erklären, dass eine poly (I:C) Stimulation der Atemwegsepithelzellen, bei denen der IL-17RE -Rezeptor ausgeschaltet wurde, zwar noch zu einer Bildung und Ausschüttung von IL-17C führt, dieses aber nicht mehr verstärkend auf die entsprechenden Ursprungszellen oder benachbarte Zellen zurück wirken kann und sich somit auch nicht mehr an der Expression von hBD-2, CSF3 und S100A12 beteiligen kann. Damit ist mittlerweile die autokrine beziehungsweise parakrine Wirkungsweise von IL-17C und die verstärkende Wirkung auf die angeborene Immunreaktion so stark belegt, dass man diesen Mechanismus als gegeben betrachten sollte, wobei durch die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit einen wichtiger Beitrag zum Beleg dieses Mechanismus und insbesondere in Bezug auf humane Atemwegsepithelzellen geleistet wurde.

5.6 Zigarettenrauch unterdrückt die Expression von IL-17C durch respiratorische Epithelzellen

Die Inhalation von Zigarettenrauch beeinträchtigt die Abwehrmechanismen der Lunge und erleichtert somit die Kolonisation des oberen und unteren Respirationstrakts mit potentiellen Pathogenen, was wiederum die Anfälligkeit des Wirts für pulmonale Infektionen verstärkt [50, 51]. Wiederkehrende Infektionen und chronische Kolonisation der Lunge mit bakteriellen Pathogenen leisten somit schließlich einen Beitrag zur Entwicklung von Erkrankungen des Respirationstracks [49, 50]. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass akute Zigarettenrauchexposition die angeborenen Immunfunktionen in Epithelzellen beispielsweise durch Hemmung der Aktivierung der AP-1- (activator protein 1) und NF- κ B-Signalkaskaden unterdrückt [21, 27, 29]. Zusätzlich ist bekannt, dass Raucher mit ambulant erworbener Pneumonie reduzierte Mengen von antimikrobiellen Peptiden im Sputum und in der pharyngealen Lavage zeigten [21]. Die hier vorgestellten Ergebnisse, dass akute Zigarettenrauchexposition die Expression und Ausschüttung von IL-17C in primären humanen Atemwegsepithelzellen nach bakterieller Infektion mit *P. aeruginosa* unterdrückt, ist im Einklang mit den oben genannten Studien. Die Zusammenhänge werden klar, wenn man bedenkt, dass die Expression von IL-17C über die Aktivierung von NF- κ B gesteuert wird, Zigarettenrauchextrakt zu einer Unterdrückung dieses Signalwegs führt und es somit letztlich

zu einer verminderten Ausschüttung von IL-17C durch die entsprechenden respiratorischen Epithelzellen kommt. Auch für eine Stimulation von primären humanen Atemwegsepithelzellen mit poly (I:C) konnte in dieser Arbeit die Beobachtung gemacht werden, dass Zigarettenrauchextrakt die hervorgerufene Expression von IL-17C unterdrückt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Zigarettenrauchkondensat die durch *H. influenzae* ausgelöste Aktivierung von NF- κ B in Atemwegsepithelzellen unterdrückt und wie bereits weiter oben beschrieben gezeigt wurde, dass die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit poly (I:C) MyD88 unabhängig über den TLR3/TRIF/NF- κ B-Signalweg erfolgt, ist auch im Fall von poly (I:C) davon auszugehen, dass die durch poly (I:C) ausgelöste Aktivierung von NF- κ B durch Zigarettenrauchextrakt unterdrückt wird und in der Folge auch die Expression von IL-17C durch Atemwegsepithelzellen [27, 28]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Ausschüttung von IL-6 bei Exposition von primären Atemwegsepithelzellen mit *P. aeruginosa* durch Zigarettenrauchextrakt unterdrückt wird. Es wurden Versuche durchgeführt, in denen mit *P. aeruginosa* infizierte Atemwegsepithelzellen in einer Rauchbox volatilem Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, wobei zu erwähnen ist, dass es sich bei den verwendeten Zellen um Calu-3 Zellen und nicht um primäre humane Atemwegszellen handelte. Dieses Modell ähnelt stärker den natürlichen Verhältnissen, wie sie beim Raucher vorkommen, als die Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt. In diesen Versuchen zeigte sich, dass nicht nur Zigarettenrauchextrakt, sondern auch volatiler Zigarettenrauch in der Lage ist die durch *P. aeruginosa* induzierte Ausschüttung von IL-17C effektiv zu unterdrücken. Um zu zeigen, dass die IL-17C beziehungsweise IL-6 Expression nicht etwa durch einen zytotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs auf die Atemwegsepithelzellen entstanden ist, wurde ein LDH-Assay mit den entsprechenden Proben durchgeführt, der zeigen konnte, dass die verwendeten Zigarettenrauchextrakt- und Zigarettenrauchkonzentrationen nicht so hoch gewählt wurden, dass es zu zytotoxischen Effekten auf die Zellen kam.

In dieser Arbeit wurden auch Versuche mit Mäusen durchgeführt, um zu untersuchen, ob Zigarettenrauch auch in der Lage ist, die Expression von IL-17C *in vivo* zu unterdrücken. In diesem Zusammenhang ist eine Publikation zu erwähnen, die zeigte, dass die Beseitigung einer Kolonisation der Lungen mit *P. aeruginosa* durch das Immunsystem von Mäusen bei gleichzeitig mit *P. aeruginosa* infizierten und zigarettenrauchexponierten Mäusen langsamer verlief als bei nicht zigarettenrauchexponierten Mäusen [13]. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde im Atemwegsepithel von Mäusen die Expression von IL-17C durch *H. influenzae* induziert und die Mäuse teilweise volatilem Zigarettenrauch exponiert.

Zum Zeitpunkt der Bestimmung der Stärke der hervorgerufenen Expression von IL-17C im Atemwegsepithel dieser Mäuse wurde auch die Kolonisationsdichte mit *H. influenzae* bestimmt, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Kolonisationsdichten ausschließen zu können. Es zeigte sich, dass die Kolonisationsdichten beider Gruppen beinahe gleich hoch waren und damit eine Beeinflussung der Stärke der Expression durch die Kolonisationsdichte ausgeschlossen werden konnte. Die daraufhin bestimmte Expression von IL-17C im Atemwegsepithel der Mäuse zeigte, dass schon eine Zigarettenrauchexposition über wenige Tage in der Lage ist, die Expression von IL-17C und damit höchst wahrscheinlich auch weiterer Funktionen des angeborenen Immunsystems effektiv zu unterdrücken. Es lässt sich also vermuten, dass auch gesunde Raucher eine verminderte Expression von IL-17C aufweisen und dadurch für bakterielle und virale Infektionen empfänglicher sind.

5.7 IL-17C wird durch Atemwegsepithelzellen von Patienten mit Erkrankungen des Respirationstrakts expremiert

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob IL-17C im Atemwegsepithel von Patienten mit chronischen entzündlichen Erkrankungen des Respirationstrakts eine Rolle spielt. Es liegen deutliche Hinweise vor, dass IL-17 auch in der Entwicklung von chronischen Erkrankungen des Respirationstrakts, wie zum Beispiel COPD, Lungenemphysem und der zystischen Fibrose, eine sehr wichtige Rolle spielt [10–12, 52, 58]. Neuere Studien zeigten, dass die Anzahl der IL-17A Zellen und T_H-17 Zellen in der bronchialen Mucosa von Patienten mit COPD erhöht ist und erhöhte Werte des entzündlichen Zytokins IL-17A im Sputum und in bronchialen Biopsien von COPD-Patienten nachgewiesen werden konnten [11, 12]. In Bezug auf die Entwicklung eines Lungenemphysems zeigten Studien an knockout Mäusen, dass diese vor einem durch Rauch induzierten Emphysem geschützt werden konnten, wenn sie einen Verlust an IL-17A oder IL-17RA aufwiesen. Wo hingegen die Entwicklung eines Emphysems durch eine Überexpression von IL-17A sogar beschleunigt wurde [10, 52]. Auch bei der zystischen Fibrose spielt IL-17A eine Rolle. So fand man in der Submukosa von Kindern mit zystischer Fibrose eine erhöhte Anzahl an IL-17A expremierenden Zellen [58]. Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit wurde Atemwegsepithel von Patienten, die aufgrund unterschiedlicher Erkrankungen lungentransplantiert wurden, immunhistochemisch auf IL-17C untersucht. Es zeigte sich, dass es zu einer stärkeren Färbung für IL-17C im Atemwegsepithel von Patienten mit chronischen entzündlichen Erkrankungen

des Respirationstracks, wie COPD und zystischer Fibrose im Vergleich zu Färbungen für IL-17C mit Atemwegsepithel von Patienten, die nicht an einer chronischen Lungenerkrankung erkrankt waren kam. Dies spricht für eine höhere Konzentration von IL-17C im Atemwegsepithel von Patienten mit Erkrankungen des Respirationstrakts, welche mit einer chronischen Entzündung und bakterieller Besiedlung assoziiert sind. Chronische Entzündungen der Lunge und Exazerbationen, ausgelöst durch mikrobielle Pathogene, sind essentiell für die Entwicklung und Exazerbation der COPD und tragen zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion bei Patienten mit zystischer Fibrose bei [24, 48]. Es wurde gezeigt, dass IL-17A entzündliche Reaktionen in primären humanen Atemwegsepithelzellen über die NF- κ B-Signalkaskade induziert und somit zu einer Expression von Mucin und zu einer Induktion von inflammatorischen Mediatoren, wie zum Beispiel pro-inflammatorischen Zytokinen führt, was wiederum zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den Respirationstrakt führt [25, 34, 49, 50, 69]. Somit könnte also auch IL-17C in einer Zerstörung der Lunge und einer exzessiven Mukusproduktion resultieren, wie sie bei Patienten mit zystischer Fibrose und COPD beobachtet wird, da IL-17C wie IL-17A über den IL-17RA Rezeptor detektiert wird und daraufhin zu einer Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade führt.

5.8 Ausblick

Weitergehende Studien werden benötigt, um herauszufinden, ob IL-17C zu einem Circulus vitiosus bei chronischen Lungenerkrankungen führt, bei dem aktivierte Epithelzellen autokrin und parakrin eine Entzündung stimulieren. Entzündungen sind, beispielsweise bei der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung und der zystischen Fibrose, ein Hauptmerkmal von Erkrankungen des Respirationstrakts. Im Zuge dieser Erkrankungen kommt es häufig zur Zerstörung des beteiligten Gewebes und zu einem Verlust der Lungenfunktion. Außerdem ist es wichtig, die Mechanismen der Beeinflussung der angeborenen Immunantwort humaner Atemwegsepithelzellen durch IL-17C als Reaktion sowohl auf bakterielle, wie auch virale Infektionen genauer zu untersuchen und zu verstehen. In dieser Arbeit hat sich unter anderem gezeigt, dass IL-17C maßgeblich an der Abwehr von Keimen im menschlichen Respirationstrakt beteiligt ist und eine herausragende Rolle für das angeborene Immunsystem des menschlichen Respirationstrakts spielt. Auch die gezeigte negative Beeinflussung der durch IL-17C vermittelten angeborenen Immunreaktion durch Zigarettenrauch stellt ein interessantes Feld weiterer Untersuchungen dar. So könnte sich die medikamentöse und therapeutische

Beeinflussung der durch IL-17C ausgelösten Immunreaktion als wichtiger Bestandteil zukünftiger Therapieansätze in der Verhütung und günstigen Beeinflussung akuter Infektionen und chronisch entzündlicher Erkrankungen des menschlichen Respirationstrakts herausstellen. Folglich könnte IL-17C ein Faktor sein, der zu einer exzessiven Entzündung im Respirationstrakt von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen führt und das sogar zu einem Zeitpunkt, an dem keine offensichtliche Entzündung vorliegt.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler KB, Tuvim MJ, Dickey BF (2013) Regulated Mucin Secretion from Airway Epithelial Cells. *Frontiers in Endocrinology*, 4: 1-9.
2. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4: 499–511.
3. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413: 732-8.
4. Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, Chinet T (2004) Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3: 49–51.
5. Bals R, Hiemstra PS (2004) Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal*, 23: 327–33.
6. Beisswenger C, Lysenko ES, Weiser JN (2009) Early Bacterial Colonization Induces Toll-Like Receptor-Dependent Transforming Growth Factor Signaling in the Epithelium. *Infection and Immunity*, 77: 2212–20.
7. Beisswenger C, Platz J, Seifart C, Vogelmeier C, Bals R (2004) Exposure of Differentiated Airway Epithelial Cells to Volatile Smoke in vitro. *Respiration*, 71: 402–9.
8. Cannon JG (2000) Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News in Physiological Sciences*, 15: 298–303.
9. Charles AD (2000) Proinflammatory Cytokines. *CHEST Journal*, 118: 503–8.
10. Chen K, Pociask DA, McAleer JP, Chan YR, Alcorn JF, Kreindler JL, Keyser MR, Shapiro SD, McGarry Houghton A, Kolls JK, Zheng M (2011) IL-17RA Is Required for CCL2 Expression, Macrophage Recruitment, and Emphysema in Response to Cigarette Smoke. *PLoS ONE*, 6: e20333.
11. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B (2009) T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clinical & Experimental Immunology*, 157: 316–24.
12. Doe C (2010) Expression of the T Helper 17-Associated Cytokines IL-17A and IL-17F in Asthma and COPD. *CHEST Journal*, 138: 1140-7.

13. Drannik AG, Pouladi MA, Robbins CS, Goncharova SI, Kianpour S, Stämpfli MR (2004) Impact of Cigarette Smoke on Clearance and Inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170: 1164–71.
14. Gaffen SL (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*, 9: 556–67.
15. Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3: 710–20.
16. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM (2010) Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, 135: 1–11.
17. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005). Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6: 1123–32.
18. Hazlett L, Wu M (2011) Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research*, 343: 175–88.
19. Hehlhans T, Pfeffer, K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115: 1–20.
20. Hennes S, Johnson CK, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ (2004) IL-17A augments TNF- α -induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114: 958–64.
21. Herr C, Beisswenger C, Hess C, Kandler K, Suttorp N, Welte T, Schroeder JM, Vogelmeier C, Bals R (2009) Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax*, 64: 144–9.
22. Hiemstra PS (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Experimental Lung Research*, 33: 537–42.
23. Huttner KM, Bevins CL (1999) Antimicrobial Peptides as Mediators of Epithelial Host Defense. *Pediatric Research*, 45: 785–94.
24. Johansen C, Riis JL, Gedebjerg A, Kragballe K, Iversen L (2011) Tumor Necrosis Factor -Mediated Induction of Interleukin 17C in Human Keratinocytes Is Controlled by Nuclear Factor B. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 25487–94.

25. Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R (2004) IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *The Journal of Immunology*, 173: 3482–91.
26. Kawai T, Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21: 317–37.
27. Kulkarni R, Rampersaud R, Aguilar JL, Randis TM, Kreindler JL, Ratner AJ (2010) Cigarette Smoke Inhibits Airway Epithelial Cell Innate Immune Responses to Bacteria. *Infection and Immunity*, 78: 2146–52.
28. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Wu R, Maekawa M, Suda T, Chida K (2013) TLR-Mediated Airway IL-17C Enhances Epithelial Host Defense in an Autocrine/Paracrine Manner. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50: 30-9.
29. Laan M, Bozinovski S, Anderson GP (2004) Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 173: 4164–70.
30. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *The Journal of Immunology*, 162: 2347–52.
31. Laan M, Lötvall J, Chung KF, Lindén A (2001) IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *British Journal of Pharmacology*, 1: 200–6.
32. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI (2000) Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *PNAS*, 97: 773–8.
33. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collin M, Fouser LA (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203: 2271–9.
34. Liu Y, Mei J, Gonzales L, Yang G, Dai N, Wang P, Zhang P, Favara M, Malcolm KC, Guttentag S, Worthen GS (2011) IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, 186: 3197–205.

35. Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, Anderson PW, Malley R (2008) Interleukin-17A Mediates Acquired Immunity to Pneumococcal Colonization. *PLoS Pathogens*, 4: e1000159.
36. McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, Finder JD, Pilewski JM, Carreno BM, Goldman SJ, Pirhonen J, Kolls JK (2005) Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 Receptor in Regulating Growth-Related Oncogene- α and Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Bronchial Epithelium: Implications for Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *The Journal of Immunology*, 175: 404–12.
37. Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9: 4–9.
38. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13: 453–60.
39. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A (2011) The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology*, 134: 8–16.
40. Pappu R, Rutz S, Ouyang W (2012) Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends in Immunology*, 33: 343–9.
41. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood I, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6: 1133–41.
42. Parker D, Prince A (2011) Innate Immunity in the Respiratory Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45: 189–201.
43. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29: 2002–7.
44. Pfeifer P, Voss M, Wonenberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, Bischoff M, Langer F, Schäfers HJ, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2013) IL-17C Is a Mediator of Respiratory Epithelial Innate Immune Response. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48: 415–21.
45. Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-wit D, Xiao J, Lu Y, Gitiay N, Liu J, Kordula T, Zhang QW, Vallance B, Swaidani S, Aronica M, Tuohy VK, Hamilton T, Li X (2007) The adaptor Act1 is required for interleukin 17–dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature Immunology*, 8: 247–56.

46. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, Hackney J, Kim J, Zhou M, Lai J, Modrusan Z, Sai T, Lee W, Xu M, Caplazi P, Diehl L, de Voss J, Balazs M, Gonzales L Jr, Singh H, Ouyang W, Pappu R (2011) IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nature Immunology*, 12: 1159–66.
47. Sanders AJ, Guo X, Mason MD, Jiang WG (2010) IL-17B Can Impact on Endothelial Cellular Traits Linked to Tumour Angiogenesis. *Journal of Oncology*, 12: 1–5.
48. Sen G, Sarkar S (2005) Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16: 1–14.
49. Sethi S, Murphy TF (2008) Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine*, 359: 2355–65.
50. Sethi S, Murphy TF (2001) Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the Art Review. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 336–63.
51. Sethi S. (2010) Infection as a comorbidity of COPD. *European Respiratory Journal*, 35: 1209–15.
52. Shan M, Yuan X, Song LZ, Roberts L, Zarinkamar N, Seryshev A, Zhang Y, Hilsenbeck S, Chang SH, Dong C, Corry DB, Kheradmand F (2012) Cigarette Smoke Induction of Osteopontin (SPP1) Mediates TH17 Inflammation in Human and Experimental Emphysema. *Science Translational Medicine*, 4: 117ra9.
53. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, Yang J, Fu S, Zhang D (2011) A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 4517–24.
54. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417: 552–5.
55. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, Qian Y (2011) IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nature Immunology*, 12: 1151–8.
56. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng ZH (2008) IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *The Journal of Immunology*, 181: 6117–24.
57. Tamachi T, Maezawa Y, Ikeda K, Kagami S, Hatano M, Seto Y, Suto A, Suzuki K, Watanabe N, Saito Y, Tokuhisa T, Iwamoto I, Nakajima H (2006) IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118: 606–14.

58. Tan HL, Regamey N, Brown S, Bush A, Lloyd CM, Davies JC (2011) The Th17 Pathway in Cystic Fibrosis Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184: 252–8.
59. Uematsu S, Fujimoto K, Jang M H, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S (2008) Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology*, 9: 769–76.
60. Wiehler S, Proud D (2007) Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293: L505.
61. Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K, Akira S, van der Poll T (2005) The MyD88-Dependent, but Not the MyD88-Independent, Pathway of TLR4 Signaling Is Important in Clearing The MyD88-Dependent, but Not the MyD88-Independent, Pathway of TLR4 Signaling Is Important in Clearing Nontypeable Haemophilus influenzae from the Mouse Lung. *The Journal of Immunology*, 175: 6042–9.
62. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C (2002) Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 2: 25–32.
63. World Health Organization (Switzerland) (2008) World health statistics 2008. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS08_Full.pdf?ua=1 (15.01.2014)
64. World Health Organization (Switzerland) (2013) World health statistics 2013. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/81965/1/9789241564588_eng.pdf?ua=1 (15.01.2014)
65. Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K (2007) IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *The Journal of Immunology*, 179: 7128–36.
66. Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ (1997) Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine*, 9: 794–800.
67. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ (1995) Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells, *The Journal of Immunology*, 155: 5483–6.

68. Yarovinsky F (2014) Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature Reviews Immunology*, 14: 109–121.
69. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK (2001) Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung CXC Chemokine and Granulocyte Colony-stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *The Journal of Experimental Medicine*, 194: 519–27.
70. Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN (2009) Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119: 1899-1909.

7. Publikationen/ Dank

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde unter dem Titel IL-17C Is a Mediator of Respiratory Epithelial Innate Immune Response veröffentlicht:

Pfeifer P, Voss M, Wonnenberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, Bischoff M, Langer F, Schäfers HJ, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2013) IL-17C Is a Mediator of Respiratory Epithelial Innate Immune Response. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48: 415–21.

Mein Dank gilt in erster Linie natürlich Herrn Professor Dr. Dr. Robert Bals für die freundliche Überlassung des Themas und seiner steten Unterstützung und Ermunterung, die unterschiedlichen Projekte voranzutreiben.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Herr PD Dr. Christoph Beisswenger für seine herausragende fachliche wie persönliche Unterstützung und exzellente Betreuung bedanken. Er hat sich immer sehr viel Zeit für mich genommen und war mir ein freundschaftlicher Berater.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Herr Andreas Kamyschnikow für seine freundliche Einarbeitung im Labor und für seine Unterstützung bei den siRNA Experimenten sowie immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Frau Johanna Pfeifer, die mich über all die Jahre geduldig und liebevoll unterstützt und mir zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Paul und Elisabeth Pfeifer und meinem Bruder Dr. Johannes Pfeifer für ihre stete Motivierung, Unterstützung und Hilfe bedanken.