

Aus dem Bereich Innere Medizin V – Pneumologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung der epithelialen Faktoren IL-17C und RAGE bei
bakterieller und rauchinduzierter Entzündung der Lunge**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Lisa Wolf
geb. am: 11.06.1988 in Zweibrücken

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

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

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

1. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. PD Dr. Christoph Beisswenger: Betreuung der Doktorarbeit, Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
3. Dr. Christian Herr: Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
4. Anja Honecker: Tierhaltung, Hilfestellung bei intranasaler Infektion und Präparation, CBA-Analyse, technische Assistenz
5. Andreas Kamyschnikow: Tierhaltung, Immunhistochemische Färbungen, Stereologische Analysen, technische Assistenz
6. Dr. Julia Niederstraßer: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
7. Dr. Christopher Jungnickel: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
8. Dr. Meike Voss: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
9. Bodo Wonnenberg: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
10. Dr. Frederik Seiler: Hilfestellung bei klinischen Fragestellungen
11. Prof. Dr. Thomas Tschernig: Hilfestellung bei der Bewertung des inflammatorischen Lungenschadens in histologischen Lungenpräparaten
12. Prof. Dr. Claus-Michael Lehr: Einarbeitung in die Isolationstechnik von murinen alveolaren Epithelzellen
13. Dr. Nicole Schneider-Daum: Einarbeitung in die Isolationstechnik von murinen alveolaren Epithelzellen

14. Sandra Sapich: Einarbeitung in die Isolationstechnik von murinen alveolaren Epithelzellen

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

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

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten

Teilergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia

Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M, Wonnenberg B, Herr C, Schneider-Daum N, Lehr CM, Bals R, Beisswenger C.

American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 2016.

Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) maintains pulmonary mechanics and structure and regulates the response to cigarette smoke

Wolf L, Herr C, Niederstraßer J, Beisswenger C, Bals R.

Zur Publikation eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	5
SUMMARY.....	7
2. EINLEITUNG	9
2.1. Epithelzellen der Lunge.....	9
2.1.1. Aufbau und Zusammensetzung des pulmonalen Epithels.....	9
2.1.2. Funktionen der pulmonalen Epithelzellen.....	9
2.2. Das angeborene Immunsystem der Lunge	11
2.2.1. Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)	11
2.2.2. Lösliche Substanzen	14
2.2.3. Entzündungszellen	17
2.3. Entzündliche Erkrankungen der Lunge.....	20
2.3.1. Die COPD als ein Beispiel einer rauchinduzierten entzündlichen Erkrankung der Lunge.....	21
2.3.2. Die Pneumonie als ein Beispiel einer bakteriell induzierten entzündlichen Erkrankung der Lunge.....	25
2.4. RAGE und Entzündungsreaktionen	28
2.5. IL-17C und Entzündungsreaktionen	32
2.6. Fragestellung der Arbeit.....	35
3. MATERIALIEN UND METHODEN	37
3.1. Materialien	37
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	37
3.1.2. Puffer, Lösungen und Kulturmedien	38
3.1.3. Weitere Materialien.....	39
3.1.4. Mäuse	39
3.2. Methoden.....	39
3.2.1. Zigarettenrauchexposition	39
3.2.1.1. Chronische Zigarettenexposition.....	39
3.2.1.2. Akute Zigarettenexposition	40

3.2.2. Invasive Lungenfunktionsmessung	40
3.2.3. Einbettung und stereologische Analyse der Lunge	42
3.2.3.1. Fixierung der Lunge, Paraffineinbettung und Hämalaun-Eosin-Färbung.....	42
3.2.3.2. Stereologische Auswertung.....	42
3.2.4. Kultivierung der <i>P. aeruginosa</i> und Durchführung der intranasalen Infektion	43
3.2.5. Herstellung und Vernebelung von nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> Lysat	43
3.2.6. Präparation der Mäuse und Probenaufarbeitung	44
3.2.6.1. Plasmagewinnung und Lavage der Lunge.....	44
3.2.6.2. Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Anfertigung von Cytospin- Präparaten zur Analyse des Differentialzellbildes	44
3.2.6.3. Herstellung von Lungenhomogenisat und Bestimmung der CFU	45
3.2.7. Isolation und <i>ex vivo</i> Stimulation von murinen Alveolarmakrophagen.....	45
3.2.8. Isolation und Kultivierung von murinen alveolaren Epithelzellen	46
3.2.8.1. Zigarettenrauchexposition der murinen alveolaren Epithelzellen.....	47
3.2.8.2. FITC-Dextran Translokation.....	48
3.2.8.3. Stimulationsexperimente mit murinen alveolaren Epithelzellen.....	48
3.2.9. Bestimmung der Zytokinkonzentration.....	49
3.2.9.1. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).....	49
3.2.9.2. Cytometric Bead Assay (CBA)	49
3.2.9.3. Zytokinarray	50
3.2.10. Bestimmung der Nitritkonzentration in Zellkulturüberständen	50
3.2.11. Isolation von RNA und quantitative RT-PCR.....	50
3.2.11.1. Isolation von RNA aus der Mauslunge	50
3.2.11.2. Isolation von RNA aus Zellen	51
3.2.11.3. Quantitative RT-PCR	52
3.2.12. Immunhistochemie	53
3.2.13. Histologische Bewertung des inflammatorischen Lungenschadens	54
3.2.13. Statistische Analyse.....	54
4. ERGEBNISSE	55
4.1. Einfluss von RAGE auf die Struktur und Mechanik der Lunge.....	55
4.1.1. Analyse der pulmonalen RAGE Expression auf mRNA und Proteinebene.....	55
4.1.2. RAGE beeinflusst die Mechanik der Lunge	57

4.2. Funktion von RAGE bei rauchinduzierter Entzündung	59
4.2.1. Die Defizienz von RAGE beeinflusst die Lungenmechanik, aber nicht den Verlust alveolarer Oberfläche bei rauchinduzierter Entzündung	60
4.2.2. Eine durch akute Zigarettenrauchexposition induzierte pulmonale Entzündung wird von RAGE reguliert	66
4.3. Charakterisierung der Zelltyp-spezifischen Funktionen von RAGE	71
4.3.1. RAGE reguliert die Differenzierung und Barriereausbildung von primären murinen alveolaren Epithelzellen	72
4.3.2. RAGE moduliert inflammatorische Prozesse in primären murinen Alveolarmakrophagen	78
4.4. Funktion des epithelialen Zytokins IL-17C bei einer bakteriell induzierten Entzündung	81
4.4.1. IL-17C wird von alveolaren Epithelzellen nach bakterieller Stimulation exprimiert	82
4.4.2. IL-17C vermittelt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einer <i>P. aeruginosa</i> Pneumonie	85
4.4.3. IL-17C fördert die Ausbildung einer systemischen Entzündung während einer <i>P. aeruginosa</i> Pneumonie	89
4.4.4. IL-17C vermittelt eine pulmonale Inflammation unabhängig von der Lebensfähigkeit der Bakterien	92
4.4.5. IL-17C vermittelt die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokinen in alveolaren Epithelzellen	96
4.4.6. Die durch IL-17C vermittelte pulmonale Entzündung während einer <i>P. aeruginosa</i> Pneumonie wird von IL-17A reguliert	98
5. DISKUSSION	102
5.1. Mausmodelle einer akuten und chronischen Zigarettenrauchexposition	102
5.2. Die Rolle von RAGE bei einer akuten und chronischen Zigarettenrauchexposition	103
5.2.1. Eine Deletion von RAGE beeinflusst mechanische und strukturelle Eigenschaften der Lunge	104
5.2.2. Eine RAGE Defizienz beeinflusst die Lungenmechanik, nicht aber den strukturellen Lungenschaden nach chronischer Zigarettenrauchexposition	107
5.2.3. Eine RAGE Defizienz verändert das pulmonale Entzündungsgeschehen nach	

akuter Zigarettenrauchexposition.....	111
5.2.4. RAGE stabilisiert die pulmonale Barriereintegrität	115
5.3. Die Rolle von IL-17C in einer bakteriell induzierten pulmonalen Entzündung	119
5.3.1. Mausmodell einer <i>P. aeruginosa</i> induzierten Pneumonie	120
5.3.2. IL-17C wird von Lungenepithelzellen nach Kontakt mit Bakterien exprimiert	121
5.3.3. IL-17C reguliert die pulmonale Entzündungsreaktion in einer <i>P. aeruginosa</i> induzierten Pneumonie	122
5.3.4. IL-17A beeinflusst die durch <i>P. aeruginosa</i> induzierte pulmonale Inflammation über die Regulation von IL-17C.....	125
5.4. Schlussbemerkung.....	127
6. LITERATURVERZEICHNIS	128
7. PUBLIKATIONEN, KONGRESSBEITRÄGE UND DANKSAGUNG.....	154
7.1. Publikationen.....	154
7.2. Kongressbeiträge.....	155
7.3. Danksagung.....	156

1. Zusammenfassung

Weltweit leiden Millionen von Menschen an akuten und chronischen Lungenerkrankungen wie der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder der Pneumonie. Ein typisches Merkmal dieser Erkrankungen sind entzündliche Prozesse, die maßgeblich am Krankheitsverlauf beteiligt sind. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind pulmonale Epithelzellen in der Lage, Entzündungsreaktionen zu induzieren und zu regulieren. Die epithelialen Zellen der Lunge erkennen über Mustererkennungsrezeptoren (PRR: pattern recognition receptors) mikrobielle Faktoren und Gefahr-assoziierte molekulare Muster (DAMPs: danger-associated molecular pattern) und setzen daraufhin Signalkaskaden in Gang, die eine Immunantwort auslösen.

In dieser Arbeit wurde die Funktion des auf alveolaren Epithelzellen exprimierten Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) und des epithelialen Zytokins Interleukin (IL)-17C bei rauchinduzierter pulmonaler Entzündung analysiert. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern IL-17C bei einer schweren bakteriellen Pneumonie die pulmonale und systemische Entzündung vermittelt.

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass es durch eine Zigarettenrauchexposition zu einer vermehrten Freisetzung von DAMPs kommt. RAGE ist ein Rezeptor, der mit verschiedenen DAMPs wie HMGB1 (high mobility group box 1) oder S100 Proteinen interagieren kann. Durch immunhistochemische Färbungen konnte festgestellt werden, dass RAGE unter physiologischen Bedingungen im Lungenparenchym von Mäusen gebildet wird. Es zeigte sich, dass RAGE in isolierten primären alveolaren Epithelzellen wesentlich stärker exprimiert wird als in Alveolarmakrophagen. Eine akute Zigarettenrauchexposition führte in den Mauslungen zu einer zusätzlichen Verstärkung der RAGE Expression. Auf Transwells ausdifferenzierte Alveolarepithelzellen, die aus RAGE-defizienten Mäusen isoliert wurden, wiesen verglichen mit Alveolarepithelzellen aus Wildtyp (WT) Mäusen eine verminderte Barrierefunktion auf. Diese ging einher mit einer veränderten Expression von Differenzierungsmarkern und Tight Junction Proteinen in den RAGE-defizienten Alveolarepithelzellen. Es wurde weiterhin untersucht, wie sich eine Defizienz an RAGE auf die Lungenstruktur auswirkt. In raumluftexponierten RAGE-defizienten Mäusen konnte im Vergleich zu WT Tieren ein vergrößerter mean chord length (MCL) und eine erhöhte Compliance des respiratorischen Systems festgestellt werden, während eine Veränderung der alveolaren Oberfläche nicht zu beobachten war. Eine chronische

Zigarettenrauchexposition führte in WT Mäusen zu einem strukturellen Lungenschaden. Dieser war gekennzeichnet durch einen Verlust der alveolaren Oberfläche und einer Vergrößerung des MCLs. Durch invasive Lungenfunktionsmessungen konnte zudem eine Erhöhung der quasi-statischen Compliance in den rauchexponierten WT Mäusen beobachtet werden. RAGE-defiziente Mäuse zeigten nach chronischer Rauchexposition einen mit WT Mäusen vergleichbaren Verlust an alveolarer Oberfläche. Der unter basalen Bedingungen bereits erhöhte MCL wurde durch die Rauchexposition nicht weiter gesteigert. Des Weiteren konnte in den rauchexponierten RAGE-defizienten Mäusen keine Veränderung der quasi-statischen Compliance beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass RAGE die biomechanischen Eigenschaften des Lungenparenchyms beeinflusst, seine Abwesenheit jedoch nicht vor dem durch Zigarettenrauch verursachten Verlust an alveolarer Oberfläche schützt. Im Gegensatz zu RAGE konnte bei dem Zytokin IL-17C weder bei nativen noch bei rauchexponierten Mäusen ein Einfluss auf die Homöostase der Lunge nachgewiesen werden.

In vitro Studien haben gezeigt, dass die durch mikrobielle Faktoren induzierte Expression des epithelialen Zytokins IL-17C in bronchialen Epithelzellen über PRRs vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl *Pseudomonas aeruginosa* als auch IL-17A die Expression von IL-17C in differenzierten alveolaren Epithelzellen aus der Maus induzieren können. In einem akuten *P. aeruginosa* Pneumoniemodell konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Lunge sowie die pulmonale Expression von Neutrophilen-rekrutierenden Chemokinen bei IL-17C-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen vermindert war. Die Lungenpathologie, die anhand eines inflammatorischen Scores bestimmt wurde, ergab keine Unterschiede zwischen WT und IL-17C-defizienten Mäusen. Bei IL-17C-defizienten Mäusen war jedoch die systemische Konzentration an IL-6 vermindert, was mit einem verbesserten Überleben der Tiere einherging. Während die pulmonale Konzentration von IL-17A in IL-17C-defizienten Mäusen verglichen mit WT Mäusen nicht verändert war, zeigte sich, dass eine Defizienz an IL-17A zu einer verringerten Expression von IL-17C in infizierten Mäusen führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die IL-17A vermittelte Expression des epithelialen Zytokins IL-17C die Freisetzung von Chemokinen aus Epithelzellen verstärkt und darüber zu einer pulmonalen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und zu einer systemischen Entzündung bei einer akuten *P. aeruginosa* Pneumonie beiträgt. IL-17C scheint daher ein Faktor zu sein, der bei einer schweren *P. aeruginosa* Pneumonie den Übergang von einer lokalen Entzündung zu einer Sepsis fördert.

Summary

Investigation of the epithelial factors IL-17C and RAGE in bacterial and smoke induced inflammation of the lung

Worldwide, millions of people suffer from acute and chronic pulmonary diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or pneumonia. Typical hallmarks of these diseases are inflammatory processes that are substantially involved in disease progression. As a part of the innate immune system, pulmonary epithelial cells are able to initiate and regulate inflammatory reactions. Pulmonary epithelial cells recognize microbial factors and danger associated molecular patterns (DAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs) and induce signaling cascades that trigger immune responses.

The aim of this work was to determine the function of receptor for glycation endproducts (RAGE) expressed on alveolar epithelial cells and epithelial cytokine interleukin (IL)-17C in smoke induced pulmonary inflammation. It was also examined how IL-17C is involved in pulmonary and systemic inflammation caused by severe bacterial pneumonia.

Several studies have already shown that cigarette smoke exposure results in increased pulmonary release of DAMPs. Moreover, RAGE has been identified as a receptor interacting with many different DAMPs like HMGB1 (high mobility group box 1) or S100 proteins. Immunohistochemical studies of murine lung tissue revealed the presence of RAGE under physiological conditions. Furthermore, in isolated primary alveolar epithelial cells, RAGE was much stronger expressed than in alveolar macrophages. Acute cigarette smoke exposure resulted in an increased expression of RAGE in murine lungs. *In vitro* differentiated alveolar epithelial cells isolated from RAGE-deficient mice exhibited a reduced barrier function compared to alveolar epithelial cells isolated from wildtype (WT) mice. This was accompanied by a skewed expression of differentiation markers and tight junction proteins in RAGE-deficient alveolar epithelial cells. Furthermore, the study sought to investigate how a RAGE deficiency affects the pulmonary structure. Compared to WT mice, air exposed RAGE-deficient mice showed an increase in mean chord length (MCL) and compliance of the respiratory system, whereas there was no difference in the alveolar surface. Chronic cigarette smoke exposure provoked structural

lung damage in WT mice, which was characterized by a loss of alveolar surface and an increase of MCL. Invasive lung function measurements further revealed an increase of the quasi-static compliance in smoke-exposed WT mice. RAGE-deficient mice demonstrated a loss of alveolar surface comparable to WT mice after chronic smoke exposure. The already under basal condition enlarged MCLs were not further increased by cigarette smoke exposure. In addition, smoke-exposed RAGE-deficient mice showed no alterations in the quasi-static compliance. These results suggest that RAGE affects the biomechanical properties of the lung parenchyma, but its deficiency does not protect from cigarette smoke-induced loss of alveolar surface. In contrast to RAGE, no impact on pulmonary homeostasis could be detected for IL-17C in native and smoke-exposed mice.

In vitro studies have shown that PRR-mediated detection of microbial factors induces the expression of the epithelial cytokine IL-17C in bronchial epithelial cells. The present work shows that *Pseudomonas aeruginosa* as well as IL-17A induce IL-17C expression in differentiated alveolar epithelial cells isolated from murine lungs. In an acute *P. aeruginosa* pneumonia model, numbers of neutrophils and the pulmonary expression of neutrophilic chemokines were decreased in IL-17C-deficient mice compared to WT mice. There was no difference in the lung inflammatory score between WT and IL-17C-deficient mice. However, infected IL-17C-deficient mice exhibited decreased systemic concentrations of IL-6, which was associated with increased survival. Whereas pulmonary concentrations of IL-17A were not affected in IL-17C-deficient mice compared to WT mice, a deficiency of IL-17A led to a reduced expression of IL-17C in infected mice. These results show that IL-17A-mediated expression of epithelial cytokine IL-17C amplifies release of chemokines by epithelial cells and thereby contributes to the recruitment of neutrophils and systemic inflammation during acute *P. aeruginosa* pneumonia. Therefore, IL-17C seems to be a factor promoting the transition from local inflammation to sepsis in severe *P. aeruginosa* pneumonia.

2. Einleitung

2.1. Epithelzellen der Lunge

2.1.1. Aufbau und Zusammensetzung des pulmonalen Epithels

Die luftleitenden Atemwege und Lungenbläschen (Alveolen) sind von einer Epithelschicht bedeckt, die das Körperinnere von der Außenwelt abgrenzt. Von der Trachea bis zu den terminalen Bronchien liegt ein Epithel vor, das sich hauptsächlich aus Zilien tragenden Zellen zusammensetzt und daher auch als Flimmerepithel bezeichnet wird. Zwischen den Zilientragenden Zellen können vereinzelt auch sekretorische Zellen wie Becherzellen, Clarazellen, neuroendokrine Zellen, etc. gefunden werden [342]. Basalzellen sind ein weiterer im Atemwegsepithel vorkommender Zelltyp. Bei diesen Zellen handelt es sich um Vorläuferzellen, die sich bei einer Gewebeerkrankung sowohl in Zilien-tragende als auch in sekretorische Zellen ausdifferenzieren können [254]. Während in der Trachea und in den Bronchien ein pseudostratifiziertes, hochprismatisches Epithel vorliegt, wird die Epithelschicht, je tiefer man in die Lunge eindringt, immer flacher [66]. Die Epithelschicht in den Alveolen weist daher nur noch eine Dicke von weniger als 1 μm auf, wodurch ein effektiver Gasaustausch ermöglicht wird [119]. Anders als das Flimmerepithel der Atemwege setzt sich das Epithel der Alveolen aus den alveolaren Typ I und Typ II Pneumozyten zusammen. Die Alveolar Typ I Zellen sind sehr großflächige und dünne Zellen, die sehr stark mit den Endothelzellen der pulmonalen Kapillaren interagieren [342]. Zwar belegen die Alveolar Typ I Zellen fast 95% der gesamten Oberfläche des Alveolarraumes, anteilmäßig sind die Alveolar Typ II Zellen jedoch häufiger vertreten. Die Alveolar Typ II Zellen besitzen eine kubische Form und sind durch lipidreiche Lamellarkörper und apikale Mikrovilli charakterisiert [64, 209].

2.1.2. Funktionen der pulmonalen Epithelzellen

Die Epithelzellen der Lunge besitzen entsprechend ihrer Lokalisation im respiratorischen System unterschiedliche Aufgaben. In den Atemwegen übernimmt das Epithel eine wichtige Reinigungs- und Schutzfunktion. Atemwegsepithelzellen produzieren neben verschiedenen Muzinen,

antimikrobielle Proteine wie Lysozym und Siderocaline sowie antimikrobielle Peptide, die in den Atemwege auskleidenden Flüssigkeitsfilm (Mucus) abgegeben werden [107, 227]. In diesem Flüssigkeitsfilm werden Schmutzpartikel, Mikroben und andere Substanzen gebunden und mikrobielles Wachstum gehemmt [90, 345]. Durch die rhythmische Zilienbewegung des Flimmerepithels werden die im Mucus gefangenen Fremdkörper aus der Lunge heraustransportiert. Dieser Schutzmechanismus wird als mukoziliäre Klärung bezeichnet [126, 170].

Die Alveolar Typ I Epithelzellen sind für den effektiven Gasaustausch von sehr großer Bedeutung [209]. In der tiefen Lunge tritt der eingeatmete Sauerstoff durch Diffusionsprozesse direkt in das Blut über. Dieser passive Transport ist nur möglich, da die alveolare Epithelschicht eine sehr dünne und flache Morphologie aufweist und ein direkter Kontakt zum Endothel besteht. An der gleichen Stelle wird auch Kohlendioxid (CO_2), das während den Stoffwechselprozessen als Abfallprodukt gebildet wird, aus dem Körper abtransportiert. CO_2 überquert die Membranen der Endothel- und alveolaren Epithelzellen entlang eines Konzentrationsgradienten und kann anschließend in der Expirationsphase aus der Lunge abgeatmet werden [143].

Eine Hauptfunktion der Alveolar Typ II Epithelzellen liegt in der Biosynthese von pulmonalem Surfactant, das eine wichtige Rolle in der Lungenmechanik übernimmt [209]. Surfactant setzt sich aus Phospholipiden und Proteinen zusammen und ist ein bedeutender Bestandteil des Flüssigkeitsfilms, der die Alveolen auskleidet. Die Surfactantschicht verursacht eine Verringerung der Oberflächenspannung und verhindert dadurch ein Kollabieren der Alveolen [126].

Zusätzlich zu den beschriebenen spezifischen Aufgaben bilden die respiratorischen und alveolaren Epithelzellen der Lunge eine wichtige physikalische Barriere aus, welche die Translokation von eingeatmeten Pathogenen oder anderen schädlichen Substanzen in den Organismus verhindert [119]. Die Barriereigenschaften der epithelialen Oberfläche der Lunge hängen maßgeblich von interzellulären Kontakten, den sogenannten Tight Junctions, ab. Tight Junctions, die sich auch in den mikrovaskulären Zellen der Lunge befinden, regulieren den parazellulären Molekültransport und den Übertritt von Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf in das Gewebe [121, 178].

2.2. Das angeborene Immunsystem der Lunge

Bei einem gesunden Erwachsenen werden durch die Atmung jeden Tag bis zu 15.000 Liter Luft in die Lunge transportiert. Durch diesen Vorgang gelangen auch Hunderte von Mikroorganismen in die Atemwege [212]. Trotz der hohen Menge an aufgenommenen Mikroben werden große Abschnitte der Lunge als nahezu steril angesehen. Während die Rachenschleimhaut mit einer Vielzahl an Mikroorganismen kolonisiert ist, können im Alveolarraum nur vereinzelt einige nicht pathogene Mikroben detektiert werden [236]. Um die Sterilität der Lunge aufrechtzuerhalten und das pulmonale Gewebe vor eindringenden Krankheitserregern und anderen schädlichen Substanzen zu schützen, ist ein effektives Abwehrsystem vorhanden, durch das eine schnelle Eliminierung der Fremdstoffe bei einer gleichzeitigen Unversehrtheit des körpereigenen Gewebes stattfindet. Die Epithelzellen der Lunge sind maßgeblich an diesen Abwehrmechanismen beteiligt. Neben der Ausbildung einer physikalischen Barriere und der mukoziliären Klärung leisten sie gemeinsam mit klassischen Immunzellen wie residente Alveolarmakrophagen, dendritische Zellen (DCs) und neutrophile Granulozyten auch einen entscheidenden Beitrag zur Regulation der Immunantwort des respiratorischen Systems [13, 208, 211, 342].

2.2.1. Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)

Das angeborene Immunsystem kann über PRRs Mikroorganismen sowie deren Produkte erkennen und Signalkaskaden in Gang setzen, die zu einer angemessenen Abwehrreaktion führen. PRRs nehmen die Mikroben durch das Erkennen von Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs: pathogen associated molecular patterns) wahr. Dabei handelt es sich um konservierte Struktur motive oder Moleküle, die von essentieller Bedeutung für die Mikroorganismen sind. Typische Beispiele für PAMPs sind Substanzen, die in den Zellwänden bzw. Zellmembranen von Bakterien vorkommen wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)-Moleküle aus dem Virusgenom [152].

Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass PRRs auch endogene Moleküle erkennen können, die bei einer Gewebeverletzung durch geschädigte Zellen freigesetzt werden. Solche Moleküle werden als DAMPs bezeichnet und alarmieren das Immunsystem über die Aktivierung der PRRs [236, 248]. Zu den DAMPs zählen intrazelluläre und nukleäre Proteine (HMGB1, S100 Proteine), Purinmetabolite (Adenosintriphosphat (ATP), Harnsäure) und Nukleinsäuren

(doppelsträngige genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA)), die unter physiologischen Bedingungen nur im Zellinnern vorkommen [174, 248]. In Folge einer Zellschädigung kann die Integrität der Plasmamembran verloren gehen, sodass DAMPs aus den Zellen freigesetzt werden [174].

PAMPs und DAMPs können durch verschiedene PRR Familien extra- und intrazellulär erkannt werden. Die PRR Familien beinhalten dabei neben Transmembranproteinen wie den TLRs (Toll-like Rezeptoren) auch zytoplasmatische Sensoren wie die RLRs (Retinsäure-induzierbares Gen I (RIG-I) ähnliche Rezeptoren) und die NLRs (Nukleotidbinde-Oligomerisierungsdomäne (NOD) ähnliche Rezeptoren) [315].

Die TLR sind die bekanntesten und mit am besten erforschtesten PRRs. Im Menschen konnten bisher zehn verschiedene Mitglieder dieser Rezeptorfamilie entdeckt werden, die entweder auf der zellulären Oberfläche oder auf der endosomalen Membran exprimiert werden. TLRs können Homo- und Heterodimere ausbilden und sind dadurch in der Lage eine Vielzahl an unterschiedlichen PAMPs zu erkennen [87, 315]. Der TLR2 ist beispielsweise zusammen mit TLR1 oder TLR6 für die Detektion von bakteriellen Zellwandkomponenten wie tri- bzw. diacetylierte Lipoproteine oder Lipoteichonsäure verantwortlich, während bakterielles Flagellin über TLR5 erkannt wird. Zudem besitzen einige TLRs eine hohe Empfindlichkeit gegenüber verschiedener DAMPs wie endogenes Hyaluron und HMGB1. TLR4 wird nicht nur über die Bindung von LPS, sondern auch durch Hyaluron, HMGB1 sowie oxidierte Lipoproteine und Phospholipide aktiviert. TLR3 ist sowohl ein wichtiger Detektor für doppelsträngige virale RNA, als auch für endogene mRNA (messenger RNA), die durch nekrotische Zellen freigesetzt wird [5, 208, 236]. In der Lunge exprimieren die verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems ein unterschiedliches Spektrum an TLRs. Alveolarmakrophagen sind durch eine hohe Expressionsrate von TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 und TLR8 gekennzeichnet und können in geringen Mengen auch TLR3, TLR5, TLR6 und TLR9 produzieren [140, 207]. Das TLR Repertoire von DCs hängt sehr stark von der jeweiligen Subpopulation ab. Während myeloide DCs durch eine ausgeprägte TLR1-4, TLR6 und TLR8 Expression charakterisiert sind, werden TLR7 und TLR9 im besonders hohen Maße von plasmazytoiden DCs exprimiert [74]. TLR1-6 und TLR9 werden zudem von Atemwegs- und alveolaren Epithelzellen produziert [115, 211]. Die Aktivierung der TLRs führt zu einer vermehrten Expression und Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8 und

Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie antimikrobiellen Peptiden wie dem humanen β -Defensin (hBD)-2 [5, 30, 115].

NLRs sind lösliche im Zytosol vorkommende Proteine, die PAMPs und DAMPs im intrazellulären Kompartiment der Wirtszelle detektieren können. Die bekanntesten Vertreter dieser Rezeptorfamilie sind die beiden NOD-Rezeptoren NOD1 und NOD2. In der Lunge wird NOD1 von einer Vielzahl verschiedener Zellen wie Leukozyten, Endothel-, Epithel- und glatten Atemwegsmuskelzellen exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die NOD2 Expression auf Alveolarmakrophagen, DCs und Lungenepithelzellen beschränkt [47, 191]. Die NOD-Rezeptoren fungieren als mikrobielle Sensoren, indem sie spezielle Bestandteile der bakteriellen Peptidoglykane wie Muramyldipeptid (NOD2-Ligand) oder meso-Diaminopimelinsäure (NOD1-Ligand) erkennen können [45, 60, 111]. Eine weitere Subgruppe der NLR-Rezeptorfamilie sind die NLRP Proteine. Einige Vertreter dieser Rezeptoren sind dafür bekannt, an der Ausbildung von heterogenen Multiproteinkomplexen, den sogenannten Inflammasomen, beteiligt zu sein. Ein Inflammasom setzt sich aus einem oder zwei verschiedenen NLRP Proteinen, dem Adaptermolekül ASC und dem Zymogen pro-Caspase 1 zusammen. Durch die Aktivierung des Inflammasoms als Antwort auf die intrazelluläre Detektion eines PAMPs oder DAMPs kommt es zu einer Spaltung des Zymogens und die pro-Caspase 1 wird in ihre aktive Enzymform Caspase 1 überführt. Dieses Enzym fördert daraufhin die Prozessierung der im Zytosol vorkommenden Zytokinorstufen pro-IL-1 β und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen IL-1 β und IL-18, die von der Zelle sezerniert werden können [47, 331]. Eines der bekanntesten Inflammasom ausbildenden Proteine ist NLRP3, das von einer Vielzahl von myeloiden Zellen wie z.B. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie von bronchialen und alveolaren Epithelzellen exprimiert wird [136, 180, 271]. Die Aktivierung von NLRP3 kann durch eine heterogene Gruppe von strukturell und chemisch unterschiedlichen Substanzen erfolgen. Neben bakteriellen und viralen PAMPs sind auch Feinstaubpartikel und DAMPs wie Harnsäure, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder ATP Liganden von NLRP3 [136, 153, 191, 271].

Eine weitere zytoplasmatische Rezeptorfamilie sind die RLRs, die bei der Bekämpfung einer viralen Infektion von großer Bedeutung sind. Die beiden bekanntesten Vertreter RIG I und MDA5 (Melanom-Differenzierungsantigen 5) sind für die Erkennung viraler RNA Spezies im Zytoplasma der Wirtszelle verantwortlich [114, 315, 328]. Während RIG I bevorzugt an kurze doppelsträngige RNA Moleküle bindet, die durch glatte Endungen und durch eine 5' terminale Triphosphatgruppe charakterisiert sind, kann der MDA5 vor allem lange doppelsträngige RNA

Moleküle unabhängig von ihrer Endung erkennen [258]. Nach der Aktivierung der Rezeptoren durch die Ligandenbindung kommt es in beiden Fällen zur Induktion viraler Abwehrmechanismen, die durch eine verstärkte Expression von Typ I Interferonen dominiert wird. Anders als beispielsweise die Viren erkennenden TLRs, die hauptsächlich in Makrophagen und DCs vorkommen, werden die RLRs im Zytosol von fast allen Zelltypen im Organismus exprimiert [315, 328].

2.2.2. Lösliche Substanzen

Lösliche Substanzen wie antimikrobielle Proteine bzw. Peptide oder Zytokine sind ebenfalls wichtige Bestandteile der angeborenen Immunität der Lunge. Bereits im Jahre 1922 entdeckte der Bakteriologe Alexander Fleming, dass in dem wässrigen Flüssigkeitsfilm, der das pulmonale Epithel bedeckt, Substanzen enthalten sind, die einen schädlichen Effekt auf Mikroorganismen ausüben [98]. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Lysozym, Lactoferrin, Defensine und Cathelicidine, die von Lungenepithelzellen direkt sezerniert oder aus den Speicherorganellen von Immunzellen freigesetzt werden [269]. Lysozym und Lactoferrin sind zwei Substanzen, die in besonders hohen Konzentrationen im Atemwegssekret gefunden werden können. Beide Proteine haben antimikrobielle Eigenschaften, die sich jedoch in ihren Wirkmechanismen unterscheiden. Lysozym ist ein Protein, das die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen den N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminresten in bakteriellen Peptidoglykanen spaltet, wodurch die Lyse der Bakterienzelle eingeleitet wird. Im Gegensatz dazu besitzt Lactoferrin eine bakteriostatische Wirkung. Lactoferrin hemmt das Wachstum von Bakterien, indem es Eisenionen bindet, die für den bakteriellen Stoffwechsel von essentieller Bedeutung sind [242].

Defensine sind kleine 3 bis 5 Kilodalton (kDa) schwere kationische Peptide, deren Struktur durch sechs Cysteinreste dominiert wird, die über drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Je nach Anordnung der Cysteine in der Aminosäureabfolge unterscheidet man bei den humanen Defensinen (HD) die beiden Hauptgruppen α - und β -Defensine [12, 107, 134]. Die Gruppe der α -Defensine setzt sich aus den humanen neutrophilen Peptiden (HNP) 1 bis 4 und den beiden epithelialen Defensinen HD-5 und HD-6 zusammen. Während HD-5 und HD-6 hauptsächlich von den Panethzellen des Dünndarms exprimiert werden und in der Lunge nur eine untergeordnete Bedeutung haben, übernehmen die HNPs eine wichtige Funktion in der pulmonalen Pathogenabwehr. HNPs werden hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten

gebildet und in den azurophilen Granula gespeichert, in denen sie für die intrazelluläre Tötung von aufgenommenen Mikroorganismen zuständig sind. Nach einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten können die HNPs zudem aus den Granula in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [12, 107, 320]. Die hBDs werden hauptsächlich von Epithelzellen produziert und eher seltener durch Degranulation von myeloiden Immunzellen freigesetzt [79, 320]. Gewebe, die eine besonders hohe Expressionsrate an hBDs aufweisen, sind der Gastrointestinaltrakt, die Haut und die Lunge. hBDs werden in den Epithelzellen zunächst als Vorläuferproteine synthetisiert und erst nach einer proteolytischen Reifung als aktives antimikrobielles Peptid freigesetzt [117]. Die bekanntesten β -Defensine im menschlichen Organismus sind die hBD-1 bis 4. Während hBD-1 konstitutiv exprimiert wird, muss die Expression von hBD-2 bis 4 durch einen bakteriellen, viralen oder fungalen Stimulus induziert werden [13, 117, 242]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die epitheliale Regulation der hBD Expression nach einer mikrobiellen Pathogenerkennung durch TLRs reguliert wird [13, 22, 30, 269, 320]. So verursacht beispielsweise LPS durch einen CD (cluster of differentiation) 14, TLR4 und NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) vermittelten Mechanismus eine Induktion der hBD-2 Expression in respiratorischen Epithelzellen [22]. Zwar besitzen die einzelnen Defensine eine spezifische antimikrobielle Aktivität und können daher manche Krankheitserreger effektiver bekämpfen als andere, die Zerstörung der Pathogene verläuft im Allgemeinen jedoch nach dem gleichen Prinzip. Die positiv geladenen Defensine binden aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an die negativ geladene Zellmembran von Mikroorganismen und permeabilisieren diese im Anschluss durch Porenbildung [12, 269].

Bei den Cathelizidinen handelt es sich ebenfalls um eine kationische Proteinfamilie, die durch eine hoch konservierte N-terminale Propeptiddomäne namens Cathelin und einer variablen C-terminalen Peptiddomäne charakterisiert ist [359]. Bei der C-terminalen Domäne handelt es sich um das eigentliche antimikrobielle Peptid, das durch proteolytische Spaltung freigesetzt und aktiviert wird [107]. Das einzige bekannte humane Cathelizidin ist das hCAP-18, das nach proteolytischer Reifung das antimikrobiell wirksame Peptid LL-37 freisetzt [85, 307]. hCAP-18/LL-37 wird von neutrophilen Granulozyten [63, 306] sowie von einigen Lymphozyten- und Makrophagensubpopulationen [3] und verschiedenen Epithelien synthetisiert [11, 102, 125]. Die Abtötung von mikrobiellen Pathogenen durch LL-37 erfolgt genau wie bei den Defensinen durch eine Permeabilisierung der Zellwände [12, 85].

Zusätzlich zu den antimikrobiellen Peptiden stellen verschiedene Zytokine eine weitere wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems der Lunge dar. Zytokine sind Signalmoleküle, die von einer Vielzahl von Zelltypen produziert werden und durch die Zellen miteinander kommunizieren und immunologische Abwehrreaktionen regulieren. Um einen Effekt in einer Zielzelle ausüben zu können, müssen die Zytokine mit spezifischen Rezeptoren interagieren, die auf den Zelloberflächen exprimiert werden. Jedes Zytokin kann dabei an verschiedene Rezeptoren binden und gleichzeitig kann auch jeder Rezeptor mit unterschiedlichen Zytokinen interagieren. Neben dieser Bindungs-Promiskuität ist das Zytokin-Rezeptor-System durch Pleiotropie, eine hohe Redundanz und Polyspeirismus gekennzeichnet. Die Pleiotropie äußert sich darin, dass ein Zytokin mehrere verschiedene Effekte in einer Zelle hervorrufen kann. Jeder einzelne Effekt kann wiederum von unterschiedlichen Zytokinen ausgelöst werden, wodurch eine hohe Redundanz vorliegt. Der Polyspeirismus ist eine weitere Form der Redundanz, der dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle als Antwort auf einen pathogenen Stimulus gleichzeitig eine große Menge an verschiedenartigen Zytokinen produzieren kann [321]. Durch dieses hochkomplexe Zytokin-Rezeptor-Netzwerk liegt ein sehr robustes Signalsystem vor, durch das immunologische Abwehrreaktionen reguliert werden.

Proinflammatorische Zytokine werden nach einer PRR vermittelten Erkennung von mikrobiellen Pathogenen von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und pulmonalen Epithelzellen freigesetzt. Zu den ersten Botenstoffen, die in Folge der PRR-Signalskaskade sezerniert werden, gehört $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ [311]. Beide Zytokine fördern auf indirektem Weg die Rekrutierung von Entzündungszellen an den Infektionsherd. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ verstärken die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen was z.B. die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus der Blutzirkulation in das Lungengewebe erleichtert. Außerdem induzieren sie die Expression von anderen proinflammatorischen Botenstoffen wie IL-6 , RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) [53, 321].

Chemotaktische Zytokine (Chemokine) sind für die Rekrutierung von Immunzellen in das entzündete Gewebe verantwortlich. Die Chemokinfamilie besteht aus mehr als 40 Vertretern und kann je nach Position ihrer initialen Cysteinreste in die vier Hauptgruppen CXC-, CC-, C- und CX_3C -Chemokine unterteilt werden [88, 327]. Eines der bekanntesten Chemokine ist das IL-8 , das gemäß seiner Familienzugehörigkeit auch als CXCL8 bezeichnet wird. Zusammen mit $\text{Gro-}\alpha$ (growth related oncogene- α ; CXCL1) und ENA-78 (epithelial-derived neutrophil activator;

CXCL5) ist es maßgeblich für die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich [53, 321, 327]. Andere Chemokine wie MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1; CCL2), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α ; CCL1) oder RANTES (CCL5) locken hingegen Monozyten, Lymphozyten oder eosinophile Granulozyten zu geschädigten Stellen im Gewebe [53].

Neben den entzündungsfördernden Substanzen werden auch antiinflammatorische Zytokine freigesetzt, die einen inhibierenden Effekt auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen ausüben. Antiinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-4, IL-10 oder TGF- β (transforming growth factor β) verhindern eine überschießende Immunreaktion und eine damit einhergehende Zerstörung von körpereigenem Gewebe [19, 311].

2.2.3. Entzündungszellen

Makrophagen

Makrophagen sind spezialisierte hämatopoetische Immunzellen, die in verschiedenen Organen und Geweben des menschlichen Körpers zu finden sind. Neben der Aufrechterhaltung der Homöostase sind diese Zellen an Umbauprozessen des Gewebes sowie an immunologischen Abwehrreaktionen beteiligt [185]. In einer gesunden Lunge kommen residente Makrophagen vor allem im alveolaren Kompartiment vor, weshalb diese Zellen auch als Alveolarmakrophagen bezeichnet werden. Mit rund 95% aller in den Alveolen einer gesunden Lunge vorkommender Leukozyten stellen die Alveolarmakrophagen die größte Gruppe dar und werden somit als eine der wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems der Lunge angesehen [208]. Generell sind die Alveolarmakrophagen mit einer Turnoverrate von 40% in einem Jahr sehr langlebige Zellen [148]. Die Erneuerung der Zellpopulation kann auf zwei unterschiedlichen Arten erfolgen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass sich residente Makrophagen aus Monozyten einwickeln, die aus der Blutzirkulation in das pulmonale Gewebe eingewandert sind [210]. Neuere Studien zeigen jedoch zudem, dass sich Alveolarmakrophagen auch durch Proliferation selbstständig erneuern können [127, 357].

Die Hauptfunktion der Alveolarmakrophagen liegt sowohl unter physiologischen als auch unter pathogenen Bedingungen in der Phagozytose und intrazellulären Eliminierung von Krankheitserregern, Schadstoffen, apoptotischen und nekrotischen Zellen sowie Zelltrümmern

[148, 301]. Aufgrund ihrer exponierten Lage in den Alveolen kommen die Makrophagen kontinuierlich mit inhalierten Substanzen und Mikroorganismen in Kontakt und stellen somit gemeinsam mit den Epithelzellen die erste Verteidigungslinie gegenüber eingedrungenen Schadstoffen und Krankheitserregern dar [185, 340]. Handelt es sich bei den eingeatmeten Substanzen um harmlose Stoffe, verbleiben die Alveolarmakrophagen in einem Ruhezustand, der durch eine geringe phagozytotische Aktivität und eine eingeschränkte Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen gekennzeichnet ist [148, 185]. Werden die Alveolarmakrophagen jedoch nach einer PRR vermittelten Detektion von mikrobiellen Pathogenen aktiviert, sezernieren sie verschiedene proinflammatorische Mediatoren und lösen eine lokale Entzündungsreaktion aus [135, 148]. Neben $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 oder GM-CSF werden auch Chemokine wie MCP-1, IL-8 , MIG (monokine induced by interferone ($\text{IFN } \gamma$)), IP-10 (IFN -inducible 10 kDa protein) oder I-TAC (IFN -inducible T cell α chemoattractant) freigesetzt, die neutrophile Granulozyten, Monozyten sowie Typ 1 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen an den Entzündungsherd locken [135, 240]. Von Alveolarmakrophagen abgegebene Zytokine wie beispielsweise $\text{IL-1}\beta$ oder $\text{TNF}\alpha$ aktivieren zudem pulmonale Epithelzellen, was zu einer gesteigerten epithelialen Expression von PRRs, Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden führt [65, 324]. Neben der Phagozytose und der Immunmodulation übernehmen die Alveolarmakrophagen auch eine wichtige Funktion in der Antigenpräsentation. Nach der Aufnahme und Verinnerlichung von Fremdkörpern oder Pathogenen werden die Substanzen im Endosom der Zelle verdaut. Die dabei entstandenen Peptidfragmente (Antigene) werden im Anschluss zusammen mit den Haupthistokompatibilitätskomplexen MHC (major histocompatibility complex) Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert und können in den drainierten Lymphknoten native T-Zellen aktivieren, wodurch eine adaptive Immunantwort initiiert wird [135, 168].

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind Immunzellen, die im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet werden und mit dem Blutstrom durch den gesamten Körper zirkulieren [35, 173]. Da neutrophile Granulozyten nur eine geringe Lebensdauer von einigen Stunden bis zu wenigen Tagen aufweisen, liegt ihre Generierungsrate bei bis zu $2 \cdot 10^{11}$ Zellen pro Tag. Die Produktion der Zellen kann allerdings z.B. im Falle einer Infektion durch die vermehrte

Freisetzung von G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) noch zusätzlich gesteigert werden [35].

In einer gesunden Lunge sind neutrophile Granulozyten nur in einem sehr geringen Maße zu finden und stellen lediglich 1% der Gesamtzahl an pulmonalen Leukozyten dar [208]. Durch Chemokine wie IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β oder MIP-2, die von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen nach einer Pathogenerkennung freigesetzt werden, findet jedoch eine massive Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Entzündungsherd statt [340]. Als primäre Effektorzellen der frühen inflammatorischen Antwort liegt ihre Hauptfunktion in der intra- und extrazellulären Elimination von Mikroorganismen [173, 301, 340]. Neutrophile Granulozyten bilden während ihrer Reifung verschiedene lysosomale Granula aus, die mit antimikrobiellen Proteinen und Peptiden gefüllt sind. Die azurophilen oder primären Granula beinhalten neben Defensinen und Lysozym auch Myeloperoxidasen und Proteinasen. Spezifische oder sekundäre Granula sind dagegen durch das Vorhandensein von Cathelizidinen, Lactoferin, Azurocidin und Elastasen charakterisiert [173, 296, 301, 340]. Neutrophile Granulozyten zählen genau wie Makrophagen zu den phagozytotisch aktiven Zellen und können daher Mikroorganismen in ihr Inneres aufnehmen und in intrazellulären Vesikeln (Phagosomen) verkapseln. Das Abtöten der Mikroorganismen erfolgt durch die Verschmelzung der Phagosomen mit den Granula und der daraus resultierende Freisetzung der antimikrobiellen Substanzen [173]. Durch ROS wie das Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale (OH^\bullet), die durch einen Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH)-Oxidase abhängigen Prozess gebildet werden, steht den neutrophilen Granulozyten ein weiterer Mechanismus zur Verfügung, mittels dem Mikroorganismen eliminiert werden können [296]. Die antimikrobiellen Proteine bzw. Peptide und die ROS können zudem in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden und können daher auch Mikroorganismen außerhalb der Zelle abtöten. In den letzten Jahren konnte außerdem gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten noch über einen weiteren extrazellulären Eliminationsmechanismus verfügen. Neutrophile Granulozyten setzen sogenannte NETs (neutrophil extracellular traps) frei, wobei es sich um DNA-Elemente handelt an deren Histone Granulaproteine gebunden sind. Mit Hilfe der NETs werden die Mikroorganismen immobilisiert und können durch die gebundenen antimikrobiellen Peptide direkt abgetötet werden. Zudem wird die Phagozytose der Mikroorganismen erleichtert, wodurch die Ausbreitung der Mikroorganismen zusätzlich verhindert wird [38, 104, 173].

Dendritische Zellen (DCs)

DCs sind die wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen und übernehmen daher eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Im Allgemeinen sind DCs hauptsächlich in Geweben und Organen lokalisiert, die häufig mit großen Antigenmengen in Kontakt kommen. Neben dem Darm, der Haut oder der Milz befindet sich daher auch in der Lunge ein umfangreiches DC-Netzwerk, das sich zwischen den Atemwegen, dem Lungenparenchym, dem pulmonalen Gefäßsystem und den bronchialen Lymphknoten erstreckt [186, 334]. Die Hauptfunktion der DCs besteht in der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen, wobei letzteres in den drainierenden Lymphknoten stattfindet und zu einer Aktivierung der ortsansässigen T-Lymphozyten führt. DCs besitzen die Fähigkeit, eine Vielzahl an unterschiedlichen Antigenen zu erkennen und durch Endozytose in ihr Inneres aufzunehmen. Nach deren Prozessierung in den endozytotischen Vesikeln können die Antigene mittels MHC Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden [77, 186, 334]. Über chemotaktische Botenstoffe werden die DCs in angrenzende Lymphknoten geleitet, wo sie mit Hilfe der Antigenpräsentation native T-Lymphozyten stimulieren können [126, 334]. Liegen im Gewebe normale Bedingungen vor, nehmen die DCs nur harmlose Antigene auf und induzieren vor allem tolerogene oder regulatorische T-Zellen, die hauptsächlich immunosupprimierende Zytokine wie IL-10 und TGF- β freisetzen [334]. Werden die Antigene jedoch unter entzündlichen Bedingungen aufgenommen, so werden die DCs durch vorliegende PAMPs und DAMPs zusätzlich aktiviert und durchlaufen einen Reifungsprozess. Im Verlauf dieses Prozesses verlieren die DCs ihre Antigenaufnahme- und Prozessierungsfähigkeit und spezialisieren sich auf die T-Lymphozytenaktivierung. Dazu exprimieren sie vermehrt kostimulierende Faktoren und Zytokine, welche für die Proliferation und Polarisation von antigenspezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten gebraucht werden [77, 334]. Die DCs stellen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort dar.

2.3. Entzündliche Erkrankungen der Lunge

Weltweit leiden Millionen von Menschen unter akuten und chronischen Erkrankungen der Lunge. Akute respiratorische Infektionen, COPD, Asthma, Tuberkulose und Lungenkrebs gehören zu den fünf am häufigsten auftretenden pulmonalen Erkrankungen und sind zudem mit

einer hohen Mortalitätsrate assoziiert [95]. Die aufgeführten Krankheiten gehen mit schweren Entzündungen der Atemwege und des Lungenparenchyms einher und können auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden [36, 43, 61, 112, 165, 217, 358]. Neben der zunehmenden Luftverschmutzung durch die erhöhte verkehrsbedingte und industrielle Emission von Feinstaubpartikeln und Abgasen, der Inhalation von Zigarettenrauch oder anderen schädlichen Substanzen sind auch pathogene Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren für die Induktion der verschiedenen Krankheitsbilder verantwortlich [95].

2.3.1. Die COPD als ein Beispiel einer rauchinduzierten entzündlichen Erkrankung der Lunge

Die COPD ist eine lebensbedrohliche Erkrankung der Lunge, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO: World Health Organization) auf der Liste der häufigsten Todesursachen auf dem vierten Platz geführt wird. Zurzeit sterben jedes Jahr rund drei Millionen Menschen an den Folgen der Erkrankung (The Global Burden of Disease: Update 2004; WHO 2008). Verschiedene Prognosen lassen jedoch vermuten, dass diese Zahl in den nächsten Jahren durch die globale Zunahme der COPD Risikofaktoren noch weiter ansteigen wird [284]. Weltweit gilt das Zigarettenrauchen als der Hauptrisikofaktor, der für die Entstehung einer COPD verantwortlich gemacht wird [326]. Die zunehmende Luftverschmutzung durch Verkehr und Industrie [278], die beruflich bedingte Exposition mit schädlichen Substanzen [10, 278] und die Inhalation von Partikeln, die durch Verbrennung von Biomassebrennstoffen zur Energiegewinnung im Haushalt entstehen [89, 238, 278], werden jedoch ebenfalls als Auslöser für die Erkrankung beschrieben.

Die COPD ist durch pathologische Veränderungen in den kleinen Atemwegen und im Alveolarraum gekennzeichnet, die zu einer progressiven und irreversiblen Störung des pulmonalen Luftstromes führen (The Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2016. <http://www.goldcopd.org/>). In den kleinen Atemwegen von COPD-Patienten können verschiedene Abnormalitäten festgestellt werden, die gemeinsam zu einer Verminderung des Atemwegsdurchmessers und somit zu einer Beeinträchtigung des Luftflusses beitragen. Pathologische Veränderungen der Epithelzellen wie eine Hyperplasie der mukusbildenden Becherzellen und eine damit einhergehende gesteigerte Bildung und Sezernierung von Mukus

verursachen durch die vermehrte Ablagerung von zähflüssigem Schleim eine luminale Okklusion der Atemwege [14, 138, 358]. Durch fibrotische Veränderungen der Atemwegswände und durch Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskelzellen kommt es zusätzlich zu einer Verengung der Atemwege, wodurch der Luftstrom vor allem in der Expirationsphase behindert wird [14, 15, 138]. Ein weiteres charakteristisches Merkmal der COPD ist das Emphysem. Dabei handelt es sich um eine pathologische Überblähung der distalen Lufträume, die auf eine Zerstörung des Alveolargewebes zurückzuführen ist [54]. Durch die Schädigung der Alveolarstrukturen und dem damit verbundenen Verlust an elastischen Fasern kommt es zu einer Verringerung der elastischen Rückstellkräfte der Lunge. Dies hat zur Folge, dass die Luft während der Expiration in den Alveolen gefangen bleibt und nicht vollständig ausgeatmet werden kann [54, 139].

Die Ursache für die pathologischen Veränderungen in den Atemwegen und im Alveolarraum liegt in einer komplexen Entzündungsreaktion, die durch den Einfluss des Zigarettenrauches entsteht [358]. Gemäß der gegenwärtigen Lehrmeinung sind dabei vor allem die im Zigarettenrauch enthaltenen freien Radikale in Form von ROS und Stickstoffverbindungen sowie reaktive chemische Verbindungen wie z.B. Aldehyde für die Induktion der entzündlichen Prozesse verantwortlich [310, 358]. Die aufgeführten Substanzen schädigen die Atemwegsepithelzellen durch Peroxidation von Lipiden oder anderen Membrankomponenten, induzieren DNA-Schäden oder aktivieren zelluläre Signalkaskaden, die zum Tod der Zelle führen. Durch diese Vorgänge kommt es zu einer Freisetzung von DAMPs und anderen Signalmolekülen wie TNF α , die in den Zellen des angeborenen Immunsystems der Lunge eine Entzündungsreaktion auslösen [189, 248].

Die zelluläre und humorale Immunantwort in der COPD ist durch eine vermehrte Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α [19, 53] sowie durch eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und CD8⁺ T-Lymphozyten in den Atemwegen und im Alveolarraum charakterisiert [17].

Neutrophile Granulozyten können sowohl im Sputum [166, 232] als auch im Bronchialgewebe [78, 182] von COPD-Patienten in besonders hohen Mengen gefunden werden. Die Zellen werden durch chemotaktische Faktoren wie IL-8 oder Leukotrien B₄ (LTB₄) aus der Blutzirkulation zum pulmonalen Entzündungsherd gelockt [23, 81, 319]. Welche genaue Funktion die neutrophilen Granulozyten in der COPD übernehmen, ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Auffällig ist jedoch, dass die vermehrte Akkumulation der neutrophilen Granulozyten mit einer deutlichen

Zunahme der Atemwegsobstruktion und einem Verlust an Lungenfunktion korreliert [78, 232, 308]. Die Verminderung des Atemwegsdurchmessers kann zum Teil auf Substanzen zurückgeführt werden, die im hohen Maße von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden. Serinproteasen wie Neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G oder Proteinase 3, die nach einer Zellaktivierung aus den spezifischen Granula abgegeben werden, gelten als starke Stimulantien, die eine übermäßige Mukussekretion hervorrufen können [17]. Zudem konnte unter *in vitro* Bedingungen gezeigt werden, dass von neutrophilen Granulozyten hervorgerufener oxidativer Stress die Synthese des Muzins MUC5AC fördert und eine Becherzellhyperplasie induzieren kann [97, 316]. Weitere Studien lassen zudem vermuten, dass neutrophile Granulozyten durch die Freisetzung von NE oder den beiden Matrixmetalloproteasen (MMP) 8 und 9 auch an der Zerstörung von Alveolarstrukturen beteiligt sind [17]. In verschiedenen *in vivo* Studien konnte beobachtet werden, dass die intratracheale Applikation von NE in Nagern zu einer ausgeprägten Schädigung des Lungenparenchyms führt [31, 339]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine NE-Deletion [294] oder eine MMP-9 Blockade durch spezifische Inhibitoren [57] die Ausbildung eines zigarettenrauchinduzierten Emphysems verhindern kann.

Den Makrophagen wird ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Entstehung eines Emphysems zugesprochen [16]. Vor allem in den Bereichen, in denen sich die emphysematösen Veränderungen zuerst manifestieren, können Makrophagen bevorzugt gefunden werden [293]. Zudem beschreiben viele Studien, dass die Makrophagendichte im Lungenparenchym in einer direkten Verbindung zu dem Ausmaß der parenchymalen Zerstörung steht [78, 96, 262]. Durch verschiedene Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die proteolytischen Enzyme MMP-2, MMP-9, MMP-12, Cathepsin K, L und S, die von aktivierten Alveolarmakrophagen sezerniert werden, an der Degradation von extrazelluläre Matrix (EZM) Bestandteilen wie z.B. Elastin beteiligt sind und dadurch die Zerstörung der alveolaren Strukturen begünstigen [16, 273]. Alveolarmakrophagen, die aus COPD-Patienten gewonnen wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen aus gesunden Personen eine verstärkte Freisetzung von MMP-9 und eine höhere elastolytische Aktivität des Enzyms [272]. Des Weiteren konnten Hautamaki et al. in einer *in vivo* Studie beobachten, dass MMP-12-defiziente Mäuse durch eine Zigarettenrauchexposition keinen emphysemartigen Lungenschaden entwickelten [130]. In Bezug auf die obstruktiven Veränderungen in den kleinen Atemwegen ist bekannt, dass Makrophagen durch die Freisetzung von TGF- β und dem Bindegewebewachstumsfaktor CTGF (connective tissue growth factor) die Fibroblastenproliferation stimulieren können, wodurch fibrotische Veränderungen in den kleinen

Atemwegen gefördert werden [240]. Zudem werden die Makrophagen durch die Sezernierung von Chemokinen wie IP-10, I-TAC und MIG für die Rekrutierung von T-Lymphozyten und insbesondere von CD8⁺ Zellen verantwortlich gemacht [16].

T-Lymphozyten stellen die dritte Zellpopulation dar, die in erhöhten Konzentrationen im pulmonalen Gewebe von COPD-Patienten zu finden sind. Dabei kann die Zunahme hauptsächlich auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zurückgeführt werden, wobei die Prädominanz bei den CD8⁺ Zellen liegt [18, 62, 231]. CD8⁺ T-Lymphozyten sind bevorzugt in den kleinen und großen Atemwegen, der glatten Muskelschicht der Atemwege und in den Alveolenwänden lokalisiert und werden dort mit dem Auftreten von pathologischen Veränderungen in Verbindung gebracht. Die Schwere der Atemwegsobstruktion sowie das Ausmaß der emphysematösen Zerstörung im Alveolarraum korreliert sehr stark mit der Anzahl der CD8⁺ T-Lymphozyten [206, 233, 276]. Die Beteiligung des Zelltyps an der Entstehung eines Emphysems wird auf seine Fähigkeit lytische Substanzen wie Perforin, Granulysin sowie Granzym A und B freisetzen zu können, zurückgeführt [18, 62, 231]. CD8⁺ T-Lymphozyten, die aus Sputumproben von COPD-Patienten gewonnen wurden, zeigten eine deutlich ausgeprägtere Perforinexpression und eine höhere zytotoxische Aktivität als die Kontrollen [51]. Es wird vermutet, dass es durch die sezernierten proteolytischen Enzyme zu einer Schädigung der alveolaren Epithelzellen kommt und diese durch die Induktion von apoptotischen oder nekrotischen Prozessen absterben [18, 62, 231]. Maeno et al. konnten zudem in einer *in vivo* Studie zeigen, dass CD8⁺ T-Lymphozyten auch über einen indirekten Weg an der Emphysemenstehung beteiligt sind. CD8⁺ T-Lymphozyten fördern durch ihre Freisetzung von IP-10 die Akkumulation und Aktivierung von Makrophagen in den Alveolen. Des Weiteren wird durch den Einfluss von IP-10 die Produktion des Elastin degradierenden Enzyms MMP-12 induziert, was zu einer verstärkten parenchymalen Zerstörung führt [205]. Welche Funktion die CD8⁺ T-Lymphozyten in Hinblick auf die Abnormalitäten in den Atemwegen übernehmen, ist derzeit noch nicht geklärt. Vermutlich sind sie jedoch, genau wie die CD4⁺ T-Lymphozyten, an der Aufrechterhaltung der bronchialen Entzündungsreaktion beteiligt [18, 61, 231].

2.3.2. Die Pneumonie als ein Beispiel einer bakteriell induzierten entzündlichen Erkrankung der Lunge

Akute Infektionen der Lunge gehören weltweit zu den am häufigsten auftretenden Erkrankungen und verursachen jedes Jahr mehr als vier Millionen Todesfälle [216]. Neben der akuten Bronchitis und der Influenza gilt vor allem die Pneumonie als die am weitesten verbreitete infektiöse Erkrankung der Lunge [218]. Bei einer Pneumonie handelt es sich um eine Entzündung des Lungengewebes, die häufig durch Bakterien hervorgerufen wird [159, 169, 224, 252]. Je nachdem wo die Ansteckung mit den bakteriellen Pathogenen erfolgte, unterscheidet man die ambulant erworbene Pneumonie und die nosokomial erworbene Pneumonie. Während die ambulante Variante unabhängig von Besuchen in medizinischen Einrichtungen auftritt, ist die nosokomial erworbene Pneumonie dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Infektionsanzeichen mindestens zwei Tage nach einem Aufenthalt in einer medizinischen Einrichtung auftreten [344]. Da der Fokus dieser Arbeit auf der nosokomialen Pneumonie liegt, wird im Folgenden nicht näher auf die ambulant erworbenen Pneumonien eingegangen.

Bei den nosokomialen Pneumonien unterscheidet man Untergruppen wie die HAP (hospital acquired pneumonia), die während oder nach einem Krankenhausaufenthalt auftritt und die VAP (ventilated acquired pneumonia), die sich 48 - 72 Stunden nach dem Beginn einer mechanischen Beatmung der Lunge darstellt [229]. Beiden Arten ist gemeinsam, dass sie hauptsächlich durch multiresistente Stämme von *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, etc. hervorgerufen werden [86, 108, 169]. Vor allem in Bezug auf die VAPs gilt *P. aeruginosa* als das Hauptbakterium, das für den Ausbruch der pulmonalen Infektion verantwortlich gemacht wird [161, 243, 274, 344]. Neben maschinell beatmeten Intensivpatienten besitzen jedoch auch andere Patientengruppen wie beispielsweise Organtransplantatempfänger oder Patienten, die mit HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) infiziert sind, ein erhöhtes Risiko eine *P. aeruginosa* induzierte Pneumonie zu erwerben [2, 274, 344]. Alle aufgeführten Patientengruppen besitzen ein geschwächtes Immunsystem, eine verminderte mukoziliare Klärung oder Epithelschäden, die beispielsweise durch die endotracheale Intubation entstehen, wodurch die Besiedelung mit dem opportunistischen Erreger *P. aeruginosa* erst ermöglicht wird [344].

P. aeruginosa ist ein gramnegatives Bakterium, das ubiquitär in der Umwelt vorhanden ist. Neben seinem natürlichen Vorkommen im Boden und im wässrigen Milieu kann das Bakterium aber auch in artifiziellen Umgebungen wie z.B. Krankenhäusern oder anderen medizinischen

Einrichtungen gefunden werden. Der Erfolg dieser weiten Verbreitung liegt in der hohen Anpassungsfähigkeit und intrinsischen Antibiotikaresistenz des Bakteriums. Beide Eigenschaften können auf die ausgeprägte genetische Flexibilität zurückgeführt werden, die durch das große Genom dieser Bakterienspezies gegeben ist [109, 187, 274, 344]. Wie bereits erwähnt, erfolgt eine pulmonale Infektion mit *P. aeruginosa* fast ausschließlich in Personen, die aufgrund einer Vorerkrankung oder Gewebeschädigung über ein geschwächtes Immunsystem verfügen [109, 344]. Eingedrungene Bakterien können daher nicht sofort bekämpft werden und können sich in der Lunge ansiedeln. Die Fortbewegung der *P. aeruginosa* erfolgt dabei hauptsächlich durch Flagellen, bei denen es sich um fadenförmige Proteinanhangsel handelt. Zusammen mit den Typ IV Pili fungieren sie auch als Adhäsine, die das Anheften der Bakterien an pulmonale Epithelzellen fördern [109, 187, 344]. Nach der epithelialen Adhäsion werden mittels des Typ III Sekretionssystems (T3SS) bakterielle Toxine über einen nadelartigen Fortsatz direkt in das Zytosol der Wirtszelle injiziert und verursachen ein Absterben der Zellen sowie eine Zerstörung der epithelialen Barriere [129, 344].

Die verschiedenen Virulenzfaktoren, die *P. aeruginosa* für die Schädigung der Wirtszellen produziert, fungieren jedoch auch als PAMPs und aktivieren das angeborene Immunsystem der Lunge. Über TLR2, TLR4 und TLR5 können Epithelzellen und residente Alveolarmakrophagen Bakterienkomponenten wie bakterielle Lipoproteine, LPS und Flagellin erkennen und daraufhin eine Abwehrreaktion auslösen [1, 256, 300, 363]. Zudem ist bekannt, dass Strukturmodule von *P. aeruginosa* auch durch zytosolische NLRs erkannt werden können. Neben dem NOD1 und NOD2 Rezeptor wird vor allem dem NLRC4-Rezeptor eine zentrale Rolle in der Immunantwort gegenüber *P. aeruginosa* zugeschrieben. In Makrophagen kommt es nach der intrazellulären Detektion von Flagellin und T3SS-Bestandteilen zu einer Aktivierung des NLRC4-Inflammasoms. Die daraus resultierende Freisetzung von IL-1 β fördert schließlich die Entzündungsreaktion [58, 214, 314].

Die inflammatorische Immunantwort bei einer akuten *P. aeruginosa* Pneumonie ist durch einen massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet [109, 187, 274, 344]. Neutrophile Granulozyten sind bei der Bekämpfung der pathogenen Mikroorganismen und somit für den Verlauf einer akuten *P. aeruginosa* Infektion von essentieller Bedeutung. Dies konnte bereits in verschiedenen Studien mit neutropenischen Mäusen gezeigt werden. C57BL/6N Mäuse, deren neutrophile Granulozyten durch eine Cyclophosphamid-Behandlung oder durch die Applikation eines spezifischen Ly6 (GR1)- Antikörpers inaktiviert wurden, starben früher und

bereits bei sieben Größenordnungen niedrigeren Infektionsdosen an den Folgen einer *P. aeruginosa* Infektion als nicht neutropenische Kontrolltiere [171]. Vergleichbare Beobachtungen konnten auch in einer murinen Infektionsstudie gemacht werden, in der die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch einen CXCR2-Neutralisationsantikörper blockiert wurde [323]. Neutrophile Granulozyten bekämpfen die eingewanderten Bakterien durch Phagozytose und intrazelluläre und extrazelluläre Freisetzung von ROS, α -Defensinen, Lysozym, Lactoferrin oder Proteasen [109, 344]. Obwohl die neutrophilen Granulozyten bei der Immunantwort von großer Bedeutung sind, können sie auch zu erheblichen Schäden im Lungengewebe führen. Freigesetzte Serinproteasen, MMPs und ROS zerstören EZM-Bestandteile und schädigen ansässige Epithelzellen, wodurch Immunrezeptoren zerstört und Abwehrmechanismen beeinträchtigt werden. Die Schädigung des Gewebes führt zudem zu einer positiven Feedbackschleife in der immer mehr Immunzellen rekrutiert und folglich auch immer mehr Gewebezerstörung stattfindet [179].

Pulmonale Epithelzellen gehören zu den Zelltypen, die für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mitverantwortlich sind und somit die Immunantwort in einer *P. aeruginosa* Infektion aktiv regulieren können. In einer Studie von Sadikot et al. wurde der NF κ B-Signalweg in pulmonalen Epithelzellen mittels adenoviralen Überexpressions- bzw. Blockadekonstrukten modelliert und die Auswirkungen auf die *P. aeruginosa* induzierte Entzündungsreaktion analysiert. War der NF κ B-Signalweg dauerhaft aktiv, konnte in den Mäusen eine erhöhte TNF α Freisetzung beobachtet werden, die mit einer verstärkten bakteriellen Klärung assoziiert war. In Mäusen, deren NF κ B-Signale blockiert waren, konnte hingegen eine reduzierte MIP-2 Sekretion, eine verringerte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und eine abgeschwächte Klärung der *P. aeruginosa* festgestellt werden [275]. Mäuse, bei denen das Adaptermolekül MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) nicht vorhanden ist und somit keine NF κ B-Signale vom TLR in den Zellkern weitergeleitet werden, zeigten ebenfalls einen abgeschwächten Einstrom von neutrophilen Granulozyten in Folge einer *P. aeruginosa* Infektion. Diese Beobachtung war mit einer verminderten Produktion an chemotaktischen Faktoren wie MIP-2 und TNF α assoziiert [251, 299]. Zusätzlich zur Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sind die pulmonalen Epithelzellen durch die Abgabe von verschiedenen antimikrobiellen Faktoren auch an der aktiven Bekämpfung von eingedrungenen Mikroorganismen beteiligt. Die kationischen Proteine Lysozym und Lactoferrin, die von Epithelzellen in den die Atemwege auskleidenden wässrigen Flüssigkeitsfilm abgegeben werden,

sind dafür bekannt *P. aeruginosa* schnell und effizient abtöten zu können [4, 59, 322]. Zudem konnten verschiedene Studien zeigen, dass die hBD Expression in pulmonalen Epithelzellen durch das Einwirken von mikrobiellen Stimuli und Zytokinen induziert wird. Über verschiedene TLRs wird so beispielsweise die Expression von hBD-2 in Epithelzellen vermittelt, wenn es zu einem Kontakt mit *P. aeruginosa* kommt [122, 204]. Aber auch durch den Einfluss von IL-1 β , TNF α oder IL-17A kann die hBD-2 Expression verstärkt werden [122, 163, 298].

Alveolarmakrophagen modulieren ebenfalls die lokale Entzündungsreaktion, indem sie eine Vielzahl an inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , IL-8, IL-6 und TNF α abgeben [187, 344]. Während einer Pneumonie induzieren die Alveolarmakrophagen vor allem die initiale Zytokinantwort. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass Alveolarmakrophagen, die aufgrund einer RelA Defizienz ihre NF κ B-Signalkaskade nicht aktivieren können, nach einer Stimulation mit *P. aeruginosa* oder *Streptococcus pneumoniae* nur geringe Mengen an Zytokinen abgeben konnten. Dies hatte zur Folge, dass Verzögerungen sowohl bei der Aktivierung von Epithelzellen als auch bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten auftraten, wodurch sich die Bakterien ungehindert im pulmonalen Gewebe ausbreiten konnten [133, 246]. Diese Beobachtungen gehen einher mit anderen Infektionsstudien in denen die Alveolarmakrophagen vollständig depletiert wurden oder ihre Funktionalität aufgrund einer Knochenmarkstransplantation eingeschränkt war [128, 175, 234].

2.4. RAGE und Entzündungsreaktionen

RAGE ist ein Zelloberflächenrezeptor, der zur Superfamilie der Immunglobulin-Moleküle gehört [226, 285]. Der Rezeptor setzt sich aus einer hydrophoben Transmembrandomäne, einer N-terminalen extrazellulären Region und einem C-terminalen zytosolischen Anteil zusammen, wobei letzterer für die intrazelluläre Signaltransduktion von essentieller Bedeutung ist [312]. Fehlt die Transmembran- und intrazelluläre Domäne aufgrund von alternativem Splicing der mRNA (esRAGE; endogen sezerniertes RAGE) oder durch proteolytische Spaltung des membranständigen Rezeptors (sRAGE, soluble RAGE), so können zwar Liganden an der extrazellulären Domäne gebunden werden, eine intrazelluläre Signalweiterleitung kann allerdings nicht stattfinden [52, 239, 257, 361]. Die beiden löslichen RAGE Varianten werden daher auch als kompetitive Inhibitoren bezeichnet, die durch Abfangen der Liganden die Aktivität des funktionellen membranständigen Rezeptors hemmen [29, 52, 167].

RAGE ist ein Rezeptor, der mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Liganden interagieren kann. Die Ligandenbindung erfolgt dabei in nahezu allen Fällen durch die extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche V-Domäne und C1-Domäne, die gemeinsam eine strukturelle und funktionelle Einheit ausbilden [70, 101, 167]. Da diese Einheit verschiedene dreidimensionale Strukturen und nicht nur einzelne spezifische Aminosäuresequenzen erkennen kann, wird der Rezeptor auch zu den PRRs gezählt [29, 32, 167]. Zu den RAGE Liganden gehören AGEs (advanced glycation endproducts) [116, 285], amyloide β -Peptide [72, 82] sowie DAMPs wie HMGB1 [141, 172] oder S100 Proteine [27, 137]. Des Weiteren zeigen Studien, dass RAGE auch an der Erkennung von LPS [354] beteiligt ist und mit dem Leukozyten β 2-Integrin Mac-1 interagieren kann [48, 103, 360].

Durch die Interaktion zwischen RAGE und einem Liganden werden in Abhängigkeit des vorliegenden Zelltyps und der Art des gebundenen Liganden unterschiedliche Signalwege aktiviert [167, 312]. Dazu werden verschiedene Adaptermoleküle wie Diaphanous-1 (Dia-1) [146], die extrazellulären Signal-regulierenden Kinasen (ERK) 1 und 2 [150] sowie die beiden von TLRs verwendeten Adaptermoleküle TIRAP (toll-interleukin 1 receptor domain containing adapter protein) und MyD88 [277] an die zytosolische RAGE Domäne rekrutiert. Daraufhin können viele verschiedene Moleküle und Signalwege wie NADPH-Oxidase, die Rho-GTPasen Rac-1 und Cdc42, Stress-aktivierte Phosphokinasen (SAPK), p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), etc. aktiviert werden, was zu einer Translokation der Transkriptionsfaktoren NF κ B, Aktivatorprotein 1 (AP-1), cAMP response element binding protein (CREB) und signal transducers and activators of transcription 3 (STAT-3) in den Zellkern führt [167, 188, 239, 297, 305, 312]. Durch die Aktivierung von RAGE werden bevorzugt Gene transkribiert, die an inflammatorischen Prozessen sowie an zellulärer Migration und Proliferation beteiligt sind. Zudem wird auch der Rezeptor selbst durch die Liganden-RAGE-Interaktionen vermehrt induziert [29, 188, 287] (Abbildung 1).

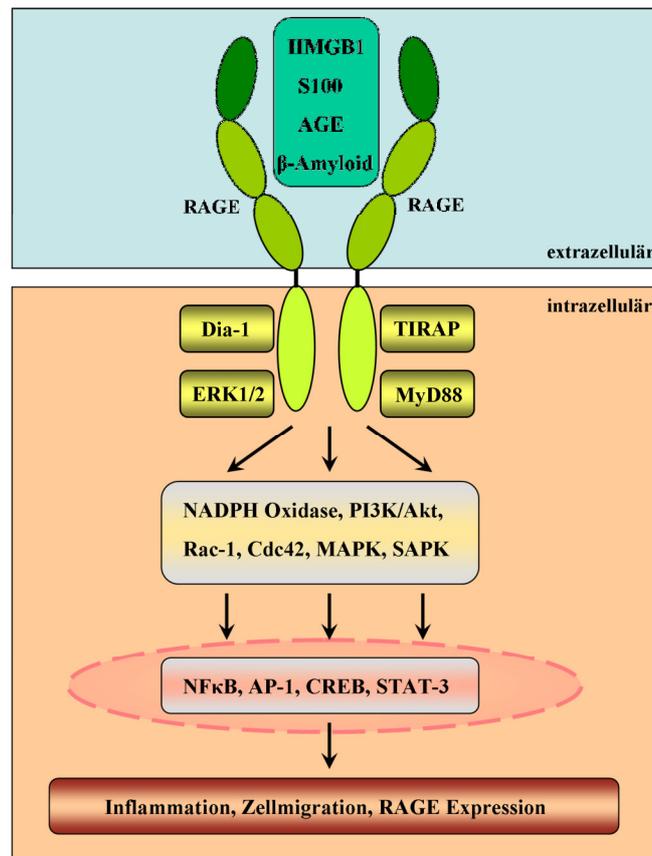


Abbildung 1: Durch RAGE induzierte Signalwege (nach [188]). Als Multiligandenrezeptor kann RAGE mit vielen verschiedenen Liganden wie HMGB1, S100 Proteine, AGEs oder amyloide β -Peptide in Interaktion treten. Durch die Rekrutierung der Adaptermoleküle Dia-1, ERK1/2, TIRAP oder MyD88 können eine Vielzahl von Signalwegen (MAPK, PI3K/Akt, SAPK) oder Molekülen (NADPH Oxidase, Rac-1, Cdc43) aktiviert werden. In Abhängigkeit der vorliegenden Stimulation wandern die Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1, CREB oder STAT-3 in den Zellkern und fördern die Transkription von Genen, die für inflammatorische Prozesse, Zellmigration und Proliferation sowie für die Expression von RAGE benötigt werden.

RAGE kann von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert werden. Die Expression ist jedoch abhängig vom Zelltyp und vom Entwicklungsstadium des Organismus und kann entweder konstitutiv oder nach Induktion erfolgen [52]. Bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung können in der Blastozyste sehr hohe RAGE Konzentrationen detektiert werden [239]. Welche genaue Funktion der Rezeptor in den embryonalen Zellen übernimmt, ist allerdings nicht genau bekannt. Nur wenige Studien haben bisher die Beteiligung von RAGE an der Embryonalentwicklung untersucht. Hori et al. und Huttunen et al. konnten jedoch zeigen, dass RAGE gemeinsam mit HMGB1 für das Auswachsen von Neuriten in embryonalen Nervenzellen verantwortlich ist [141, 149]. Des Weiteren konnte eine Beteiligung von RAGE an der Organogenese der Lunge beobachtet werden [201, 264]. Im adulten Organismus weisen die

meisten Organe und Gewebe lediglich eine geringe RAGE Expression auf [52, 76, 167]. Eine Ausnahme bildet jedoch die Lunge, in der konstitutiv hohe Basallevel an RAGE exprimiert werden [76]. Durch eine Akkumulation von Liganden oder inflammatorischen Mediatoren kann die RAGE Expression allerdings auch in anderen Organen und Geweben induziert werden [52, 167, 287]. Ein vermehrtes Vorkommen von RAGE Liganden liegt beispielsweise im Krankheitsbild des Diabetes mellitus vor. Die Konzentrationen an AGEs nehmen durch die hohen krankheitsbedingten Glukoselevel im Blut von Diabetespatienten immer weiter zu und verursachen einen Anstieg der RAGE Expression in Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen [39, 167, 287]. In anderen chronischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [82, 215], Arthritis [80, 313] oder Atherosklerose [123, 200] können ebenfalls erhöhte Ligandenkonzentrationen und eine abnormal gesteigerte Expression von RAGE festgestellt werden. Es wird vermutet, dass RAGE an der Pathogenese dieser Krankheiten beteiligt ist, indem der Rezeptor die inflammatorischen Prozesse und Immunreaktionen über die Aktivierung von verschiedenen Signalwegen aufrechterhält und verstärkt [52]. Durch Bindung von AGEs, HMGB1 oder S100 Proteine können RAGE induzierte Signalwege beispielsweise eine erhöhte Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen wie TNF α , IL-1 β oder MCP-1 aus Monozyten, Makrophagen oder Endothelzellen vermitteln [167, 172]. Zudem kann in Folge der RAGE Aktivierung in Endothelzellen eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) beobachtet werden, wodurch die transendotheliale Migration von Entzündungszellen erleichtert wird [21, 286]. Die Verstärkung der inflammatorischen Signale erfolgt außerdem durch eine erhöhte RAGE Expression. In der RAGE Promotorsequenz befindet sich eine funktionelle NF κ B-Bindestelle, wodurch der Rezeptor selbst durch eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs induziert wird [195, 318]. Zudem zeigte eine Studie von Bierhaus et al., dass AGEs, S100 Proteine oder amyloide β Peptide durch ihre Bindung an RAGE die Proteinsynthese der NF κ B-Untereinheit p65 fördern, was zu einer Verstärkung der proinflammatorischen Signale führt [28].

Wie bereits erwähnt, wird RAGE im pulmonalen Gewebe des adulten Organismus konstitutiv exprimiert [76]. Der Rezeptor ist dabei hauptsächlich auf den Alveolar Typ I Epithelzellen zu finden [69, 76, 295], während in anderen Zelltypen wie bronchiale Epithelzellen, Alveolar Typ II Zellen, Makrophagen und Endothelzellen nur eine geringe Immunoaktivität gegenüber polyklonalen RAGE Antikörpern festgestellt werden kann [219]. Verschiedene Studien zeigen,

dass RAGE eine wichtige Funktion als Adhäsionsmolekül übernimmt und eine Verbindung zwischen Zellen und der EZM herstellt [20, 76, 253]. Demling et al. konnten beispielsweise in verschiedenen *in vitro* Experimenten beobachten, dass RAGE überexprimierende Zellen deutlich schneller und mit einer höheren Effektivität an Kollagen IV adhären können als Kontrollzellen [76]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Rezeptorblockade durch anti-RAGE Antikörper die zelluläre Adhäsion an EZM-Bestandteile inhibiert [253]. Durch die Interaktionen zwischen RAGE und den Proteinen der EZM wird das Abflachen und Ausbreiten der Alveolar Typ I Zellen gefördert, wodurch diese ihre charakteristische dünne und flache Morphologie ausbilden, die für einen effektiven Gasaustausch benötigt wird [76].

Veränderungen in Hinblick auf die pulmonale Expression von RAGE und seinen Liganden lassen zudem vermuten, dass RAGE auch an der Pathogenese von pulmonalen Erkrankungen beteiligt ist [52]. Klinische Studien zeigen beispielsweise, dass in COPD-Patienten eine erhöhte Expression von RAGE und seinen Liganden HMGB1 und AGE vorliegt [49, 94, 162, 219, 350] und dass ein gesteigertes Vorhandensein des Rezeptors mit einer Abnahme der Lungenfunktion korreliert [350]. In einem Elastase-induzierten Emphysemmodell konnte zudem beobachtet werden, dass RAGE-defiziente Mäuse verminderte Gewebeschäden aufwiesen, was hauptsächlich auf die RAGE Defizienz in pulmonalen Strukturzellen zurückgeführt werden konnte [339]. Des Weiteren zeigten verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien einen Einfluss von Zigarettenrauch auf die Expressionsrate und Aktivität des Rezeptors [49, 264, 268, 348, 362]. Welche genaue Funktion RAGE in der Pathophysiologie eines rauchinduzierten Lungenschadens übernimmt, ist momentan jedoch nicht bekannt.

2.5. IL-17C und Entzündungsreaktionen

IL-17C ist ein Mitglied der IL-17 Zytokinfamilie, die sich aus den Mitgliedern IL-17A bis F zusammensetzt [151, 221]. Ihre biologische Funktion vermitteln die IL-17 Zytokine über die spezifischen Rezeptoren IL-17RA bis IL-17RE [106]. Zur Signalweiterleitung bilden die Rezeptoren Heterodimere aus, wobei IL-17RA die am häufigsten vorkommende Untereinheit darstellt. So ist beispielsweise der aus IL-17RA und IL-17RC bestehende Rezeptorkomplex für die Erkennung von IL-17A und IL-17F zuständig, während ein Heterodimer aus IL-17RA und IL-17RB als Rezeptor für IL-17E fungiert [106, 151, 154]. Bei dem Zytokin IL-17C wird ebenfalls ein heterogener Rezeptorkomplex für die Signalweiterleitung benötigt. Dieser besteht

aus den beiden IL-17 Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE [46, 255, 303]. Wie genau die intrazelluläre IL-17C-Signaltransduktion abläuft, ist momentan noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass der heterogene IL-17RA-IL-17RE Rezeptorkomplex über die intrazellulären SEFIR (similiar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R) Domänen das Adaptermolekül Act1 (NFκB activator 1) binden können. Durch die Interaktion mit Act1 kommt es zur Aktivierung von NFκB und MAPK Signalwegen, was schließlich zur Translokation der beiden Transkriptionsfaktoren NFκB und AP1 in den Zellkern führt. IL-17C induziert dadurch die Expression von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden und kann zudem die Freisetzung von Botenstoffen aus T-Helfer 17 (Th17) Zellen beeinflussen [46, 304] (Abbildung 2).

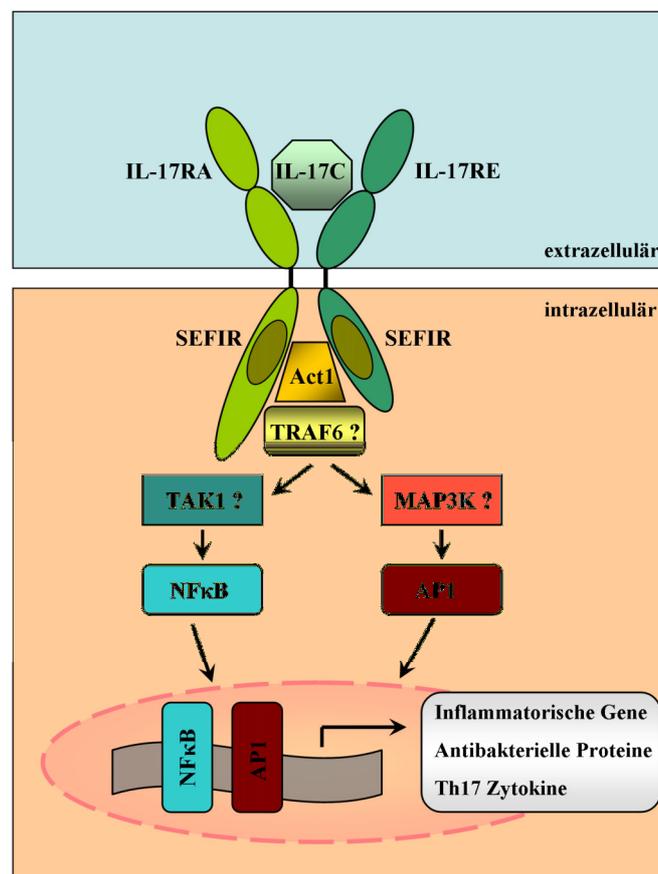


Abbildung 2: Durch IL-17C induzierte Signalwege (nach [304]). IL-17C bindet an einen heterogenen IL-17-Rezeptorkomplex, der sich aus den beiden Untereinheiten IL-17RA und IL-17RE zusammensetzt. Durch die intrazelluläre SEFIR-Domäne, die in beiden Rezeptoruntereinheiten vorhanden ist, kann das Adaptermolekül Act1 gebunden werden und eine Aktivierung von NFκB und MAPK Signalwegen erfolgen. Ob in die Signaltransduktion auch Moleküle wie TRAF6 (TNFR-associated factor 6), TAK1 (TGFβ-activated kinase 1) und MAP3K (mitogen activated protein kinase kinase kinase) involviert sind, ist momentan noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass durch IL-17C die beiden Transkriptionsfaktoren NFκB und AP1 aktiviert werden, welche die Transkription von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden induzieren.

Alle Mitglieder der IL-17 Zytokinfamilie übernehmen eine wichtige Funktion in inflammatorischen Abwehrmechanismen, die durch den Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen ausgelöst werden [105, 151, 221]. Der bekannteste Vertreter der Zytokinfamilie ist das IL-17A, das beispielsweise an der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen beteiligt ist [317]. Dabei induziert IL-17A in seinen Zielzellen die Bildung und Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden [105, 317]. IL-17A wird vor allem von Leukozyten wie CD4⁺ Th17 Zellen, $\gamma\delta$ T Zellen, natürlichen Killerzellen, „innate lymphoid cells“ und neutrophilen Granulozyten freigesetzt [67, 151, 154] und übt auf verschiedene Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Adipozyten einen stimulierenden Effekt aus [99, 120, 151, 163, 194, 353, 356]. Im Gegensatz dazu kann die IL-17C Expression fast ausschließlich auf Epithelzellen zurückgeführt werden. Durch eine Infektion mit *Escherichia coli* oder *Citrobacter rodentium* kommt es in humanen Kolonepithelzellen zu einer Induktion der IL-17C Expression [255, 303]. In epidermalen Keratinozyten [241, 255] und in den Epithelzellen der Niere [144] konnte ebenfalls eine verstärkte IL-17C Produktion nach bakterieller oder fungaler Stimulation beobachtet werden. Des Weiteren zeigten verschiedene Studien, dass unter inflammatorischen Bedingungen auch bronchiale Epithelzellen IL-17C exprimieren können [181, 245]. Die Aktivierung der IL-17C Expression kann dabei entweder durch TLR2, TLR3 oder TLR5 Liganden [181, 245, 255, 303] oder durch den Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF α oder IL-1 β erfolgen [241, 255, 303].

In Hinblick auf die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-17C konnte auf zellulärer Ebene gezeigt werden, dass IL-17C in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 die Freisetzung von TNF α und IL-1 β induzieren kann [194]. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in einem Mausmodell der Kollagen induzierten rheumatoiden Arthritis beobachtet werden. Die vermehrte IL-17C Expression, welche in Folge der Arthritisinduktion auftrat, förderte die Abgabe von TNF α und IL-6 aus Makrophagen und führte zu einer Exazerbation der inflammatorischen Vorgänge [353]. In den Hautläsionen von Psoriasispatienten können ebenfalls erhöhte Konzentrationen an IL-17C detektiert werden [155, 157]. Murine Modelle dieser Erkrankung lassen vermuten, dass IL-17C sowohl für die vermehrte Keratinozytenproliferation als auch für die verstärkte Einwanderung von Leukozyten verantwortlich ist [157, 255]. So waren beispielsweise IL-17C-defiziente Mäuse vor dem schädlichen Einfluss von Imiquimod (experimentelle Induktion der Psoriasis) geschützt und zeigten weder eine epidermale

Hyperplasie noch eine vermehrte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [255]. Im Gegensatz zu den pathologischen Eigenschaften von IL-17C bei der Psoriasis übernimmt das Zytokin in murinen Kolitis-Modellen eher eine schützende Funktion. Sowohl in IL-17C-defizienten als auch in IL-17RE-defizienten Mäusen konnte im Vergleich zu WT Mäusen eine vermehrte Leukozyteninfiltration, ein Verlust der intestinalen Krypten und Becherzellen sowie eine Verdickung der Kolonwände festgestellt werden [255, 263, 303]. In einer Arbeit mit humanen Proben konnten die Beobachtungen aus den murinen *in vivo* Studien allerdings nicht bestätigt werden. Friedrich et al. konnten feststellen, dass in Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung IL-17C in erhöhten Konzentrationen von enteroendokrinen Zellen und Becherzellen produziert wird und dass IL-17C zusammen mit Th17 Zellen die inflammatorischen Prozesse im Kolon moduliert [100]. In einem Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, das für die Erforschung der Multiplen Sklerose Erkrankung verwendet wird, konnte die Beteiligung von IL-17C an der durch Th17 Zellen vermittelte Entzündung ebenfalls beobachtet werden. IL-17C förderte die inflammatorischen Vorgänge, indem es über den IL-17RE die Produktion von IL-17A und IL-17F aus Th17 Zellen induzierte [46]. Zudem zeigt eine neuere Studie, dass IL-17C auch an der Lebererkrankung Autoimmunhepatitis beteiligt ist. Von Hepatozyten freigesetztes IL-17C verstärkte die Expression von IL-2 in residenten CD4+ T-Zellen, was die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und die damit verbundene Schädigung der Leber unterstützte [145]. In Bezug auf akute und chronische Infektionen des respiratorischen Systems ist lediglich bekannt, dass IL-17C im Bronchialepithel von Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen wie COPD, Zystischer Fibrose oder Aspergillose exprimiert wird [245]. Zudem zeigen einige Studien, dass es durch den Einfluss von *Mycoplasma pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *Haemophilus influenzae* zu einer Induktion der IL-17C mRNA Expression in bronchialen Epithelzellen kommt [245, 351]. Welche Funktion IL-17C bei dem durch pathogene Mikroorganismen hervorgerufenen Entzündungsgeschehen in der Lunge übernimmt, ist nicht bekannt.

2.6. Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die Entstehung und den Verlauf von bakteriell- und zigarettenrauchinduzierten Entzündungsreaktionen zu erhalten. Dazu sollten die von alveolaren Epithelzellen exprimierten Faktoren RAGE und IL-17C in murinen

Zigarettenrauchexpositionsmo­dellen untersucht werden. Hierfür sollte ihre Funktion in einer akuten rauchinduzierten Entzündung und bei der Entstehung eines rauchinduzierten Lungenschadens analysiert werden. Des Weiteren sollten neue Erkenntnisse über den Verlauf einer *P. aeruginosa* induzierten Pneumonie gewonnen werden. Dazu sollte die Funktion des Zytokins IL-17C in einem durch Bakterien hervorgerufenen Entzündungsgeschehen mit Hilfe eines akuten murinen Pneumoniemo­dells und mittels *in vitro* ausdifferenzierten Pneumozyten analysiert werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM/F-12	life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd, 37%	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O; RNase-frei	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES; 1M-Lösung	life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Insulin-Transferrin-Sodium- Selenite	Roche, Basel, Schweiz
KCl	Grüssling GmbH, Filsum, Deutschland
Ketamin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NEAA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Primocin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Bayer, Leverkusen, Deutschland

3.1.2. Puffer, Lösungen und Kulturmedien

10 x PBS:

- 800,6 g NaCl
- 20,1 g KCl
- 115,6 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O
- 20,4 g KH₂PO₄
- in 10 L Aqua dest. lösen und den pH-Wert auf 7,2 - 7,4 einstellen

BSSB-Puffer [71]:

- 8,00 g NaCl
- 0,40 g KCl
- 0,14 g Na₂HPO₄ * 7 H₂O
- 2,38 g HEPES
- 1,00 g Glucose
- 0,29 g MgSO₄ *7 H₂O
- 0,27 g CaCl₂ * 2 H₂O
- in 1000 mL Aqua dest. lösen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen
- 10 mL Penicillin-Streptomycin zugeben

Complete Mouse Medium (CMM) [73]:

- 500 mL DMEM/F12
- 2,5 mL L-Glutamin
- 1,25 g BSA
- 5 mL HEPES
- 5 mL NEAA
- 5 mg Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite
- 1 mL Primocin

3.1.3. Weitere Materialien

Alle weiteren Materialien wie Chemikalien, Kits, Antikörper und Geräte sind dem Methodenteil zu entnehmen.

3.1.4. Mäuse

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse des C57BL/6 Stammes verwendet. RAGE-defiziente C57BL/6N Mäuse ($RAGE^{-/-}$) wurden von Liliensiek et al. durch eine Deletion der extrazellulären Domäne generiert (Knockout der Exons 2 bis 7), wodurch kein funktionelles Protein mehr hergestellt werden kann [197]. IL-17C-defiziente C57BL/6N Mäuse ($IL-17C^{-/-}$) (vollständiger Knockout) stammen aus dem Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC, USA). Die IL-17A-defizienten C57BL/6J Mäuse ($IL-17A^{-/-}$) kommen aus der Forschungsgruppe von Dr. Yoichiro Iwakura und weisen ebenfalls einen vollständigen Knockout auf [225]. Die Mäuse wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser.

3.2. Methoden

3.2.1. Zigarettenrauchexposition

3.2.1.1. Chronische Zigarettenexposition

Zur Untersuchung eines durch Zigarettenrauch hervorgerufenen Lungenschadens wurden acht Wochen alte WT und $RAGE^{-/-}$ Mäuse für sechs Monate Zigarettenrauch (3R4F, College of Agriculture, Reference Cigarette Program, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA) ausgesetzt. Dazu wurde eine TE-10 Rauchmaschine (Teague Enterprises, Woodland, Kalifornien, USA) verwendet, in der die Mäuse 261 Minuten/Tag, fünf Tage/Woche Zigarettenrauch exponiert wurden. Das tägliche Berauchungsprotokoll setzte sich aus drei Rauchphasen (jeweils 87 Minuten) zusammen, die durch 40 minütige Pausen unterbrochen wurden, in denen die Expositions-kammer mit Raumluft versetzt wurde [337]. Die Partikelkonzentration im

Zigarettenrauch lag bei 120 mg/m^3 . Als Kontrolltiere wurden gleichaltrige raumluftexponierte Mäuse verwendet.

3.2.1.2. Akute Zigarettenexposition

Für das akute Rauchmodell wurden acht Wochen alte WT und RAGE^{-/-} Mäuse in eine Plexiglasbox gesetzt, in die für 20 - 30 Minuten der Rauch von acht ungefilterten 3R4F-Zigaretten (College of Agriculture, Reference Cigarette Program, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA) eingeleitet wurde. Dazu wurden zwei Kolbenpumpen verwendet (7025 rodent ventilator, Ugo Basile, Biological Research Instruments, Comerio, Italien), die zum einen den Zigarettenrauch mit einem Fluss von 675 mL/min und zum anderen frische Raumluft (1800 mL/min) in das Innere der Plexiglasbox transportierten. Diese Zigarettenrauchexposition wurde fünf Mal pro Tag, an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Die einzelnen Rauchphasen wurden durch Pausen von mindestens einer Stunde unterbrochen, in denen die Tiere zurück in ihre Haltungskäfige gesetzt wurden. Die Partikelkonzentration im Zigarettenrauch lag bei 800 mg/m^3 . Als Kontrollen wurden gleichaltrige raumluftexponierte Mäuse verwendet [192].

3.2.2. Invasive Lungenfunktionsmessung

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des respiratorischen Systems wurde bei den Mäusen eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Hierzu wurde das FlexiVent-System der Firma Scireq Inc. (Montreal, Kanada) verwendet. Bei diesem System handelt es sich um ein computergestütztes Beatmungsgerät für Kleintiere mit dem es möglich ist, eine kontrollierte Ventilation der Tiere mit gleichzeitiger Analyse der Lungenmechanik durchzuführen. Zur Bestimmung der Lungenfunktionsparameter wird mittels einer Kolbenpumpe ein oszillierendes Signal in das respiratorische System appliziert. Über Veränderungen des Luftdruckes und des Luftflusses können im Anschluss Informationen über die mechanischen Eigenschaften des respiratorischen Systems gewonnen werden.

Für die Durchführung der Messung wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Applikation von Ketamin ($6\text{-}8 \text{ mg/kg}$) und Xylazin ($90\text{-}120 \text{ mg/kg}$) betäubt. In die Trachea der Tiere wurde anschließend eine Kanüle eingeführt, die an das FlexiVent-System angeschlossen wurde. Nach

dem Durchlaufen von verschiedenen Beatmungsmanövern (siehe Tabelle 1) wurde die Kanüle entfernt, die Tiere euthanasiert und Proben für weitere Analysen gewonnen.

BEATMUNGSMANÖVER	BERECHNUNGSMODELL	MESSPARAMETER
Single-Frequency FOT	Single Compartment Model	- Compliance - Elastance - Resistance des respiratorischen Systems
Multi-Frequency FOT	Constant Phase Model	- Tissue damping
Pressure-Volume-Loop (P-V-Loop)	P-V-Loop Salazar Knowles Gleichung	- Totale Lungenkapazität - Quasi-statische Compliance

Tabelle 1: Auflistung der Beatmungsmanöver und die dazu gehörigen Messparameter, die bei einer invasiven Lungenfunktionsmessung mit dem FlexiVent-System bestimmt wurden (FOT: forced oscillation technique).

Die verwendeten Beatmungsmanöver unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Berechnungsmodelle und liefern unterschiedliche Messparameter. Bei dem Single-Frequency FOT (forced oscillation technique) wird die Lunge als ein Kompartiment angesehen und nicht zwischen den Atemwegen und Lungengewebe unterschieden. Zur Bestimmung der Steifigkeit (Elastance), Dehnbarkeit (Compliance) und des Widerstandes (Resistance) des respiratorischen Systems wird eine spezifische Frequenz in die Lunge appliziert und die Veränderungen des Luftflusses und des Luftdruckes analysiert. Bei der Multi-Frequency FOT werden mehrere verschiedene Frequenzen eingesetzt, um den Widerstand des Gewebes (Tissue damping) zu bestimmen. Dieses Beatmungsmanöver basiert auf dem Constant Phase Model, das die Lunge in verschiedene Kompartimente (Atemwege und Lungengewebe) unterteilt. Bei dem P-V-Loop wird der Druck im Innern der Lunge schrittweise erhöht und die dadurch resultierenden Veränderungen der Totalen Lungenkapazität und der Dehnbarkeit (quasi-statische Compliance) detektiert. Zur Bestimmung der unterschiedlichen Messwerte wurden die jeweiligen Beatmungsmanöver dreimal durchgeführt und die Mittelwerte der Messungen gebildet.

3.2.3. Einbettung und stereologische Analyse der Lunge

3.2.3.1. Fixierung der Lunge, Paraffineinbettung und Hämalaun-Eosin-Färbung

Für die stereologische Analyse der Lungenstruktur wurde zunächst eine Instillationsfixierung des Gewebes durchgeführt. Hierzu wurde die Maus euthanasiert, eine Verweilkanüle in die freipräparierte Trachea eingeführt und mit einem Bindfaden fixiert. Die Lunge wurde zusammen mit der Kanüle aus dem Thorax entnommen und an eine Vorrichtung angeschlossen über die das Fixativ transtracheal verabreicht wurde. Als Fixierlösung wurde eine PBS gepufferte 4%ige Formaldehydlösung verwendet, die unter konstantem Druck von 30 cmH₂O über 15 Minuten in die Lunge gefüllt wurde. Im Anschluss wurde die Trachea mit einem weiteren Bindfaden abgebunden, die Kanüle entfernt und die Lunge für weitere 24 Stunden in 4%iger Formaldehydlösung fixiert [337].

Im nächsten Schritt wurde das Volumen der Lungen mit Hilfe der Flüssigkeitsverdrängungsmethode nach Scherle [282] bestimmt. Diese Bestimmung ist wichtig, da das Lungenvolumen als Referenzparameter für die spätere Auswertung benötigt wird.

Die Proben für die stereologische Analyse wurden nach dem Prinzip des „systematic uniformly random sampling“ (SURS) gewonnen [142]. Durch dieses Prinzip kann sichergestellt werden, dass die zu analysierenden Proben repräsentativ für die gesamte Lunge sind. Um die Randomisierung anzuwenden, wurden die Lungen zunächst in 1% Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet und die Lungenblöckchen mit einem Gewebeschnneider in 5 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Lunge wurde dabei von apikal nach kaudal zerteilt und die Position des ersten Schnittes wurde zufällig gewählt. Aus einer Lunge konnten so drei Scheiben gewonnen werden, die im Folgenden gemeinsam in einem Paraffinblock eingebettet wurden. Durch diese Vorgehensweise war es möglich drei Schnittebenen gleichzeitig zu analysieren. Zur Vorbereitung auf die Lichtmikroskopie wurden aus den Paraffinblöcken Schnitte mit 2 µm Dicke angefertigt, die mit Hämalaun (Dako, Jena, Deutschland) und Eosin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) angefärbt wurden.

3.2.3.2. Stereologische Auswertung

Zur stereologischen Untersuchung der histologischen Präparate wurde das Visiopharm Integrator System (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) und ein Olympus BX51 Lichtmikroskop (Olympus,

Hamburg, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe dieses Setups wurde jedes Präparat systematisch nach einem vorgegebenen Raster abgescannt und zufällig gewählte Bildausschnitte als Testfelder bestimmt. Auf diesen Testfeldern wurden verschiedene stereologische Methoden (Endpunkt- und Schnittpunktzählung) angewendet, wodurch eine Aussage über den MCL (mittlere freie Weglänge zwischen den Alveolarsepten), die Dicke und das Volumen der Alveolarsepten sowie die Oberfläche der Alveolen möglich waren [93].

3.2.4. Kultivierung der *P. aeruginosa* und Durchführung der intranasalen Infektion

P. aeruginosa des Stammes PAO1 wurden zunächst über Nacht bei 37°C auf einer LB Agarplatte (Roth, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden von der Platte entnommen, in LB Medium (Roth, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert und für weitere zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einem 10 minütigen Zentrifugationschritt bei 2000 g wurde das Pellet mit PBS gewaschen, die Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen und die optische Dichte auf 1 ($OD_{600nm} = 1$) eingestellt. Für Infektionsversuche wurden die Bakterien mit PBS verdünnt und direkt verwendet. Zur Inaktivierung der Bakterien wurden die Zellen für 5 Minuten auf 95°C erhitzt [230].

Für die Durchführung der intranasalen Infektion wurden WT, IL-17C^{-/-} und IL-17A^{-/-} Mäuse mittels einer intraperitonealen Injektion von Ketamin und Xylazin betäubt und intranasal mit lebenden oder hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* infiziert. Dabei wurden pro Maus $4 \cdot 10^6$ bis $6 \cdot 10^6$ colony forming units (CFU) in 40 µL PBS oder 40 µL PBS als Kontrolle in die Nase appliziert. 24 Stunden nach der bakteriellen Infektion fand die Analyse der Tiere statt.

3.2.5. Herstellung und Vernebelung von nontypeable *Haemophilus influenzae* Lysat

Zur Kultivierung des Bakterienstammes nontypeable *H. influenzae* (NTHi) wurden zunächst Bakterien aus einem NTHi-Glycerolstock auf einer Kochblutagarplatte mit IsoVitale X (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Die Bakterien wurden im nächsten Schritt in 500 mL Brain Heart Infusion Broth, welche mit 3,5 µg/mL NAD und 2% Difco Supplement B (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) versetzt war, für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 2500 g zentrifugiert, gewaschen und in 20 mL PBS resuspendiert. Nach einer 45 minütigen

Hitzeinaktivierung der Bakterien bei 70°C wurden die Zellen durch eine dreimalige Applikation von Ultraschall für jeweils 30 Sekunden lysiert. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines Pierce BCA Proteinassays (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) auf 2,5 mg/mL eingestellt. Die Lysate wurden in 7 mL Aliquots bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Die Vernebelung des NTHi Lysates erfolgte mit der Hilfe eines Pari Master® Verneblers (Pari, Starnberg, Deutschland), der an eine Plexiglasbox angeschlossen war. Die Mäuse wurden in diese Box überführt und für 40 Minuten dem vernebelten bakteriellen Lysat ausgesetzt [160].

3.2.6. Präparation der Mäuse und Probenaufarbeitung

3.2.6.1. Plasmagewinnung und Lavage der Lunge

Für die Präparation der Mäuse und die Probengewinnung wurden die Tiere mittels einer intraperitoneal verabreichten Überdosis an Ketamin und Xylazin betäubt, sodass kein Zwischenzehenreflex mehr vorhanden war. Der Brustkorb wurde eröffnet und die Tiere durch eine finale Herzpunktion getötet. Dabei wurde das Vollblut mittels einer Spritze entnommen, die als Antikoagulant 50 µL 0,6 M EDTA enthielt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 10.000 g konnte das EDTA-Plasma gewonnen werden.

Zur Durchführung einer bronchoalveolären Lavage wurde die Trachea der Mäuse zunächst freipräpariert und eine Verweilkanüle eingeführt. Über diese Kanüle konnte die Lunge anschließend mit 1 mL 1x PBS dreimal gespült werden [230].

3.2.6.2. Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Anfertigung von Cytospin-Präparaten zur Analyse des Differentialzellbildes

Die gewonnene bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurde bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um die Leukozyten von den flüssigen BALF Bestandteilen zu trennen. Der Überstand wurde sofort aliquotiert und für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Das Leukozytenpellet wurde in 1 mL 1x PBS resuspendiert und die Gesamtleukozytenzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Innovatis, Reutlingen, Deutschland) bestimmt [337].

Zur Anfertigung von Cytospin-Präparaten für die Differentialzellzählung wurde die Zellsuspension 1:4 mit 1x PBS verdünnt und unter Verwendung einer Cellspin Cyto-Zentrifuge (Tharmac, Waldsolms, Deutschland) bei 200 g für 5 Minuten auf Objektträger aufgebracht. Zur

Fixierung der Zellen wurden die Präparate für 7 Minuten in -20°C kaltes Methanol (Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes) überführt und anschließend getrocknet. Das Anfärben der Zellkerne und des Zytoplasmas erfolgte unter Zuhilfenahme des DiffQuick® Färbesets (Medion diagnostics, Gräfelfing, Deutschland). Zur Bestimmung der einzelnen Leukozytenuntergruppen wurden die Präparate lichtmikroskopisch betrachtet und jeweils mindestens 100 Zellen aus drei zufällig ausgewählten Bildausschnitten gezählt [160].

3.2.6.3. Herstellung von Lungenhomogenisat und Bestimmung der CFU

Die Lungen der Tiere wurden aus dem Thorax entnommen und die beiden Lungenhälften voneinander getrennt. Die linke Lungenhälfte wurde für die Herstellung von Lungenhomogenisat verwendet. Hierzu wurden das Gewebe in 1 mL 1x PBS gegeben und mit einem ULTRA-TURRAX® Dispergiergerät (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10.000 g und 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand für weitere Analysen aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die rechte Lungenhälfte wurde für die Gewinnung von RNA verwendet.

Nach Infektionsversuchen wurde das Lungenhomogenisat zusätzlich in Hinblick auf die CFUs analysiert. Dazu wurde das Lungenhomogenisat seriell mit PBS verdünnt, auf Agarplatten ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

3.2.7. Isolation und *ex vivo* Stimulation von murinen Alveolarmakrophagen

Zur Isolation von murinen Alveolarmakrophagen wurden zehn bis elf Wochen alte WT und RAGE^{-/-} Mäuse euthanasiert und ihre Lungen zehn Mal mit jeweils 1 mL PBS, der mit 0,5 mM EDTA versetzt war, gespült. Die gewonnenen Zellen wurden gruppenweise gepoolt und bei 130 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde danach in RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), welches mit 10% fötalem Kälberserum (FBS; Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 100 U/mL Penicillin und 100 U/mL Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetzt war, resuspendiert. Jeweils $1 \cdot 10^5$ Makrophagen wurden in eine Vertiefung einer 48 well-Platte ausgesät und für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um ein Absetzen der Makrophagen auf dem Plattenboden zu gewährleisten. Nach

Ablauf der zwei Stunden wurden die nicht adhärenen Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt.

Um zu untersuchen, wie die Alveolarmakrophagen auf eine proinflammatorische Stimulation reagieren, wurden die isolierten Zellen *ex vivo* mit verschiedenen Zytokinen und TLR Liganden stimuliert. Zunächst wurden die Zellen mit 40 ng/mL IFN γ (biolegend, Fell, Deutschland) bzw. mit Medium als Kontrolllösung für 16 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Medium gewechselt und die Zellen entweder mit 10 ng/mL LPS oder Pam2CSK4 (invivogen, Toulouse, Frankreich) für weitere 24 Stunden inkubiert. Diese Stimulation sollte zu einer klassischen Aktivierung der Makrophagen führen [222].

3.2.8. Isolation und Kultivierung von murinen alveolaren Epithelzellen

Zur Isolation von murinen alveolaren Epithelzellen wurde ein an die Isolationsprozedur von humanen alveolaren Epithelzellen adaptiertes Protokoll verwendet [71]. Für die Gewinnung der primären Zellen wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse in einem Alter von zehn Wochen genutzt. Die Tiere wurden zunächst euthanasiert, der Thorax eröffnet und die Lungen blutfrei gespült. Dazu wurde eine Kanüle in die rechte Herzspitze eingeführt und die Lunge mittels 10-15 mL 1x PBS perfundiert. Anschließend wurden die Knorpelringe der Trachea freigelegt, indem die Haut, Muskeln und Speicheldrüsen am Hals des Tieres entfernt wurden. Über eine Verweilkanüle konnte nun 2 mL Dispase (Corning, New York, USA) transtracheal in die Lunge appliziert werden. Nachdem sich die Lunge mit der Dispase gefüllt hatte, wurde die Verweilkanüle entfernt und die Trachea mit einem Bindfaden abgebunden. Die Lunge wurde anschließend aus der Maus entnommen und in weiteren 2 mL Dispase für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Das angedaute Gewebe wurde in ein Gemisch aus 20 mL CMM-Medium [73] und 1 mL DNase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) überführt, mit einer Schere zerkleinert und für weitere 45 Minuten bei 37°C inkubiert, um ein Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeverband zu gewährleisten. Die dabei entstandene Zellsuspension wurde im Folgenden resuspendiert und unlösliche Zellklumpen und Gewebereste sequentiell über eine Filtrierung durch 100 μ m und 40 μ m Nylongewebe entfernt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert und das Zellpellet in 20 mL frischem CMM Medium und 1 mL DNase resuspendiert. Um eine negative Selektion für Makrophagen durchzuführen, wurden die Zellen für 90 Minuten in Petrischalen inkubiert. Die Makrophagen besitzen, im Gegensatz zu den

Epithelzellen eine höhere Affinität zur Adhäsion. Daraus resultiert, dass sich die Makrophagen innerhalb der angegebenen Inkubationszeit auf dem Schalenboden absetzen, während die Epithelzellen weiterhin in Suspension verbleiben. Nach Ablauf der 90 Minuten wurde folglich nur der Überstand aus den Petrischalen entnommen, zentrifugiert und das Zellpellet in BSSB-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden im nächsten Schritt mit einem Phycoerythrin (PE) gekoppelten CD326-Antikörper (ebioscience, Frankfurt am Main, Deutschland) für 30 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt und einer Resuspension in BSSB-Puffer wurden PE-Microbeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach) zu den Zellen gegeben und für weitere 30 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Mittels den Microbeads, die an den CD326-Antikörper binden, konnten im Folgenden die CD326 positiven Zellen von den restlichen Zellen mittels einer MACS Säule (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) getrennt und gewonnen werden.

Die Vitalität der alveolaren Epithelzellen wurde mittels einer Trypanblau-Färbung (life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) überprüft und lag in allen Fällen bei > 85%. In einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden die Epithelzellen auf eine Polyester membran eines $0,33 \text{ cm}^2$ Transwell-Einsatzes (Corning, New York, USA) ausgesät. Die Membran wurde zuvor mit Laminin (Sigma-Aldrich, Steinbach, Deutschland) und Fibronectin (Corning, New York, USA) für 24 Stunden gecoatet. Als Wachstumsmedium wurde CMM Medium, das mit 10% FBS versetzt wurde, verwendet. Nachdem die Zellen zwei Tage in Kultur waren und eine 100% Konfluenz erreicht hatten, wurde ein Airlift durchgeführt, um die Polarisation der Zellen zu induzieren. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde täglich mittels einem EVOM Voltmeter (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gemessen, um die Barrierefunktion der Zellen zu überprüfen.

3.2.8.1. Zigarettenrauchexposition der murinen alveolaren Epithelzellen

48 Stunden nach dem Airlift wurden die alveolaren Epithelzellen für Zigarettenrauchexpositionsexperimente verwendet, die gemäß einem Berauchungsprotokoll für *in vitro* Versuche durchgeführt wurden [24]. Für die Zigarettenrauchexposition wurde ein separater Zellinkubator mit einer luftdicht abgeschlossenen Rauchexpositions-kammer (Billups Rothenberg, Kalifornien, USA) genutzt, welche über ein Schlauchsystem mit einer Rauchverbrennungskammer und einer Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)

verbunden war. Durch die Pumpe, die sich am einen Ende des Schlauchsystems befand, wurde ein Unterdruck erzeugt, wodurch der Zigarettenrauch in das Innere der Expositions-kammer transportiert wurde. Die Flussgeschwindigkeit wurde so eingestellt, dass eine Zigarette innerhalb von 5 Minuten vollständig abbrannte. Insgesamt wurden die Zellen dem Rauch von drei filterlosen 3R4F-Zigaretten (3R4F, College of Agriculture, Reference Cigarette Program, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA) ausgesetzt. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die nur in Kontakt mit normaler Inkubatorluft (37°C, 5% CO₂-Atmosphäre) gekommen waren. Nach Beendigung der Rauchexposition wurde bei allen Zellen das basolaterale Medium erneuert, um eventuell im Medium gelöste Zigarettenrauchbestandteile zu entfernen.

Zur Untersuchung der rauchinduzierten Zytokinfreisetzung wurden die Zellen 24 Stunden nach der Zigarettenrauchexposition analysiert. Hierzu wurden die Epithelzellen apikal mit 100 µL 1x PBS gespült, die TEER Werte bestimmt und das Medium aus den basolateralen Kompartimenten abgenommen.

3.2.8.2. FITC-Dextran Translokation

Um den Einfluss des Zigarettenrauchs auf die makromolekulare Barrierefunktion zu untersuchen, wurde die Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran Translokation vom apikalen ins basolaterale Kompartiment des Transwells analysiert. Hierzu wurde mit 70 kDa FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, Steinbach, Deutschland) eine 10 mg/mL Stocklösung in PBS hergestellt. Direkt nach der Zigarettenrauchexposition wurden 60 µL dieser Lösung auf das apikale Kompartiment des Transwells gegeben. Die Fluoreszenzintensität in 100 µL Proben des basolateralen Mediums wurde nach 1 Stunde, 2, 6 und 24 Stunden gemessen. Durch Verwendung einer Standardkurve konnte die Translokation des FITC-Dextrans über die Epithelbarriere bestimmt werden [160].

3.2.8.3. Stimulationsexperimente mit murinen alveolaren Epithelzellen

24 Stunden nach dem Airlift wurden die alveolaren Epithelzellen für Stimulationsexperimente mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* und verschiedenen Zytokinen verwendet. Um den Einfluss von IL-17A und TNFα auf die IL-17C Expression der alveolaren Epithelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 Stunden in CMM mit 10% FBS kultiviert, welches mit 10 ng/mL rekombinanten TNFα (biolegend, Fell, Deutschland), 10 ng/mL oder 100 ng/mL rekombinanten

IL-17A (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) oder der Kombination von beiden Zytokinen versetzt war. Für die Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (CFU=10⁸) wurden die Zellen sowohl apikal als auch basolateral mit den Bakterien stimuliert. Die inaktivierten *P. aeruginosa* wurden dazu 1:20 mit Kulturmedium verdünnt. Um eine durch IL-17C und *P. aeruginosa* induzierte Zytokinfreisetzung zu analysieren, wurden die alveolaren Epithelzellen basolateral mit 50 ng/mL rekombinanten IL-17C (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) oder mit 1% BSA in PBS als Kontrolle stimuliert. Gleichzeitig wurde in das apikale Kompartiment 20 µl hitzeinaktivierte *P. aeruginosa* (1:20 mit PBS verdünnt) oder PBS als Kontrolle verabreicht. Jeweils 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinfreisetzung und ihres Expressionsprofils analysiert.

3.2.9. Bestimmung der Zytokinkonzentration

3.2.9.1. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationen an TNF α , KC (keratinocyte derived chemokine; murines Homolog für IL-8), MIP-2, IL-6, IL-17A und Albumin im Lungenhomogenisat, der BALF und in Zellkulturüberständen wurden mittels kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA Kits gemäß den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Zur Quantifizierung des Albumins in der BALF wurde das Maus Albumin Quantification Kit der Firma Bethyl Laboratories (Texas, USA) verwendet. Die restlichen Zytokin ELISAs wurden von der Firma R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) bezogen.

3.2.9.2. Cytometric Bead Assay (CBA)

Im Lungenhomogenisat von Mäusen, die akutem oder chronischem Zigarettenrauch ausgesetzt waren, wurden die Zytokine MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC und GM-CSF unter Verwendung von cytometric beads (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Hierzu wurde ein BD FACS Canto II System verwendet und die Proben gemäß den Herstellerangaben vorbereitet und vermessen.

3.2.9.3. Zytokinarray

Um einen Überblick über die Zytokinfreisetzung in Folge der akuten Zigarettenrauchexposition zu erhalten, wurde die BALF der Mäuse mittels eines Protein Arrays, der 40 verschiedene Zytokine detektieren konnte, analysiert. Aufgrund der dabei benötigten großen Probenmenge wurden die BALF Proben von jeweils elf Tieren pro Gruppe gepoolt und gemeinsam untersucht. Die Vorgehensweise der Probenanalyse erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland).

3.2.10. Bestimmung der Nitritkonzentration in Zellkulturüberständen

Neben einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt eine klassische Aktivierung von Alveolarmakrophagen zu einer Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Da NO jedoch ein sehr instabiles Molekül und somit auch sehr schwer nachzuweisen ist, wurde unter Verwendung des Griess Reagenz (Molecular Probes, Oregon, USA) die Menge an Nitrit (NO₂⁻) im Zellüberstand der Alveolarmakrophagen bestimmt. Bei diesem Molekül handelt es sich um ein stabiles und nicht flüchtiges Abbauprodukt von NO, das über eine Farbreaktion nachweisbar ist. Die Vorgehensweise der Messung wurde gemäß dem Herstellerprotokoll ausgeführt.

3.2.11. Isolation von RNA und quantitative RT-PCR

3.2.11.1. Isolation von RNA aus der Mauslunge

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus den Mäuselungen wurde Trizol[®] Reagent (life technologies, Darmstadt) verwendet. Jeweils die rechte Lungenhälfte wurde in 2 mL Trizol gegeben und mittels einem ULTRA-TURRAX[®] Dispergiergerät (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Die Proben wurden im Anschluss für 5 Minuten bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und 1,6 mL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jede Probe wurde mit 0,4 mL Chloroform (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, für 30 Sekunden kräftig geschüttelt und danach für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 12.000 g und 4°C für 15 Minuten kommt es in der Probe zu einer Phasentrennung, wobei drei unterschiedliche Phasen entstehen. Da lediglich die oberste wässrige Phase RNA enthält, wurde diese in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL Isopropanol (VWR, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Um ein besseres Vermischen der Substanzen und somit ein effizienteres Fällen der RNA

zu gewährleisten, wurden die Proben kurz gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation wurde bei 12.000 g und 4°C für 10 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde im Folgenden vorsichtig entfernt, das Pellet mit 2 mL 75% Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gewaschen und schließlich erneut bei 7.500 g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde danach mit 200 µL RNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) resuspendiert und ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde ein rDNase Set (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet und die RNA über Nacht in 100% Ethanol bei -20°C erneut gefällt. Am darauffolgenden Tag wurde die RNA bei 21.100 g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, das Pellet mittels 75% Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und einer kurzen Trocknungsphase in 200 µL RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop-Spektralphotometer (ThermoFischer, Braunschweig, Deutschland) bestimmt und auf 0,5 µg/µL eingestellt.

Für die complementary DNA (cDNA)-Synthese wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Braunschweig) verwendet und jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

3.2.11.2. Isolation von RNA aus Zellen

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den alveolaren Epithelzellen und Alveolarmakrophagen wurde das NucleoSpin[®] RNA Set (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Neben dem vorgegebenen DNase-Verdau auf der Säule wurde nach dem Eluieren der RNA ein zusätzlicher Verdau durchgeführt, der bereits unter dem Abschnitt „Isolation von RNA aus der Mauslunge“ beschrieben ist. Das RNA-Pellet wurde hierbei jedoch abschließend in 50 µL RNase-freiem Wasser gelöst.

Für die cDNA-Synthese wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) verwendet und jeweils 40 ng der Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA wurde nach abgeschlossener Synthese auf 100 µL Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

3.2.11.3. Quantitative RT-PCR

Für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) wurde pro angesetzter Reaktion 5 µL der verdünnten cDNA verwendet. Die PCR Reaktion wurde in einem CFX96 Touch Real time PCR Detection System (BioRad, München, Deutschland) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) durchgeführt. In der Tabelle 2 sind die verwendeten Primer (Metabion, Planegg, Deutschland) aufgeführt. Das bei der PCR Reaktion durchlaufene Programm setzte sich folgendermaßen zusammen: 10 Minuten bei 95°C; 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C; Schmelzkurve (65°C bis 95°C in 0,5°C Schritten). Als Negativkontrollen wurden –RT-Kontrollen mitgeführt. Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die $\Delta\Delta$ CT-Methode [244] verwendet.

GEN		PRIMERSEQUENZ
18S	forward	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
	reverse	5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'
β-Aktin	forward	5'- AGC CAT GTA CGT AGC CAT C -3'
	reverse	5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'
Aquaporin 5 (AQP5)	forward	5'-CTG CTC CGA GCC ATC TTC TA-3'
	reverse	5'-GGT GAA GTA GAT CCC CAC AAG A-3'
Claudin 3	forward	5'-AAG CCG AAT GGA CAA AGA A-3'
	reverse	5'-CTG GCA AGT AGC TGC AGT G-3'
Claudin 4	forward	5'-ACA GGT CCT GGG AAT CTC CT-3'
	reverse	5'-CAC TGC ATC TGA CCT GTG CT-3'
Claudin 5	forward	5'-GTG GAA CGC TCA GAT TTC AT-3'
	reverse	5'-TGG ACA TTA AGG CAG CAT CT-3'
Claudin 18	forward	5'- GAC CGT TCA GAC CAG GTA CA-3'
	reverse	5'-GCG ATG CAC ATC ATC ACT C-3'
CRAMP	forward	5'-TGT GCC TTC AAG GAA CAG GG-3'
	reverse	5'-AAT TTT CTT GAA CCG AAA GGG C-3'
IL-17C	forward	5'-CTG GAA GCT GAC ACT CAC G-3'
	reverse	5'-GGT AGC GGT TCT CAT CTG TG-3'

GAPDH	forward	5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG-3'
	reverse	5'-CAT TCT CGG CCT TGA CTG-3'
KC	forward	5'-GCT GGG ATT CAC CTC AAG AA-3'
	reverse	5'-AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT-3'
MIP-2	forward	5'-AAG TTT GCC TTG ACC CTG AA-3'
	reverse	5'-AGG CAC ATC AGG TAC GAT CC-3'
Occludin	forward	5'-GAG TTA ACG TCG TGG ACC GGT ATC-3'
	reverse	5'-CCC TGA AAT ACA AAG GCA GGA ATG-3'
RAGE	forward	5'-TTC AGC TGT TGG TTG AGC CTG AA-3'
	reverse	5'-TCG CCG TTT CTG TGA CCC TGA T-3'
Surfactant protein C	forward	5'-CAC AGC AAG GCC TAG GAA AG-3'
	reverse	5'-ATC CAA CCC AGT CCC TCT CT-3'
Zonula Occludens 1 (ZO-1)	forward	5'-AGG ACA CCA AAG CAT GTG AG-3'
	reverse	5'-GGC ATT CCT GCT GGT TAC A-3'

Tabelle 2: Auflistung der Gene und die dazugehörigen Primersequenzen, die mit qRT-PCR untersucht wurden.

3.2.12. Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die in Paraffin eingebetteten Lungenschnitte zunächst entparaffiniert, rehydriert und für 30 Minuten in 1 mM EDTA-Puffer (pH=8,0) gekocht, um eine Demaskierung der Epitope zu ermöglichen. Nach der Blockade der endogenen Peroxidasen mit 3% H₂O₂ (Acros Organics, Schwerte, Deutschland) wurden die Präparate mit einer 2,5%igen BSA-Lösung geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem RAGE Antiserum (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) erfolgte bei 4°C über Nacht und wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden Lungenschnitte von RAGE^{-/-} Mäusen bei der Färbung mitgeführt.

Durch die Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (Nichirei Bioscience, Tokio, Japan) und einer AEC Substratlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) konnte die Menge der gebundenen Primärantikörper sichtbar gemacht werden. Eine abschließend durchgeführte Gegenfärbung mit Hämalaun (Dako, Jena, Deutschland) sorgte für eine kontrastreiche Anfärbung der Zellkerne.

3.2.13. Histologische Bewertung des inflammatorischen Lungenschadens

Zur Bewertung des inflammatorischen Lungenschadens, der in Folge einer Infektion mit *P. aeruginosa* auftrat, wurden die Lungen der Mäuse mit Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und die Gewebeschnitte mit Hämalaun und Eosin angefärbt. Die Lungenschnitte wurden im Folgenden verblindet mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Dazu wurde sowohl das Vorkommen als auch das Ausmaß der Inflammation betrachtet. Die Stärke der Inflammation wurde durch verschiedene Punktzahlen angegeben. Dabei standen 2 Punkte für ein sehr stark ausgeprägtes Infiltrat, 1 Punkt wurde bei einem geringen Infiltrat vergeben und bei einem Fehlen eines Infiltrates wurden die Inflammation mit 0 Punkten bewertet. Zur Beurteilung des inflammatorischen Lungenschadens wurden perivaskuläre Infiltrate, peribronchiale Infiltrate und Infiltrate im Alveolargewebe unterschieden [261].

3.2.13. Statistische Analyse

Die statistische Analyse bei mehr als zwei Untergruppen wurde bei einer Normalverteilung der Werte mit einem One way ANOVA und dem post-hoc Tukey's Test durchgeführt. Waren die Werte nicht normalverteilt, so wurden die Gruppen mittels dem Kruskal-Wallis und dem Dunn's Multiple Comparison Test miteinander verglichen. Ein Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's t-Test (zweiseitig) oder bei nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Zur Analyse der Überlebensdaten wurde der Log-rank Test (Mantel Cox Test) verwendet. *In vitro* Experimente wurden mit dem Student's t-Test oder mit One way ANOVA und Bonferroni Anpassung analysiert, wenn mehr als zwei Untergruppen vorhanden waren. Zum statistischen Vergleich der TEER Entwicklung und der FITC-Dextran Translokation wurde ein Two way ANOVA mit Bonferroni Anpassung verwendet. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0.05$. Alle statistischen Tests wurden unter Verwendung der Prism-Software (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von RAGE auf die Struktur und Mechanik der Lunge

Unter physiologischen Bedingungen wird RAGE in sehr großen Mengen in der Lunge exprimiert [76]. Welche Funktionen der Rezeptor dabei im pulmonalen Gewebe übernimmt, ist momentan noch nicht genau geklärt. Um herauszufinden in welchem Maße RAGE an der Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase beteiligt ist, wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse hinsichtlich ihrer Lungenmechanik und pulmonalen Struktur analysiert. Zur Generierung der RAGE^{-/-} Mäuse haben Liliensiek et al. einen Knockout der Exons 2 bis 7 durchgeführt. Durch diese Deletion kann die extrazelluläre Domäne von RAGE nicht mehr gebildet werden, wodurch keine Ligandenbindung mehr stattfinden kann [197].

4.1.1. Analyse der pulmonalen RAGE Expression auf mRNA und Proteinebene

Um die genaue pulmonale Lokalisation von RAGE zu ermitteln, wurde das Lungengewebe von WT und RAGE^{-/-} Mäusen mittels Immunhistochemie und qRT-PCR analysiert. Zum Nachweis des Proteins wurden Gewebeschnitte unter Verwendung eines RAGE Antiserums immunhistochemisch angefärbt. Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, dass in den Lungen von WT Mäusen eine ausgeprägte Färbung für RAGE vorliegt. Ausschließlich alveolare Epithelzellen und Alveolarmakrophagen zeigten ein deutliches Signal, während in den Bronchien, Bronchiolen und im Bindegewebe der WT Mäuse keine Färbung detektiert werden konnte. Im pulmonalen Gewebe von RAGE^{-/-} Mäuse war keine Färbung nachweisbar.

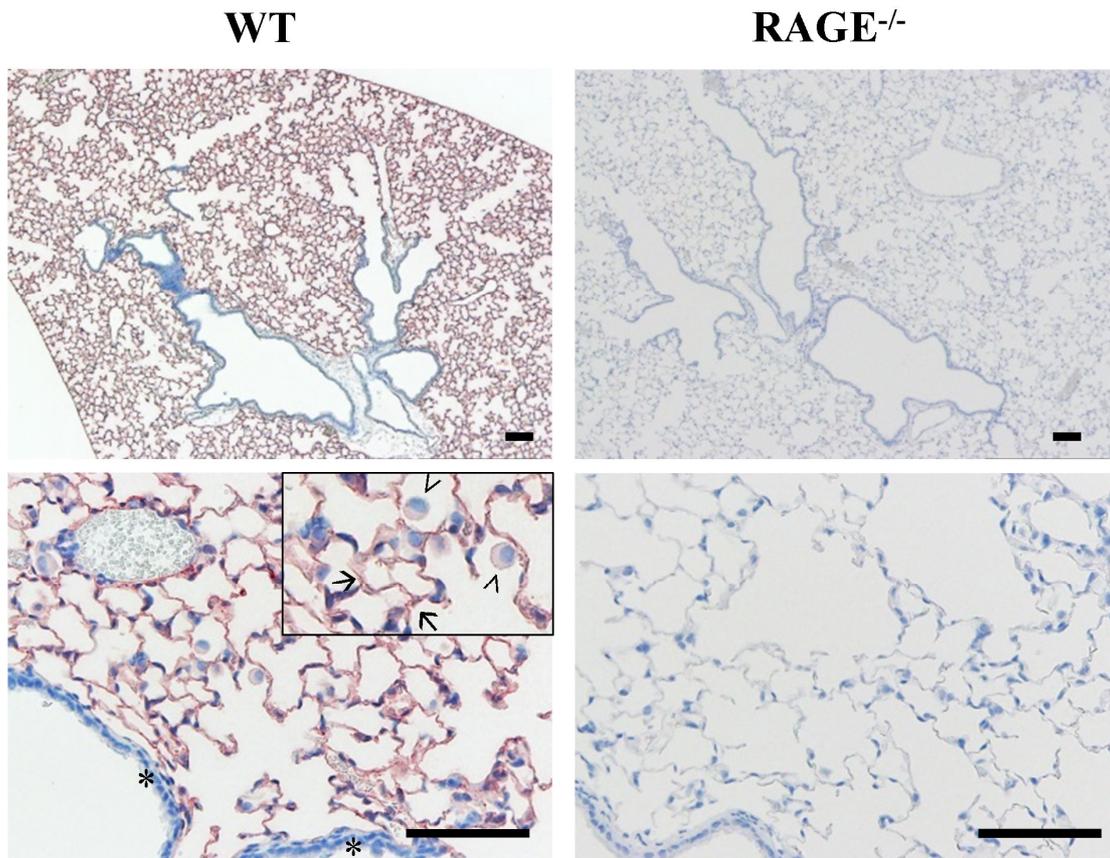


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis von RAGE im murinen Lungengewebe. Die Lungen von WT und $RAGE^{-/-}$ Mäusen wurden immunhistochemisch mit einem RAGE Antiserum angefärbt und lichtmikroskopisch evaluiert. Alveolare Epithelzellen (→) und Alveolarmakrophagen (>) zeigten bei der RAGE Färbung ein deutliches Signal. Bronchiale Epithelzellen (*) konnten durch das Antiserum nicht angefärbt werden. Scale bar: 100 μ m.

Zur Analyse der RAGE Expression auf mRNA Ebene wurde die Gesamt-RNA aus den Lungen von WT und $RAGE^{-/-}$ Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass nur WT Mäuse den Rezeptor exprimieren. In den $RAGE^{-/-}$ Mäusen konnte keine RAGE Expression nachgewiesen werden (Abb. 4A). Eine *ex vivo* Analyse der RAGE Expression in ausdifferenzierten alveolaren Epithelzellen und Alveolarmakrophagen bestätigte die immunhistochemischen Beobachtungen. In beiden Zelltypen konnte eine RAGE Expression detektiert werden. Allerdings konnten in den alveolaren Epithelzellen deutlich höhere mRNA Levels verzeichnet werden als in den Alveolarmakrophagen (Abb. 4B).

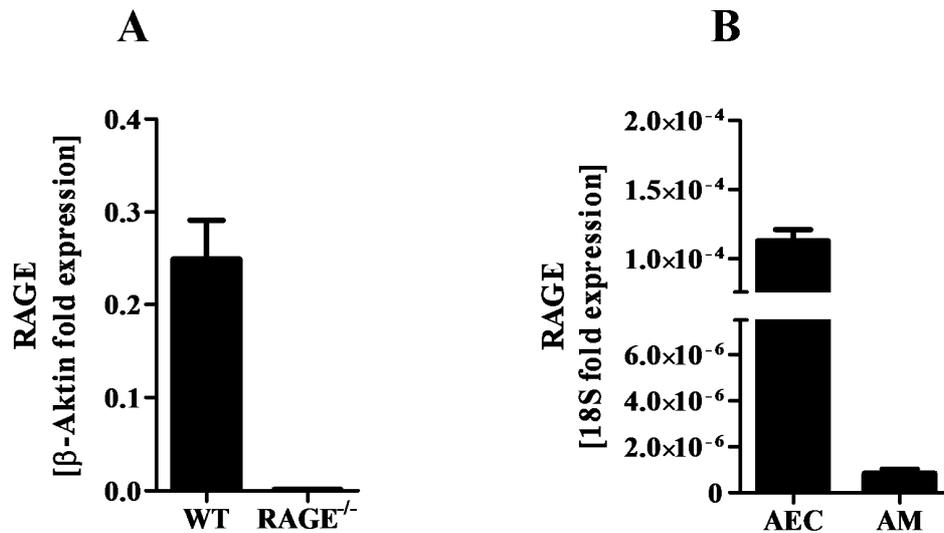


Abbildung 4: RAGE wird von alveolaren Epithelzellen und Alveolarmakrophagen exprimiert. (A) Aus den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen wurde die Gesamt-RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und die RAGE Expression mittels qRT-PCR analysiert. (WT n=10; RAGE^{-/-} n=8) (B) Aus WT Mäusen wurden alveolare Epithelzellen (AEC) und Alveolarmakrophagen (AM) isoliert und die Expression von RAGE mittels qRT-PCR untersucht (AEC n=7; AM n=4); mean±SEM.

4.1.2. RAGE beeinflusst die Mechanik der Lunge

Aufgrund der hohen Expressionsrate im pulmonalen Gewebe wurde im nächsten Schritt der Einfluss von RAGE auf die mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Lunge untersucht. Dazu wurde bei WT und RAGE^{-/-} Mäusen in einem Alter von zwei, vier und zehn Monaten eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt und das Gewebe mit Hilfe von stereologischen Methoden analysiert.

Um die pulmonale Struktur zu untersuchen, wurden die Lungen gemäß dem SURS-Prinzip gewonnen [142], eine Hämalaun-Eosin-Färbung angefertigt und eine stereologische Auswertung durchgeführt. In Hinblick auf die Alveolenoberfläche konnte zu keinem der drei Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den WT und RAGE^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abb. 5A). Der MCL, welcher die mittlere freie Wegstrecke zwischen den Alveolarepten beschreibt, war hingegen in den vier und zehn Monate alten RAGE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant vergrößert (Abb. 5B). Abbildung 5C zeigt repräsentative Gewebeschnitte aus zehn Monate alten WT und RAGE^{-/-} Mäusen.

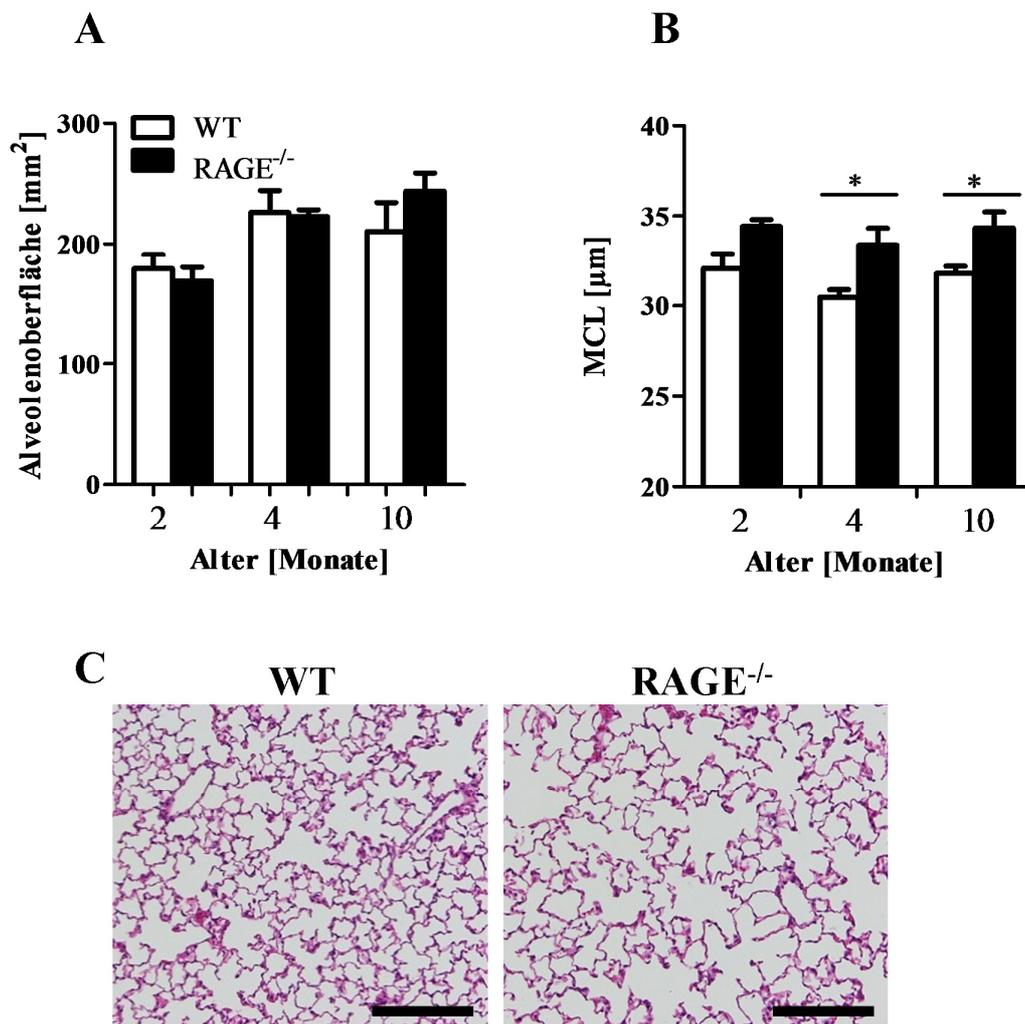


Abbildung 5: Eine Defizienz von RAGE führt zu einem vergrößerten MCL, aber zu keinem Verlust der Alveolenoberfläche. WT und RAGE^{-/-} Mäuse im Alter von zwei, vier und zehn Monaten wurden stereologisch analysiert und die Alveolenoberfläche (A) und der MCL (B), d.h. die mittlere freie Wegstrecke zwischen den Alveolarsepten, bestimmt. Statistik: Mann-Whitney-Test zwischen den Mausstämmen gleichen Alters (2 Monate: WT n=4, RAGE^{-/-} n=5; 4 Monate: WT n=5, RAGE^{-/-} n=5; 10 Monate: WT n=5, RAGE^{-/-} n=5); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05) (C) Repräsentative Histologie (Hämalaun-Eosin-Färbung) von zehn Monate alten WT und RAGE^{-/-} Mäusen. Scale bar: 200µm.

Für die Untersuchung der Lungenmechanik wurde das FlexiVent-System verwendet. Dabei handelt es sich um ein computergestütztes Beatmungsgerät mit dem eine mechanische Ventilation der Mäuse bei gleichzeitiger Analyse von verschiedenen Lungenfunktionsparametern ermöglicht wird. Die Betrachtung der unterschiedlichen Parameter ergab, dass eine RAGE Defizienz die pulmonale Mechanik beeinflusste. Während die Compliance, d.h. die Dehnbarkeit des respiratorischen Systems (Abb. 6A) in den RAGE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT

Mäusen signifikant erhöht war, zeigte die Elastance des respiratorischen Systems (Abb. 6B) bei einer RAGE Defizienz signifikant verringerte Werte. Mit zunehmendem Alter der Mäuse war zudem eine Zunahme der Compliance (Abb. 6A) und eine Abnahme der Elastance (Abb. 6B) des respiratorischen Systems festzustellen. Die Unterschiede, die zwischen den beiden Mausstämmen beobachtet werden konnten, waren allerdings altersunabhängig.

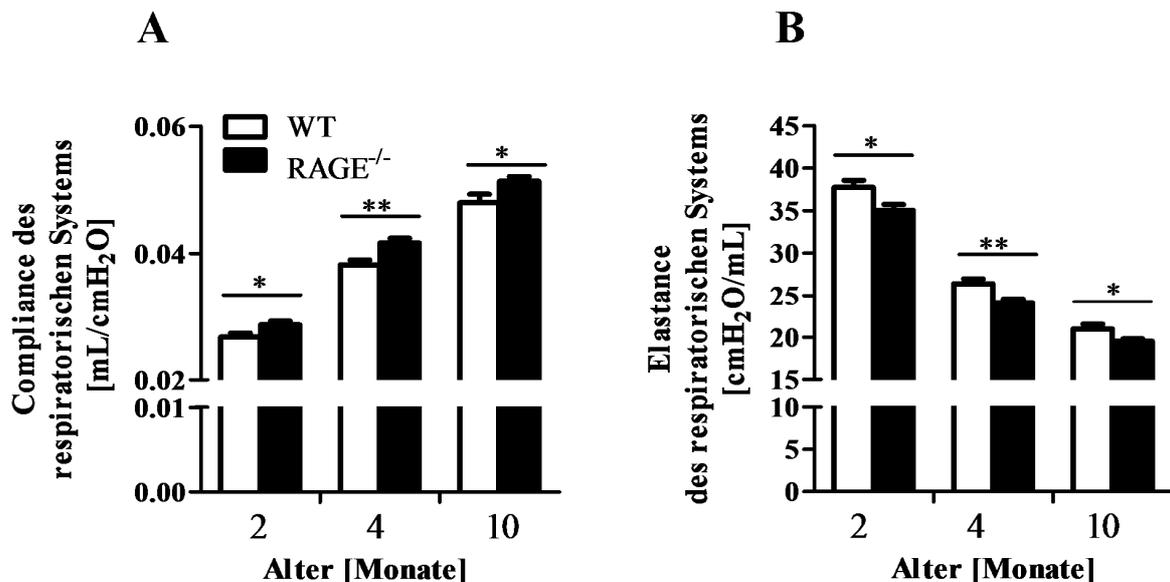


Abbildung 6: Eine Defizienz von RAGE führt zu einer veränderten Mechanik der Lunge. Unter Verwendung des FlexiVent-Systems wurde in WT und RAGE^{-/-} Mäusen eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. (A) Compliance des respiratorischen Systems. (B) Elastance des respiratorischen Systems. Statistik: Student's t-Test; zweiseitig (2 Monate: WT n=10, RAGE^{-/-} n=11; 4 Monate: WT n=10, RAGE^{-/-} n=11; 10 Monate: WT n=7, RAGE^{-/-} n=10); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Defizienz von RAGE zu einer veränderten Lungenmechanik, nicht jedoch zu einem Verlust an Lungenparenchym führt. Die stereologische Analyse zusammen mit den Ergebnissen der Lungenfunktion legen nahe, dass der erhöhte MCL aus einer verstärkten Dehnbarkeit der Lunge resultiert.

4.2. Funktion von RAGE bei rauchinduzierter Entzündung

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass im pulmonalen Gewebe von COPD-Patienten eine erhöhte RAGE Expression vorhanden ist [49, 94, 350]. Eine verstärkte Expression des Rezeptors war zudem mit einem zunehmenden Fortschritt der Erkrankung assoziiert, was anhand eines fortlaufenden Lungenfunktionsverlust in den Patienten detektiert werden konnte [350]. Aufgrund

dieser Erkenntnisse wird vermutet, dass RAGE bei der Pathogenese der COPD von großer Bedeutung ist. WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden daher akutem und chronischem Zigarettenrauch ausgesetzt, um die Beteiligung von RAGE bei einem rauchinduzierten Lungenschaden zu untersuchen.

4.2.1. Die Defizienz von RAGE beeinflusst die Lungenmechanik, aber nicht den Verlust alveolarer Oberfläche bei rauchinduzierter Entzündung

Zur Induktion eines rauchinduzierten Lungenschadens wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse für sechs Monate Zigarettenrauch ausgesetzt. WT und RAGE^{-/-} Mäuse, die für den gleichen Zeitraum normaler Raumluft exponiert waren, wurden als Kontrollen verwendet. Um den Einfluss des chronischen Zigarettenrauchs auf die Lungenphysiologie zu analysieren, wurden die mechanischen Eigenschaften des respiratorischen Systems mittels einer invasiven Lungenfunktionsmessung untersucht.

Die Lungenfunktionsmessung ergab, dass eine chronische Rauchexposition in den WT Mäusen zu einem Lungenschaden führte. Die totale Lungenkapazität (Abb. 7A) und die quasi-statische Compliance (Abb. 7B), d.h. die Dehnbarkeit des Lungengewebes, waren in den rauchexponierten WT Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erhöht. RAGE^{-/-} Mäuse zeigten bei diesen beiden Parametern keine rauchinduzierten Veränderungen. Die Compliance des respiratorischen Systems (Abb. 7C) wurde durch die Rauchexposition weder in den WT noch in den RAGE^{-/-} Mäusen verändert. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Parameter in raumluftexponierten RAGE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen bereits signifikant erhöht war. Um obstruktive Veränderungen der Lunge zu detektieren, wurden auch verschiedene pulmonale Widerstände gemessen. Jedoch konnten sowohl bei der Resistance des respiratorischen Systems (Abb. 7D) als auch bei dem Widerstand des Gewebes (Abb. 7E) keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausgruppen beobachtet werden.

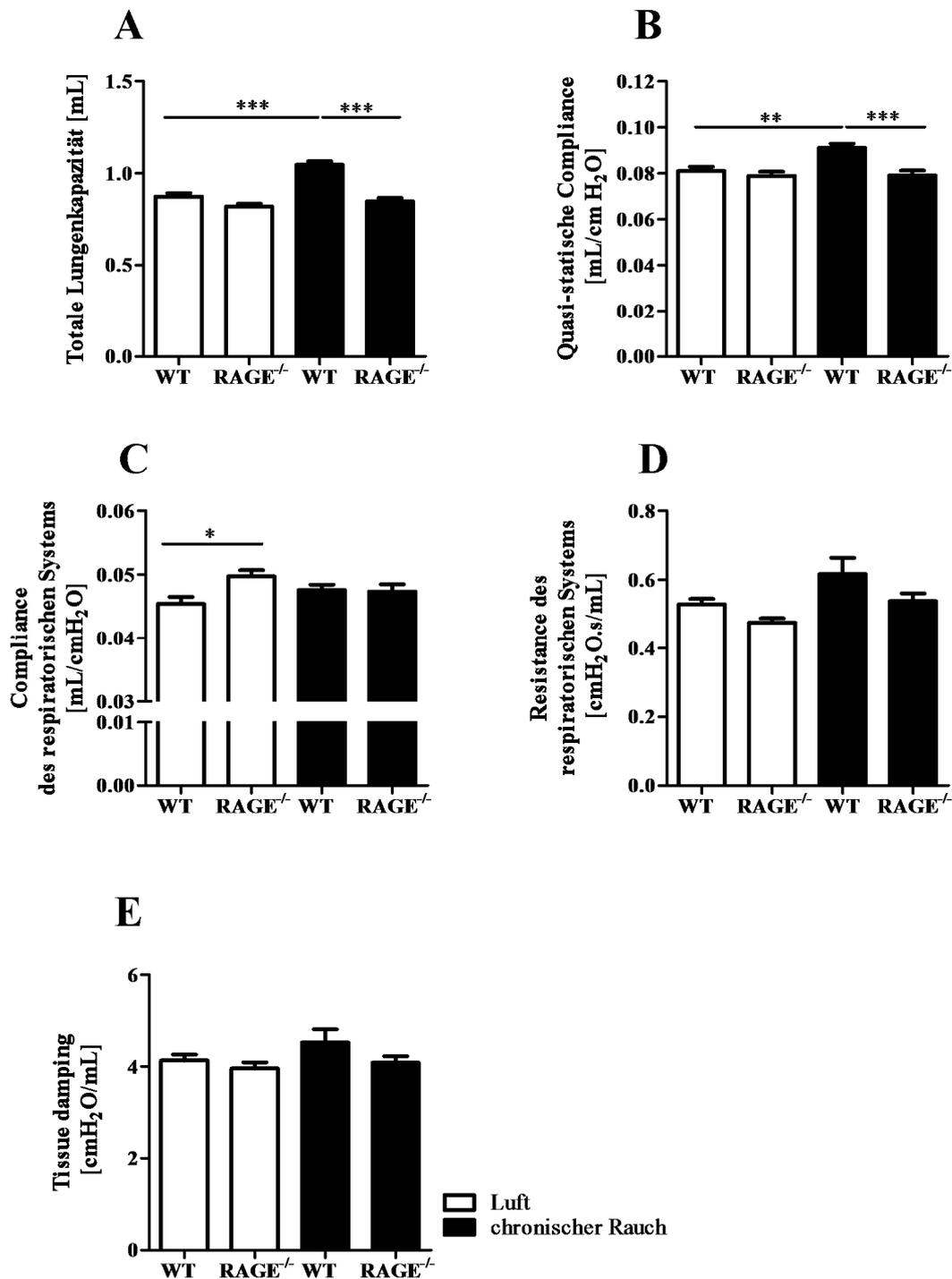


Abbildung 7: Invasive Lungenfunktionsmessung in WT und RAGE^{-/-} Mäusen zur Detektion eines rauchinduzierten Lungenschadens. WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden für sechs Monate Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mit Hilfe des FlexiVent-Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. (A) Totale Lungenkapazität. (B) Quasi-statische Compliance (Dehnbarkeit des Lungengewebes). (C) Compliance des respiratorischen Systems. (D) Resistance des respiratorischen Systems. (E) Tissue damping (Widerstand des Gewebes). Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=19, RAGE^{-/-} n=20; chronischer Rauch: WT n=19, RAGE^{-/-} n=18); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Durch den Einfluss von chronischem Zigarettenrauch kommt es neben dem Lungenfunktionsverlust auch zu einer Zerstörung von Lungenparenchym. Um die alveolaren Gewebestrukturen zu analysieren, wurden die Mauslungen mit Hilfe von histologischen und stereologischen Methoden untersucht. Abbildung 8 zeigt repräsentative mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte histologische Präparate von unberauchten und gerauchten Mäusen. Aus den Aufnahmen ist ersichtlich, dass eine Zigarettenrauchexposition in den WT Mäusen zu einer veränderten Lungenstruktur führte. Bei $RAGE^{-/-}$ Mäusen erschienen die Alveolen schon unter nativen Bedingungen vergrößert. Eine Rauchexposition führte in diesen Mäusen zu keinen weiteren offensichtlichen Veränderungen der Lungenstruktur.

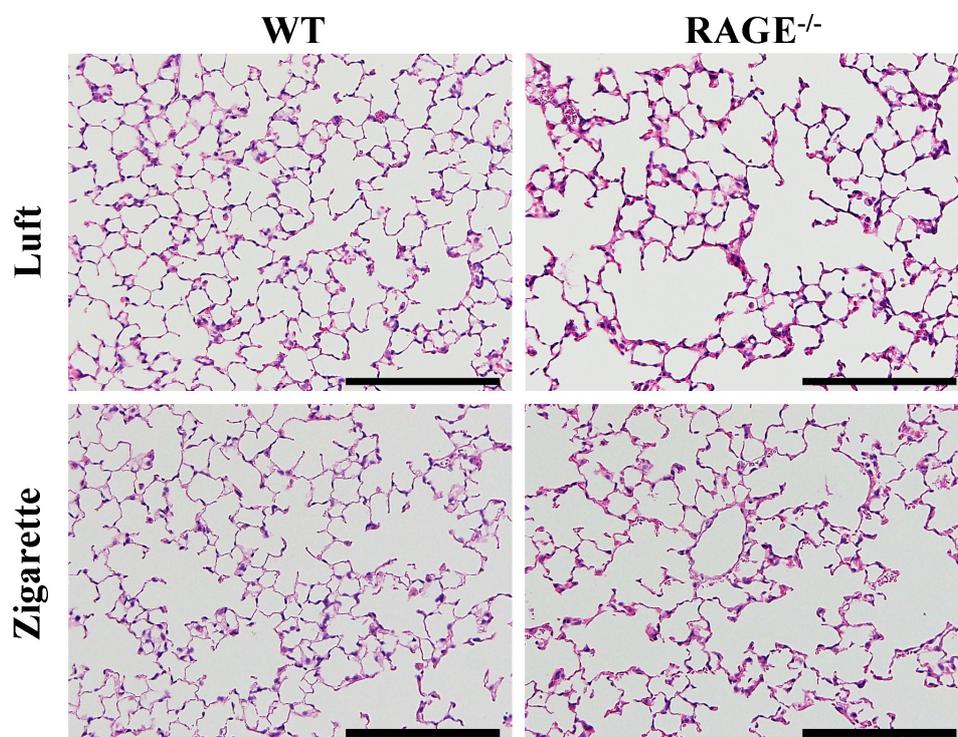


Abbildung 8: Histologie der Lungen von WT und $RAGE^{-/-}$ Mäusen nach sechs Monaten Zigarettenrauch- bzw. RaumlufTEXposition. Repräsentative histologische Aufnahmen von WT und $RAGE^{-/-}$ Lungen nach einer sechsmonatigen Zigarettenrauch- bzw. RaumlufTEXposition. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und der Lungenschaden lichtmikroskopisch evaluiert. Scale bar: 100 μ m.

Durch die stereologische Analyse des Alveolargewebes war es möglich, die histologischen Beobachtungen zu quantifizieren. Der MCL (Abb. 9A) nahm durch die Rauchexposition in den WT Mäusen signifikant zu. Des Weiteren konnte eine Verringerung der Alveolenoberfläche in den gerauchten WT Mäusen beobachtet werden (Abb. 9B). $RAGE^{-/-}$ Mäusen zeigten durch den

Einfluss des Zigarettenrauches ebenfalls eine Abnahme ihrer Alveolenoberfläche. Eine Veränderung des MCLs in Folge der Rauchexposition war nicht festzustellen. Der MCL war jedoch bereits bei unberauchten $RAGE^{-/-}$ Mäusen verglichen mit WT Mäusen signifikant vergrößert. Neben dem erhöhten MCL zeigten die $RAGE^{-/-}$ Mäuse noch weitere Auffälligkeiten in Bezug auf ihre Alveolenwände. Im Vergleich zu den WT Mäusen konnte in den $RAGE^{-/-}$ Mäusen eine Verdickung der Alveolarwand (Abb. 9C) und eine Zunahme des Alveolenwandvolumens (Abb. 9D) festgestellt werden. Eine Beeinflussung dieser beiden Parameter durch den Zigarettenrauch war nicht zu detektieren.

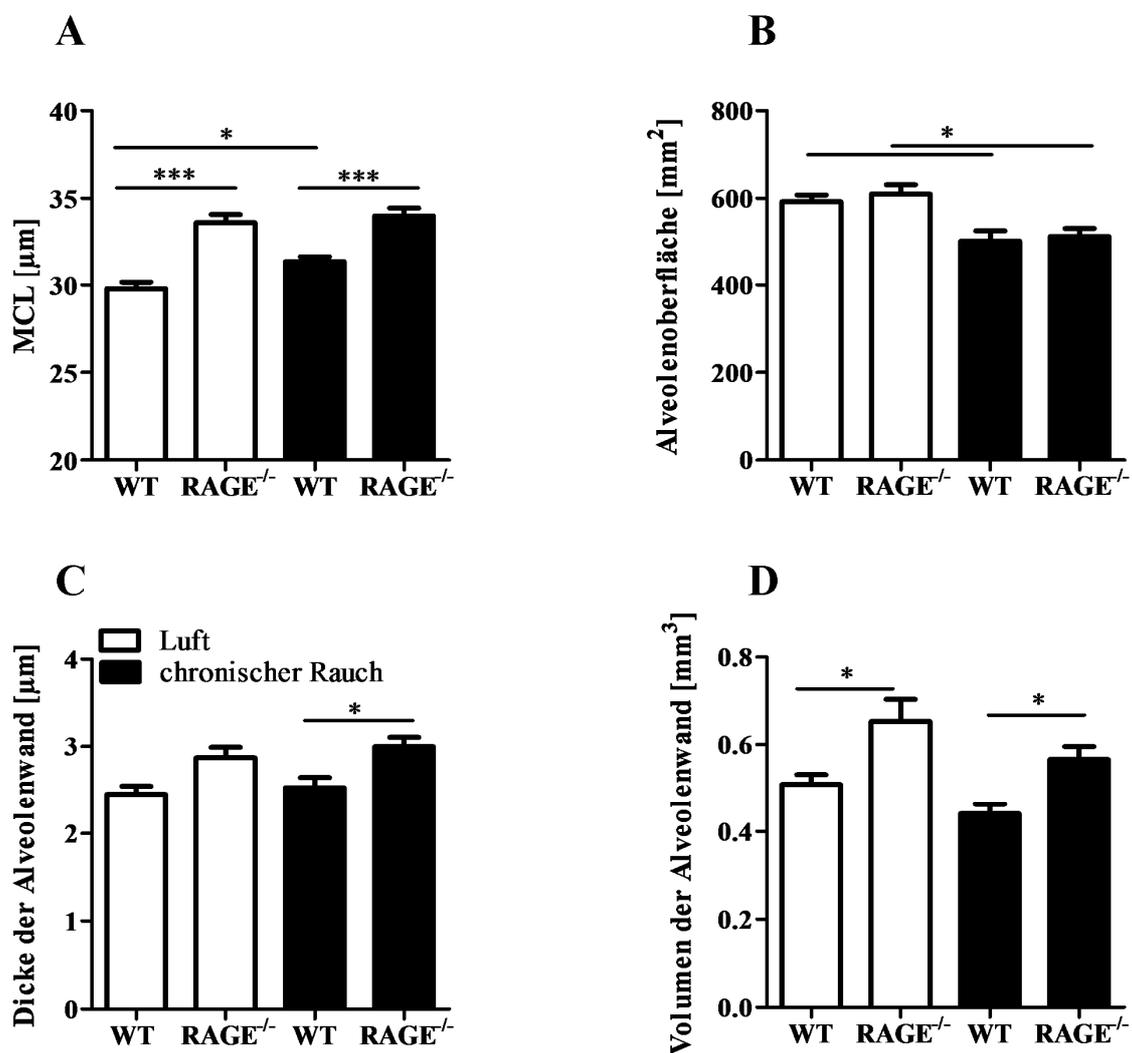


Abbildung 9: Stereologische Betrachtung von rauchinduzierten Veränderungen der pulmonalen Struktur in WT und $RAGE^{-/-}$ Mäusen. WT und $RAGE^{-/-}$ Mäuse wurden für sechs Monate Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse entnommen und das Gewebe mittels stereologischen Methoden analysiert. (A) MCL. (B) Alveolenoberfläche. (C) Dicke der Alveolenwand. (D) Volumen der Alveolenwand. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=10, $RAGE^{-/-}$ n=10; chronischer Rauch: WT n=12, $RAGE^{-/-}$ n=13); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; ***p<0,001).

Um einen Einblick in das pulmonale Entzündungsgeschehen nach sechsmonatiger Zigarettenrauchexposition zu erhalten, wurden die Lungen auch in Hinblick auf Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren analysiert. WT und RAGE^{-/-} Kontrollmäuse zeigten in ihrer BALF keine Unterschiede in der Anzahl und Zusammensetzung der Entzündungszellen (Abb. 10A-D). Durch die chronische Zigarettenrauchexposition kam es in beiden Mausstämmen zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahlen (Abb. 10A), wobei kein Unterschied zwischen den WT und RAGE^{-/-} Mäusen festzustellen war. Aus der Betrachtung der einzelnen zellulären Subtypen wurde ersichtlich, dass die Zunahme der Leukozytenzahl fast ausschließlich auf einer erhöhten Anzahl an Makrophagen beruhte (Abb. 10B). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten (Abb. 10C) und Lymphozyten (Abb. 10D) wurde durch die Rauchexposition nicht beeinflusst.

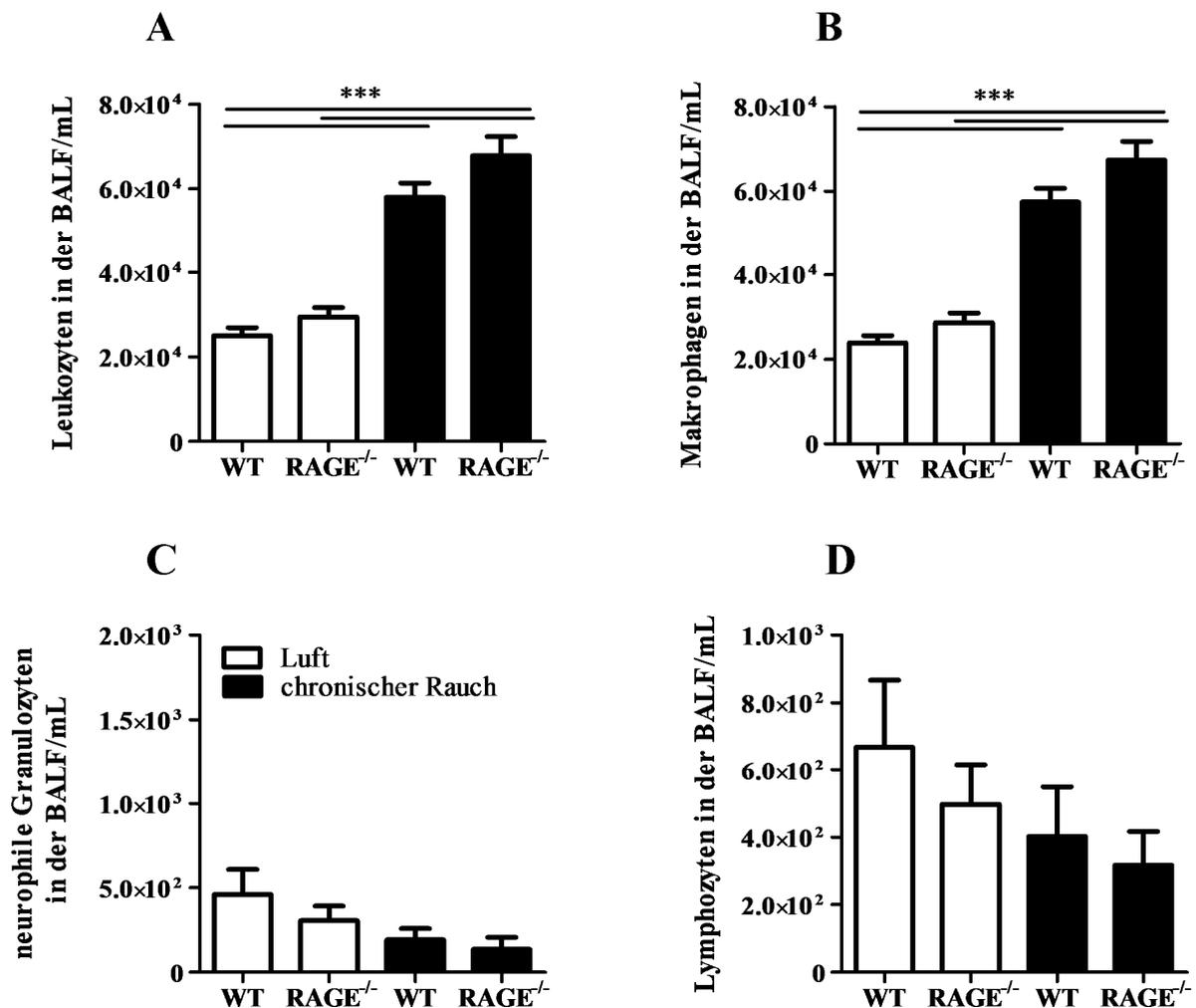


Abbildung 10: Leukozyten in der BALF nach chronischer Zigarettenrauchexposition. WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden für sechs Monate Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden

die Lungen der Mäuse lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Anfertigen von Cytospin-Präparaten wurden die einzelnen Leukozytensubtypen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Gesamtzahl der Leukozyten in der BALF. (B) Anzahl der Makrophagen, (C) neutrophilen Granulozyten und (D) der Lymphozyten im Differentialzellbild. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=10, RAGE^{-/-} n=10; chronischer Rauch: WT n=16, RAGE^{-/-} n=17); mean±SEM (Signifikanzniveau: ***p<0,001).

Zur Bestimmung der pulmonalen Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wurde das Lungenhomogenisat der WT und RAGE^{-/-} Mäuse mit einem CBA analysiert. Die Makrophagen-rekrutierenden Zytokine MIP-1 α (Abb. 11A) und MIP-1 β (Abb. 11B) sowie das neutrophilen Granulozyten-rekrutierende Chemokine KC (Abb. 11C) konnten im Lungenhomogenisat der WT und RAGE^{-/-} Kontrollmäuse nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden und zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. RANTES (Abb. 11D), welches ebenfalls für die Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist, war im Lungenhomogenisat der Kontrollmäuse in sehr hohen Konzentrationen vorhanden. Jedoch konnte auch bei diesem Zytokin kein Unterschied zwischen den Mausstämmen festgestellt werden. Die Zigarettenrauchexposition hatte kaum einen Einfluss auf die Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren. Lediglich bei den berauchten RAGE^{-/-} Mäusen konnten im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant geringere Konzentrationen von KC und RANTES beobachtet werden.

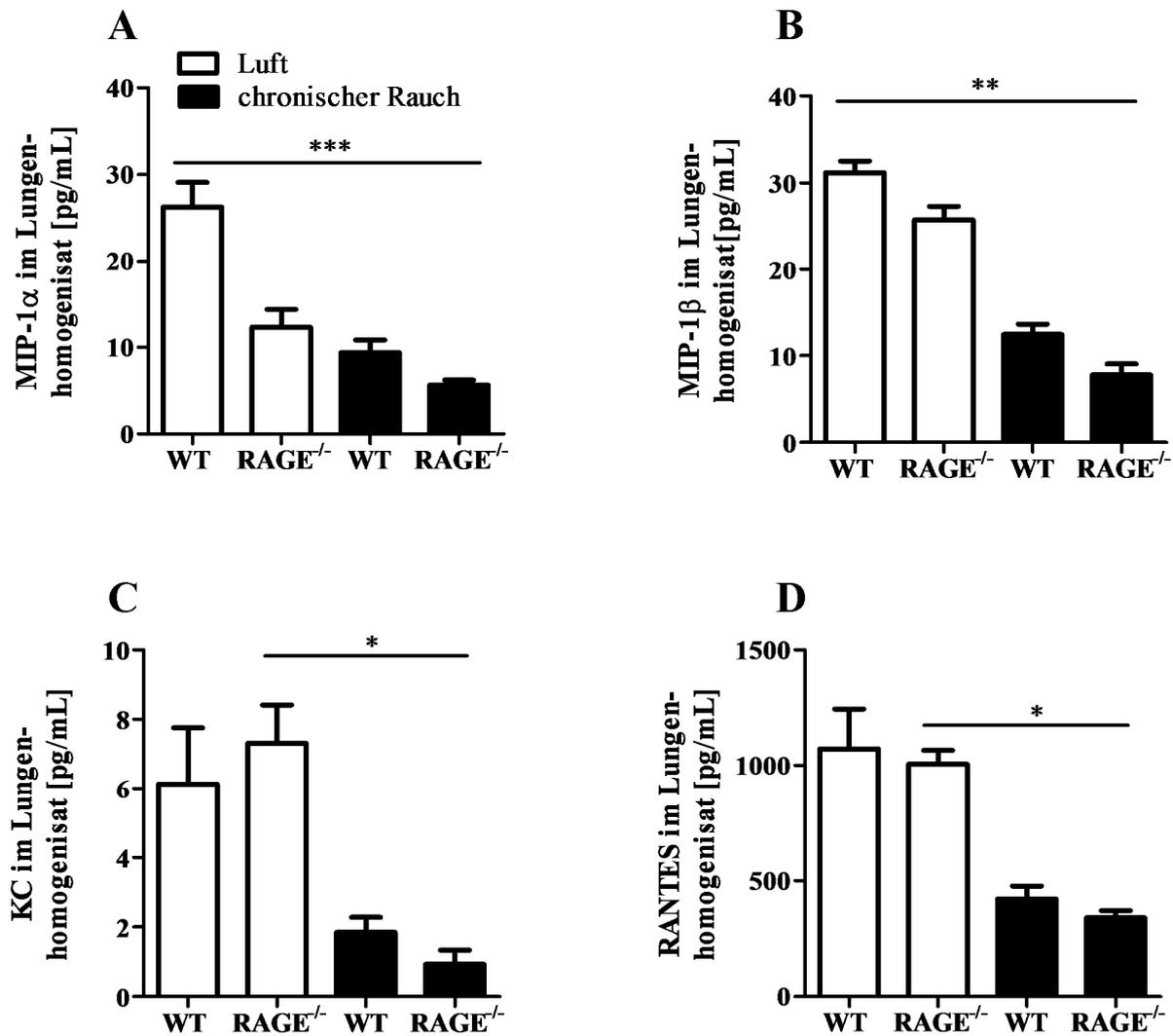


Abbildung 11: Konzentrationen der inflammatorischen Mediatoren MIP-1 α , MIP-1 β , KC und RANTES in den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen nach chronischer Zigarettenrauchexposition. WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden für sechs Monate Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Konzentrationen von MIP-1 α (A), MIP-1 β (B), KC (C) und RANTES (D) unter Verwendung eines CBAs im Lungenhomogenisat bestimmt. Statistik: Kruskal-Wallis mit post hoc Dunn's Multiple Comparison Test (Luft: WT n=4, RAGE^{-/-} n=4; chronischer Rauch: WT n=4, RAGE^{-/-} n=4); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.2.2. Eine durch akute Zigarettenrauchexposition induzierte pulmonale Entzündung wird von RAGE reguliert

Um die akute Auswirkung von Zigarettenrauch auf die pulmonale Entzündung zu analysieren, wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse im nächsten Schritt in einem Kurzzeitrauchmodell untersucht.

Im Gegensatz zu dem chronischen Rauchmodell wird im akuten Rauchmodell Zigarettenrauch mit einer höheren Partikelkonzentration verwendet, wodurch innerhalb von wenigen Tagen eine deutlich stärkere pulmonale Inflammation erzeugt werden kann, die zudem von neutrophilen Granulozyten dominiert wird [68, 156, 309].

WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden für drei Tage akutem Zigarettenrauch ausgesetzt und 24 Stunden nach der letzten Rauchexposition analysiert. Um zu überprüfen, ob die akute Zigarettenrauchexposition einen Einfluss auf die pulmonale RAGE Expression ausübte, wurden die Lungen der WT Mäusen mittels qRT-PCR analysiert. Aus Abbildung 12 wird ersichtlich, dass eine akute Rauchexposition zu einer signifikant verstärkten Expression von RAGE führte.

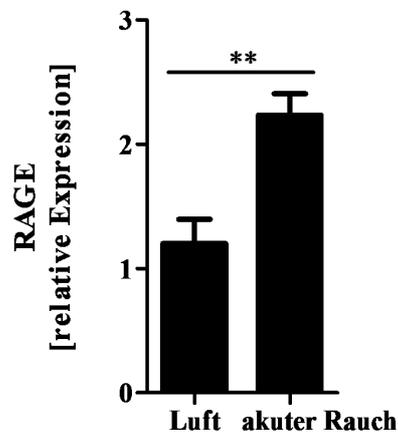


Abbildung 12: Pulmonale RAGE Expression nach akuter Zigarettenrauchexposition. WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden für drei Tage Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurde die Gesamt-RNA aus den Mauslungen gewonnen, cDNA synthetisiert und die RAGE Expression mit qRT-PCR analysiert. Statistik: Mann-Whitney-Test (Luft n=12; akuter Rauch n=6); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01).

Die Bestimmung der Leukozyten in der BALF ergab, dass es durch die akute Zigarettenrauchexposition in beiden Mausstämmen zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahlen kam. In den RAGE^{-/-} Mäusen fiel die Zunahme der Leukozyten jedoch signifikant stärker aus als in den WT Mäusen (Abb. 13A). Die Differenzierung der Leukozyten zeigte zudem, dass die rauchinduzierte Erhöhung der Zellzahlen durch eine Rekrutierung von unterschiedlichen Zelltypen erfolgte. In den WT Mäusen konnte die Zunahme der Zellzahlen ausschließlich auf einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten zurückgeführt werden (Abb. 13B). Die Anzahl der Makrophagen (Abb. 13C) und Lymphozyten (Abb. 13D) wurde durch den Zigarettenrauch nicht beeinflusst. In den RAGE^{-/-} Mäusen kam es neben einem signifikanten

Anstieg der neutrophilen Granulozyten (Abb. 13B) auch zu einer signifikanten Zunahme der Makrophagen (Abb. 13C). Die Lymphozytenmenge wurde in den RAGE^{-/-} Mäusen durch die Rauchexposition ebenfalls nicht beeinflusst (Abb. 13D).

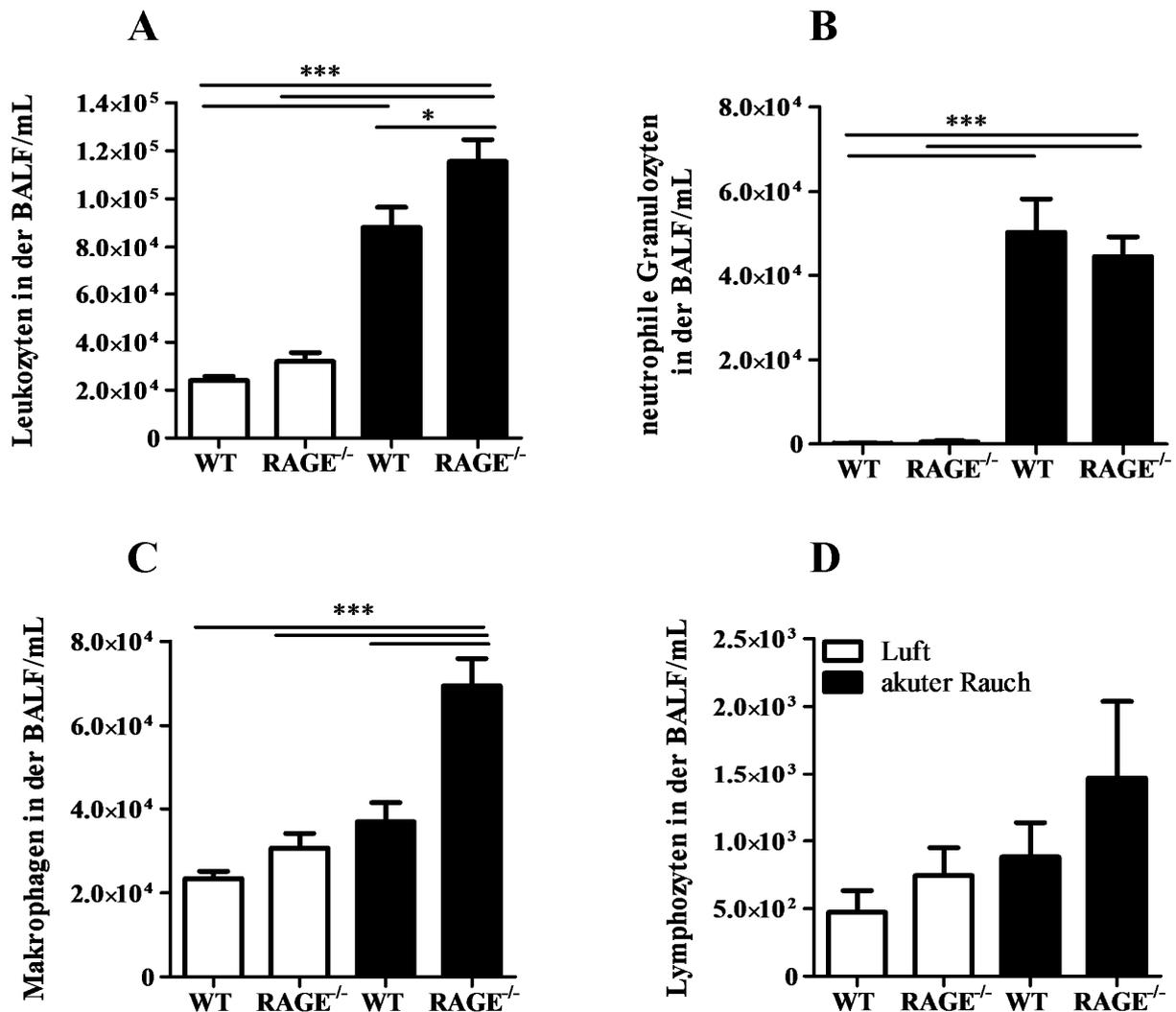


Abbildung 13: Leukozyten in der BALF nach akuter Zigarettenrauchexposition. WT und RAGE^{-/-} Mäuse wurden für drei Tage Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Anfertigen von Cytospin-Präparaten wurden die einzelnen Leukozytensubtypen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Gesamtzahl der Leukozyten in der BALF. (B) Anzahl der neutrophilen Granulozyten (C), Makrophagen und (D) Lymphozyten im Differentialzellbild. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=17, RAGE^{-/-} n=16; akuter Rauch: WT n=11, RAGE^{-/-} n=11); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; ***p<0,001).

Um herauszufinden, ob die akute Zigarettenrauchexposition einen Einfluss auf die pulmonale Freisetzung von verschiedenen entzündungsvermittelten Faktoren hatte, wurde die BALF

zunächst unter Verwendung eines Proteinarrays auf 40 verschiedene Zytokine untersucht. Hierzu wurde ein membranbasierter Antikörperassay verwendet. Aufgrund der dabei benötigten hohen Probenmenge wurden die BALFs von jeweils elf Tieren pro Gruppe vereint und analysiert. Für den Array wurden lediglich die Proben der rauchexponierten Mäuse verwendet.

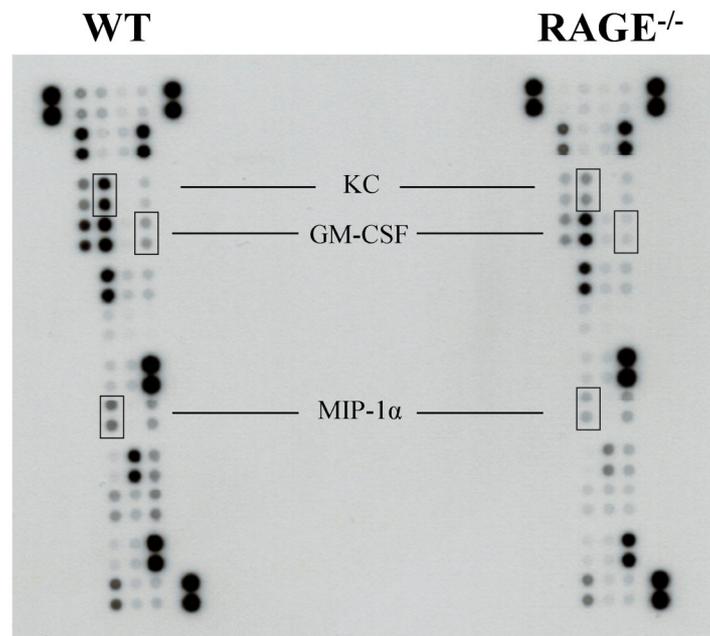


Abbildung 14: Untersuchung der Zytokinlevel in der BALF nach akuter Zigarettenrauchexposition mit Hilfe eines Proteinarrays. Nach einer dreitägigen akuten Zigarettenrauchexposition wurde die BALF von jeweils elf WT bzw. RAGE^{-/-} Mäusen vereint und das Zytokinprofil unter Verwendung eines Proteinarrays analysiert.

Durch den Proteinarray konnte festgestellt werden, dass in der BALF der RAGE^{-/-} Mäuse ein verändertes Zytokinprofil vorliegt. Die in Abbildung 14 hervorgehobenen Proteine KC, GM-CSF und MIP-1α zeigten beispielhaft, dass in den Lungen von RAGE^{-/-} Mäusen deutlich weniger Zytokine freigesetzt wurden. Zur genaueren quantitativen Bestimmung wurde im Folgenden das Chemokin KC in der BALF mittels ELISA analysiert (Abb. 15A). Während WT und RAGE^{-/-} Mäuse unter normalen Bedingungen nur sehr geringe Mengen KC sezernierten, kam es durch die Exposition mit akutem Zigarettenrauch zu einer Induktion der Freisetzung. In beiden Mausstämmen nahm die KC Konzentration durch die Rauchexposition signifikant zu, jedoch wurde in den RAGE^{-/-} Mäusen signifikant weniger freigesetzt als in den WT Mäusen.

MIP-1α und MCP-1, die unter anderem für die Rekrutierung von Makrophagen verantwortlich sind, wurden mit Hilfe einer CBA Analyse im Lungenhomogenisat bestimmt. Durch die akute Exposition mit Zigarettenrauch kam es in den WT und RAGE^{-/-} Mäusen zu einem signifikanten

Anstieg der MIP-1 α Konzentration (Abb. 15B). Ein Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen, so wie er bei dem Proteinarray mit BALF Proben beobachtet wurde, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Konzentration an MCP-1 wurde durch den Zigarettenrauch nur tendenziell erhöht und zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den WT und RAGE^{-/-} Mäusen (Abb. 15C). Das Zytokin GM-CSF konnte durch die CBA Messung weder in den Kontrollen noch in den rauchexponierten Mäusen nachgewiesen werden und ist daher graphisch nicht aufgeführt.

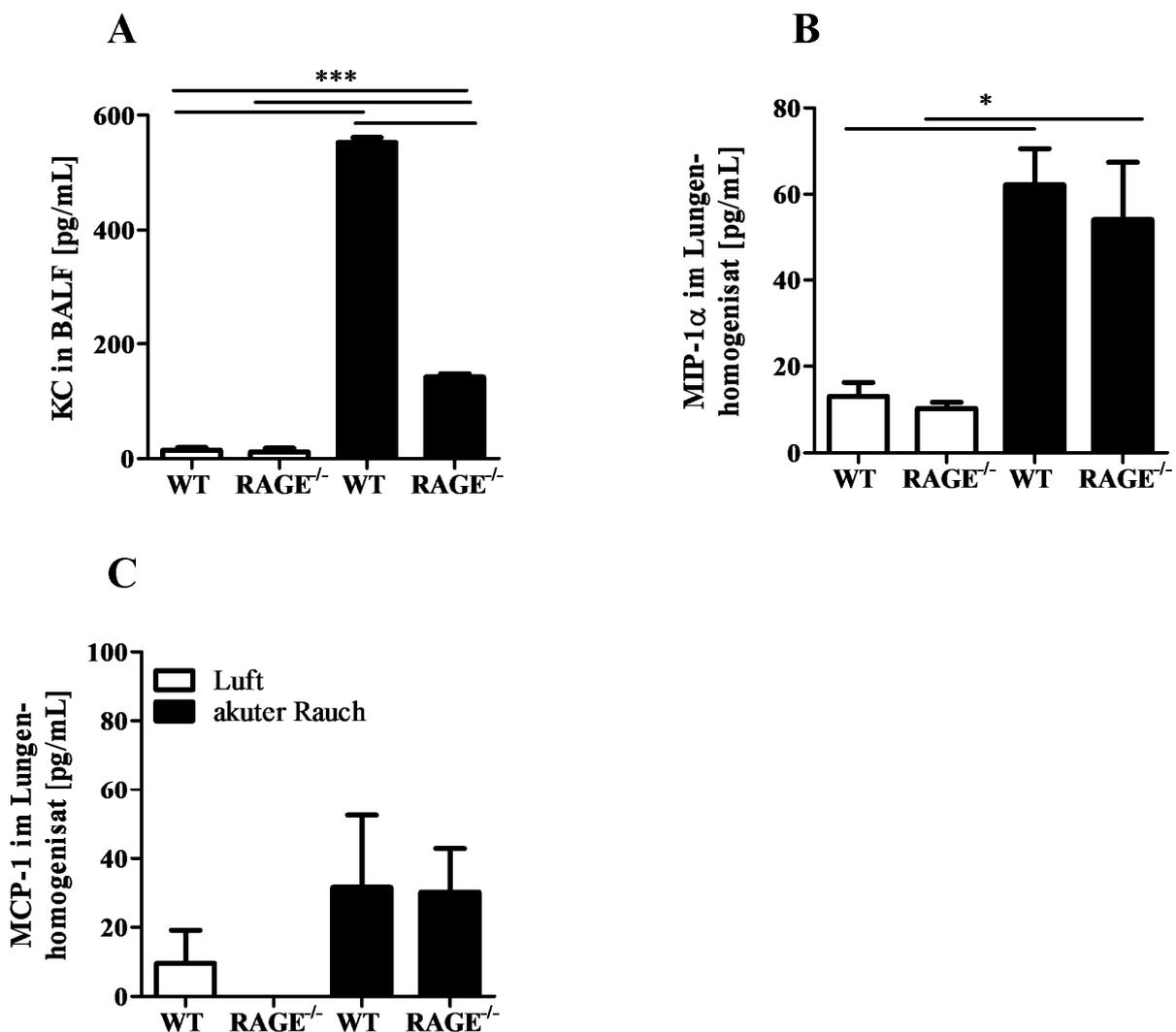


Abbildung 15: Pulmonale Konzentrationen der Chemokine KC, MIP-1 α und MCP-1 in WT und RAGE^{-/-} Mäusen nach akuter Zigarettenrauchexposition. Nach einer dreitägigen Exposition mit akutem Zigarettenrauch wurden die Mauslungen lavagiert, die Lungen entnommen und zu Lungenhomogenisat verarbeitet. (A) KC wurde mit Hilfe eines ELISAs in der BALF nachgewiesen. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=9, RAGE^{-/-} n=9; akuter Rauch: WT n=6, RAGE^{-/-} n=6). Unter Verwendung eines CBAs wurde im Lungenhomogenisat MIP-1 α (B) und MCP-1 (C) nachgewiesen. Statistik: Kruskal-Wallis mit post hoc Dunn's Multiple Comparison Test (Luft: WT n=5, RAGE^{-/-} n=5; akuter Rauch: WT n=5, RAGE^{-/-} n=5); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; ***p<0,001).

Da Zigarettenrauch auch einen Einfluss auf die alveolare Epithelbarriere ausübt, wurden die Mäuse auch hinsichtlich eines epithelialen Barrierschadens analysiert. Dazu wurde das Serumprotein Albumin in der BALF der Mäuse bestimmt. Wird die alveolare Barriere beschädigt oder zerstört, so kann Albumin aus der Blutzirkulation in die Lunge übertreten und kann somit in der BALF detektiert werden [160, 177, 343, 364]. Abbildung 16 zeigt, dass es in den berauchten WT Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des Albuminspiegels kam. Die RAGE^{-/-} Mäuse hatten im Vergleich zu den WT Mäusen bereits im nativen Zustand höhere Albuminkonzentrationen in ihrer BALF. Durch die Zigarettenrauchexposition kam es in diesen Mäusen zu keinem weiteren Anstieg der Albuminmenge.

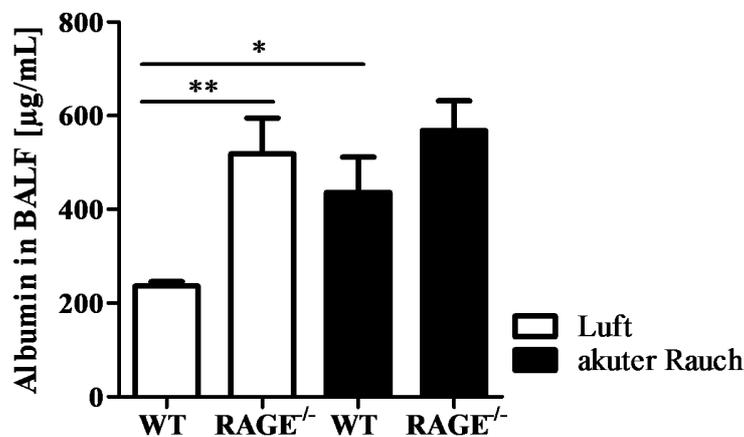


Abbildung 16: Konzentration des Serumproteins Albumin in der BALF von WT und RAGE^{-/-} Mäusen nach akuter Zigarettenrauchexposition. Nach einer dreitägigen Exposition mit akutem Zigarettenrauch wurden die Mauslungen lavagiert und die Albuminkonzentration in der BALF mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=10, RAGE^{-/-} n=10; akuter Rauch: WT n=8, RAGE^{-/-} n=8; mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01).

4.3. Charakterisierung der Zelltyp-spezifischen Funktionen von RAGE

In der gesunden Lunge wird RAGE hauptsächlich von alveolaren Epithelzellen und Alveolarmakrophagen exprimiert. Um einen genaueren Einblick in die Funktionen zu erhalten, die RAGE in den jeweiligen Zelltypen übernimmt, wurden alveolare Epithelzellen und Alveolarmakrophagen aus den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen isoliert und unter *ex vivo* Bedingungen analysiert.

4.3.1. RAGE reguliert die Differenzierung und Barriereausbildung von primären murinen alveolaren Epithelzellen

Eine Funktion der alveolaren Epithelzellen liegt in der Ausbildung einer physikalischen Barriere, die einen Übertritt von eingeatmeten Bakterien, Viren, Allergenen und anderen schädlichen Partikeln aus dem Alveolarraum in das Blut verhindert [119]. Zudem bilden Epithelzellen einen transepithelialen Widerstand aus, der den parazellulären Transport von Ionen und wasserlöslichen Substanzen reguliert. Um den Einfluss von RAGE bei diesen Funktionen zu untersuchen, wurden alveolare Epithelzellen aus den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen gewonnen und auf Filtereinsätzen von Transwell-Kultursystemen kultiviert. Die Fähigkeit der Zellen eine funktionelle Barriere aufzubauen, wurde anhand von täglichen TEER Messungen untersucht.

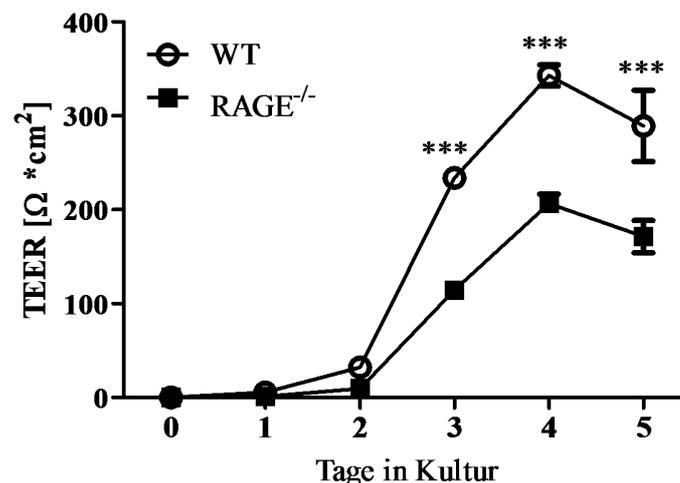


Abbildung 17: Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT und RAGE^{-/-} Mäusen. Aus den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen wurden alveolare Epithelzellen isoliert und auf Filtereinsätze von Transwell-Kultursystemen ausgesät. Für die Kultivierungsphase von fünf Tagen wurde der Verlauf der TEER Entwicklung bestimmt. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (jeweils n=12 pro Gruppe); mean±SD (Signifikanzniveau: ***p<0,001).

Das Verlaufsdigramm in Abbildung 17 zeigt, dass die Ausbildung einer intakten Barriere sehr stark von RAGE abhängig ist. Bei alveolaren Epithelzellen aus WT Mäusen konnte ab dem zweiten Kultivierungstag ein Anstieg der TEER Werte festgestellt werden, der am vierten Tag sein Maximum erreicht hatte und anschließend wieder leicht absank. Zellen aus RAGE^{-/-} Mäusen

zeigten eine vergleichbare Entwicklung des TEER Verlaufes, jedoch waren die gemessenen Werte signifikant niedriger als bei den WT Zellen.

Durch die Kultivierung von primären alveolaren Epithelzellen auf Transwell-Filtereinsätzen kommt es zu einer Transdifferenzierung von Alveolar Typ II zu Alveolar Typ I Zellen [34, 73, 76, 113]. Der Differenzierungsgrad der alveolaren Epithelzellen kann über die Expression von verschiedenen Phänotyp-spezifischen Markern untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Expression des Alveolar Typ II Markers Surfactant Protein C und des Alveolar Typ I Markers AQP5 mit Hilfe von qRT-PCR analysiert. Sowohl in den aus WT Mäusen isolierten Zellen als auch in den $RAGE^{-/-}$ Zellen, konnte in Folge der Kultivierung eine kontinuierliche Abnahme der Surfactant Protein C Expression festgestellt werden (Abb. 18A). Zellen aus WT Mäusen zeigten zudem eine ansteigende Expression von AQP5, die ihr Maximum am zweiten Kultivierungstag erreicht hatte und anschließend wieder abnahm (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu konnte in den Zellen aus $RAGE^{-/-}$ Mäusen keine signifikante Zunahme der AQP5 Expression beobachtet werden.

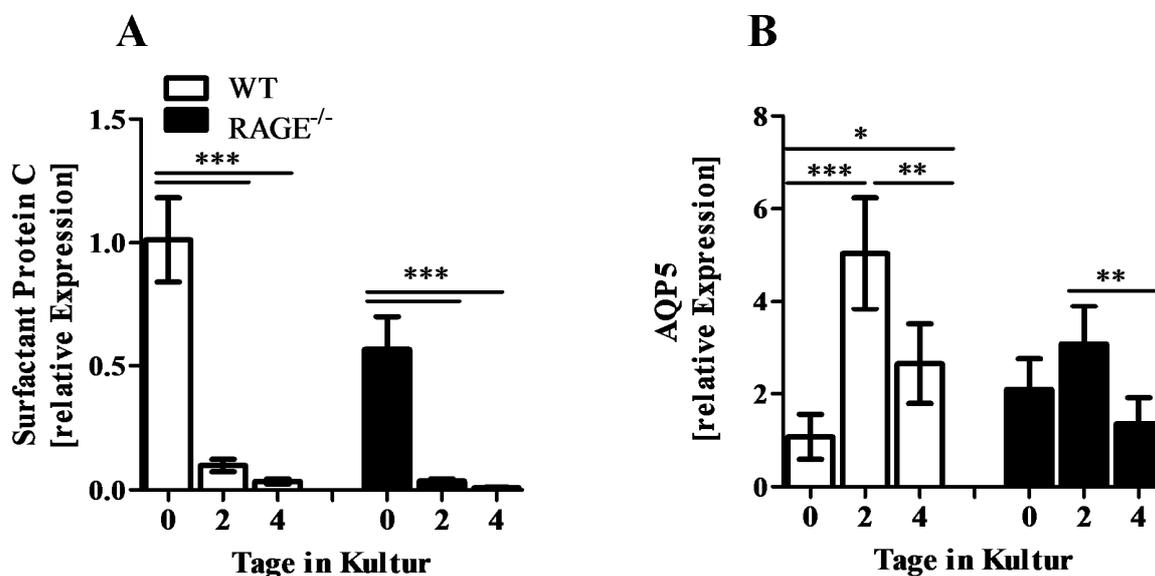


Abbildung 18: Relative Expression von Surfactant Protein C und AQP5 in alveolaren Epithelzellen aus WT und $RAGE^{-/-}$ Mäusen. Alveolare Epithelzellen wurden aus den Lungen von WT und $RAGE^{-/-}$ Mäusen isoliert und auf Filtereinsätzen von Transwell-Kultursystemen kultiviert. Aus frisch isolierten Zellen (Tag 0) und Zellen für die 2 bzw. 4 Tage in Kultur waren wurde die Gesamt-RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe einer qRT-PCR die Expression der alveolaren Epithelzellmarker Surfactant Protein C (A) und AQP5 (B) analysiert. Zur Auswertung der relativen Expression wurden die Werte auf die frisch isolierten WT Zellen normiert. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (jeweils $n=6$ pro Gruppe); $\text{mean}\pm\text{SD}$ (Signifikanzniveau: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Neben den beiden Differenzierungsmarkern wurde auch die Expression von verschiedenen Tight Junction Proteinen untersucht. In den Zellen aus WT Mäusen ergab die Analyse von Claudin 18 eine signifikante Zunahme der mRNA in Folge der Kultivierung (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu konnte in den Zellen aus RAGE^{-/-} Mäusen eine signifikante Abnahme der Claudin 18 Expression in Folge der Kultivierung beobachtet werden. In beiden Gruppen führte die Kultivierung auf den Transwell-Filtereinsätzen zudem zu einer vermehrten Expression von Claudin 4 (Abb. 19B), ZO-1 (Abb. 19C) und Occludin (Abb. 19D)

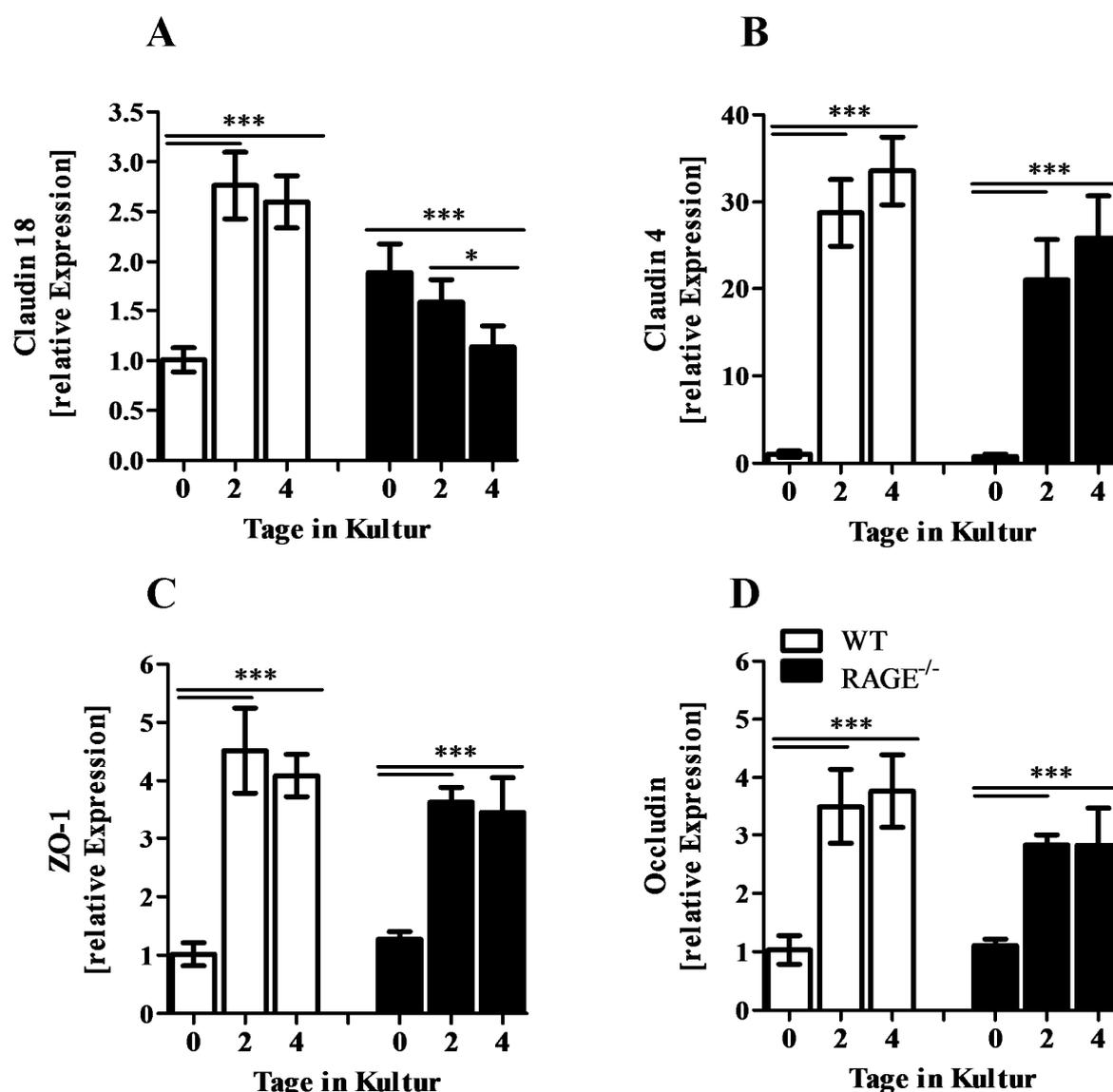


Abbildung 19: Relative Expression der Tight Junction Proteine Claudin 18, Claudin 4, ZO-1 und Occludin in alveolaren Epithelzellen aus WT und RAGE^{-/-} Mäusen. Alveolare Epithelzellen wurden aus den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen isoliert und auf Filtereinsätzen von Transwell- Kultursystemen kultiviert. Aus frisch isolierten Zellen (Tag 0) und Zellen für die 2 bzw. 4 Tage in Kultur waren wurde die Gesamt-RNA gewonnen, in cDNA

umgeschrieben und die Expression verschiedener Tight Junction Proteine mit Hilfe einer qRT-PCR analysiert. Relative Expression von (A) Claudin 18, (B) Claudin 4, (C) ZO-1 und (D) Occludin normiert auf die Werte der frisch isolierten WT Zellen. One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (jeweils n=6 pro Gruppe); mean±SD (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Um den Einfluss von Zigarettenrauch auf die Barriereintegrität der *ex vivo* kultivierten alveolaren Epithelzellen zu untersuchen, wurden die aus WT und RAGE^{-/-} Mäusen gewonnenen Zellen nach Abschluss ihrer Transdifferenzierung für 15 Minuten dem Rauch von drei filterlosen Zigaretten ausgesetzt. 24 Stunden nach der Exposition wurden die Barriereigenschaften der Zellmonolayer analysiert. Dazu wurde sowohl die ionische Permeabilität als auch die Durchlässigkeit für Makromoleküle bestimmt. Die ionische Permeabilität der Monolayer wurde anhand von TEER Messungen untersucht. Abbildung 20A zeigt, dass Zigarettenrauch bei den aus WT Mäusen isolierten Zellen zu einer signifikanten Verringerung der TEER Werte führte. Die ionische Permeabilität der WT Monolayer nahm folglich durch die Rauchexposition zu. Bei den aus RAGE^{-/-} Mäusen isolierten Zellen konnten keine rauchinduzierten Veränderungen festgestellt werden. Jedoch zeigten die mit Raumluft exponierten RAGE^{-/-} Zellen im Vergleich zu den WT Zellen bereits signifikant verringerte Werte. Zur Bestimmung der parazellulären Permeabilität von Makromolekülen wurde die Translokation von FITC-gekoppeltem Dextran untersucht. Dazu wurde das Tracermolekül direkt nach der Zigarettenrauch- bzw. Raumluftexposition auf den Zellmonolayer appliziert und dessen Übertritt aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment des Transwell-Systems für 24 Stunden analysiert. Durch den Zigarettenrauch kam es in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der FITC-Dextran Konzentration im basolateralen Kompartiment (Abb. 20B). Ein Unterschied zwischen den WT und RAGE^{-/-} Zellen war jedoch weder bei den Kontrollen noch bei den rauchexponierten Monolayern festzustellen.

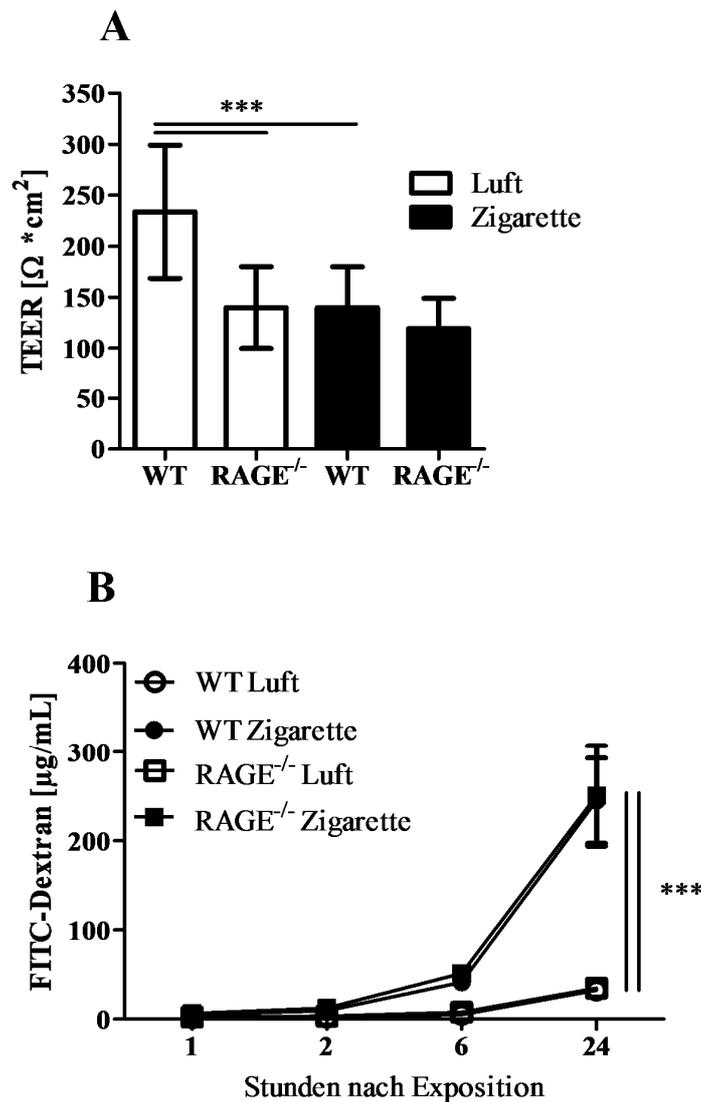


Abbildung 20: Analyse der Barriereintegrität von WT und RAGE^{-/-} alveolaren Epithelzellen nach Zigarettenrauchexposition. Ausdifferenzierte WT und RAGE^{-/-} alveolare Epithelzellmonolayer wurden für 15 Minuten dem Rauch von drei filterlosen Zigaretten bzw. Raumluft ausgesetzt. (A) Bestimmung der TEER Werte 24 Stunden nach der Exposition. Statistik: One Way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Luft: WT n=11, RAGE^{-/-} n=10; Zigarette: WT n=12, RAGE^{-/-} n=11) (B) Bestimmung der Translokation von FITC-Dextran aus dem apikalen ins basolaterale Kompartiment des Transwell-Kultursystems. Statistik: Two-way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Luft: WT n=14, RAGE^{-/-} n=12; Zigarette: WT n=14, RAGE^{-/-} n=13); mean±SD (Signifikanzniveau: ***p<0,001).

Um den Einfluss der Zigarettenrauchexposition auf die Tight Junction Protein Expression zu analysieren, wurden 24 Stunden nach der Raumluft- bzw. Zigarettenrauchexposition die mRNA Level von unterschiedlichen Proteinen mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression von Claudin 18 (Abb. 21A), ZO-1 (Abb. 21B), Occludin (Abb. 21C) und den Claudinen 3, 4 und 5 (Daten

nicht gezeigt) wurden durch die Rauchexposition nicht beeinflusst. Weder in den gerauchten WT Zellen, noch in den gerauchten RAGE^{-/-} Zellen konnte ein Unterschied zu den jeweiligen Kontrollzellen festgestellt werden. Die Untersuchung der Claudin 18 Expression ergab jedoch, dass in den RAGE^{-/-} Zellen im Vergleich zu den WT Zellen signifikant weniger Claudin 18 exprimiert wurde. Bei den anderen Tight Junction Proteinen konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden.

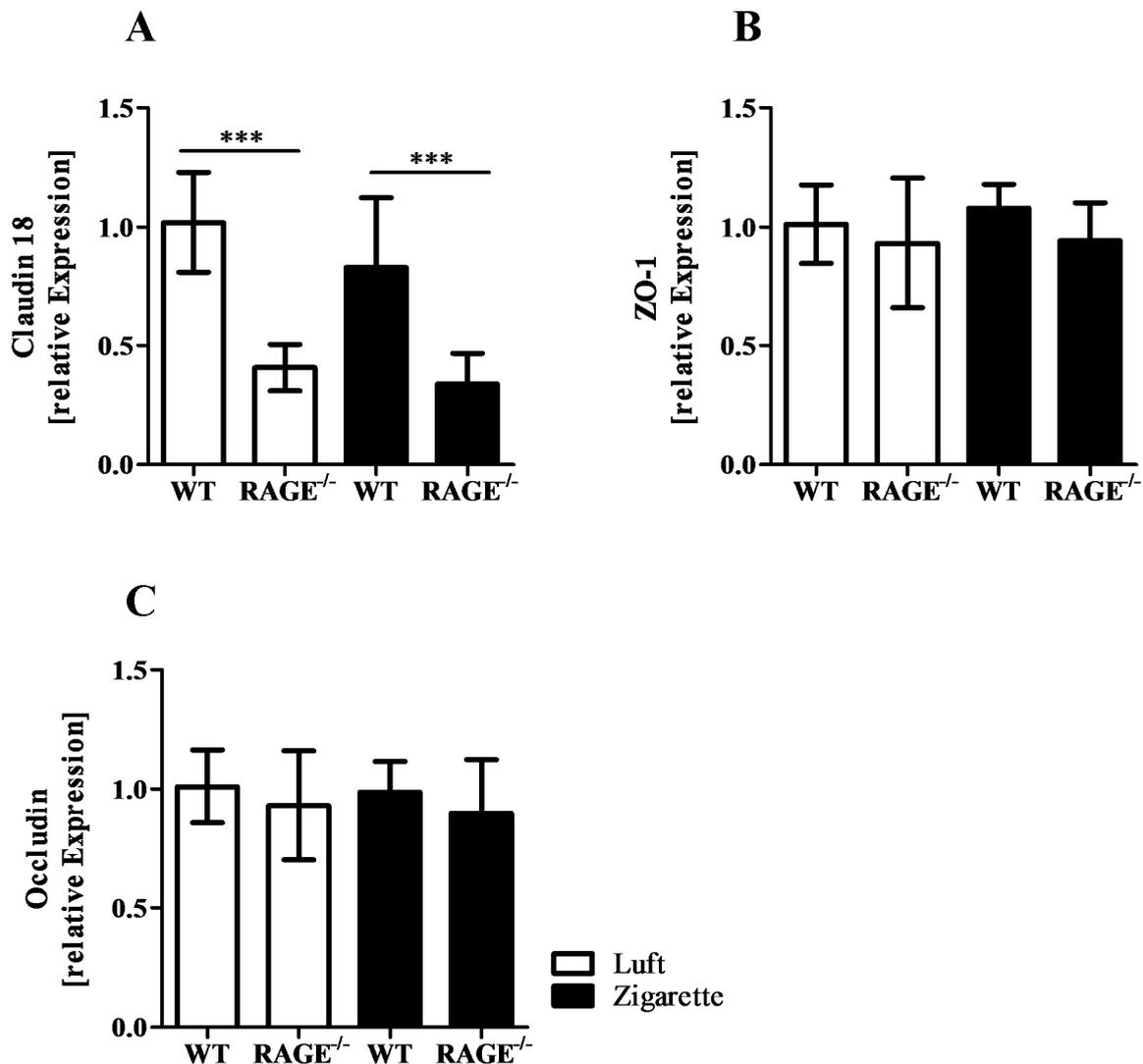


Abbildung 21: Relative Expression der Tight Junction Proteine Claudin 18, ZO-1 und Occludin in WT und RAGE^{-/-} alveolaren Epithelzellen nach Zigarettenrauchexposition. Ausdifferenzierte WT und RAGE^{-/-} alveolare Epithelzellmonolayer wurden für 15 Minuten dem Rauch von drei filterlosen Zigaretten bzw. Raumluft ausgesetzt. 24 Stunden nach der Exposition wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen gewonnen, cDNA synthetisiert und mittels qRT-PCR die Expression verschiedener Tight Junction Proteine analysiert. Relative Expression von (A) Claudin 18, (B) ZO-1 und (C) Occludin normiert auf Raumluft exponierte WT Zellen. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Luft: WT n=7, RAGE^{-/-} n=7; Zigarette: WT n=8, RAGE^{-/-} n=8); mean±SD (Signifikanzniveau: ***p<0,001).

4.3.2. RAGE moduliert inflammatorische Prozesse in primären murinen Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen sind residente Zellen der Lunge, die eine große Rolle in der pulmonalen Immunantwort spielen. Durch die Vielzahl an Immunrezeptoren, die auf ihrer Zelloberfläche, im endosomalen Kompartiment und im Zytosol exprimiert werden, können sie sehr schnell eingeatmete Bakterien oder Viren erkennen und eine inflammatorische Reaktion induzieren, welche die Pathogene unschädlich macht. Dadurch verhindern Alveolarmakrophagen den Übertritt der Krankheitserreger ins Blut und somit eine systemische Inflammation [148, 341].

Um zu untersuchen, welche Funktion RAGE in der Immunantwort der Alveolarmakrophagen übernimmt, wurden primäre Alveolarmakrophagen aus WT und RAGE^{-/-} Mäusen isoliert und unter *ex vivo* Bedingungen analysiert. Die Makrophagen wurden zunächst für 16 Stunden mit IFN γ stimuliert, um eine klassische Aktivierung der Zellen zu erzielen. Im Anschluss wurde mit den TLR Liganden LPS bzw. Pam2CSK4 stimuliert. Diese Vorgehensweise sollte eine Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren induzieren [222]. 24 Stunden nach der Stimulation mit den TLR Liganden wurden die entzündungsfördernden Zytokine TNF α , IL-6 und KC in den Zellüberständen der Alveolarmakrophagen mittels ELISA bestimmt. Die Abbildungen 22A-F zeigen, dass eine alleinige Applikation von IFN γ weder in den WT noch in den RAGE^{-/-} Zellen zu einer Zytokinfreisetzung führte. Durch die Stimulation mit LPS oder Pam2CSK4 kam es in beiden Zellgruppen zu einer Abgabe der Zytokine TNF α (Abb. 22A und B), IL-6 (Abb. 22C und D) und KC (Abb. 22E und F). Ein Unterschied zwischen den WT und RAGE^{-/-} Zellen konnte hierbei allerdings nicht festgestellt werden. Die Aktivierung der Makrophagen mit IFN γ verstärkte die durch LPS oder Pam2CSK4 induzierte Freisetzung von TNF α , IL-6 und KC noch zusätzlich. Zudem zeigte sich, dass RAGE^{-/-} Alveolarmakrophagen durch die kombinierte Stimulation signifikant weniger Zytokine freisetzten als die gleichbehandelten WT Zellen.

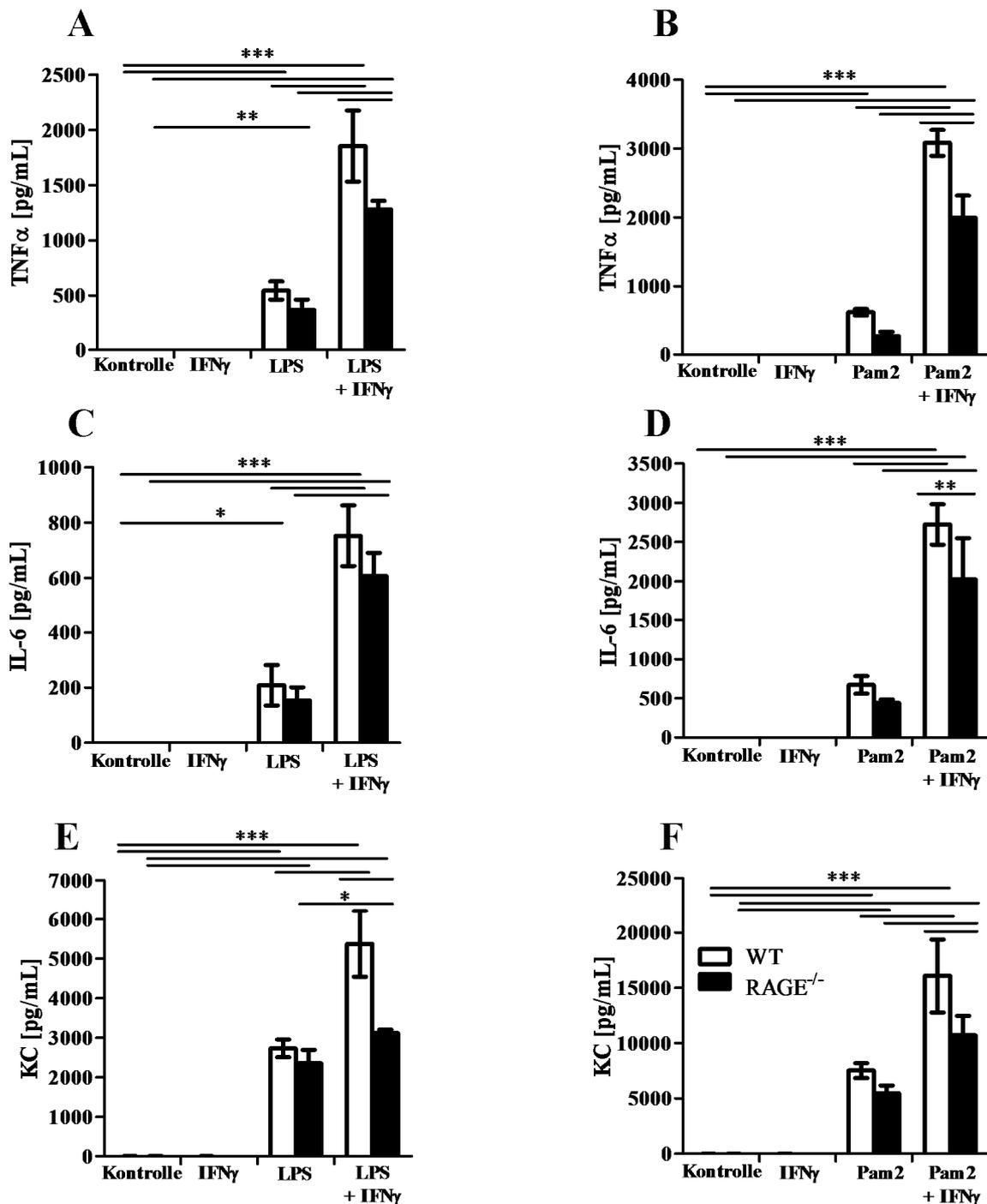


Abbildung 22: Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren TNF α , IL-6 und KC aus WT und RAGE^{-/-} Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit IFN γ und den TLR Liganden LPS und Pam2CSK4. Alveolarmakrophagen wurden aus WT und RAGE^{-/-} Mäusen isoliert und unter *ex vivo* Bedingungen zunächst für 16 Stunden mit IFN γ aktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit LPS bzw. Pam2CSK4 (Pam2) stimuliert und 24 Stunden später die Konzentration von (A) TNF α , (B) IL-6 und (C) KC in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Kontrolle: WT n \geq 3, RAGE^{-/-} n \geq 3; IFN γ : WT n \geq 3, RAGE^{-/-} n=4; LPS bzw. Pam2: WT n=3, RAGE^{-/-} n \geq 4; IFN γ + LPS bzw. Pam2: WT n=5, RAGE^{-/-} n \geq 5; repräsentative Daten für drei unabhängige Versuche); mean \pm SD (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Neben der Zytokinbestimmung wurde zusätzlich analysiert, ob die klassische Stimulation der Alveolarmakrophagen zu einer Produktion von NO führte. Da NO ein sehr instabiles Molekül ist, wurde die Menge an NO_2^- in den Zellüberständen der Alveolarmakrophagen bestimmt. Dabei handelt es sich um ein stabiles und nicht flüchtiges Abbauprodukt von NO, das durch die Verwendung des Griess Reagenz über eine Farbreaktion nachweisbar ist. Aus Abbildung 23 kann entnommen werden, dass lediglich durch die kombinierte Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und einem TLR Liganden eine messbare Menge an NO_2^- bestimmt werden konnte. Eine Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und LPS verursachte in den $\text{RAGE}^{-/-}$ Zellen eine im Vergleich zu den WT Zellen signifikant verringerte Freisetzung von NO_2^- (Abb. 23A). Einen Unterschied zwischen den WT und $\text{RAGE}^{-/-}$ Alveolarmakrophagen konnte bei der kombinierten Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und Pam2CK4 nicht beobachtet werden (Abb. 23B).

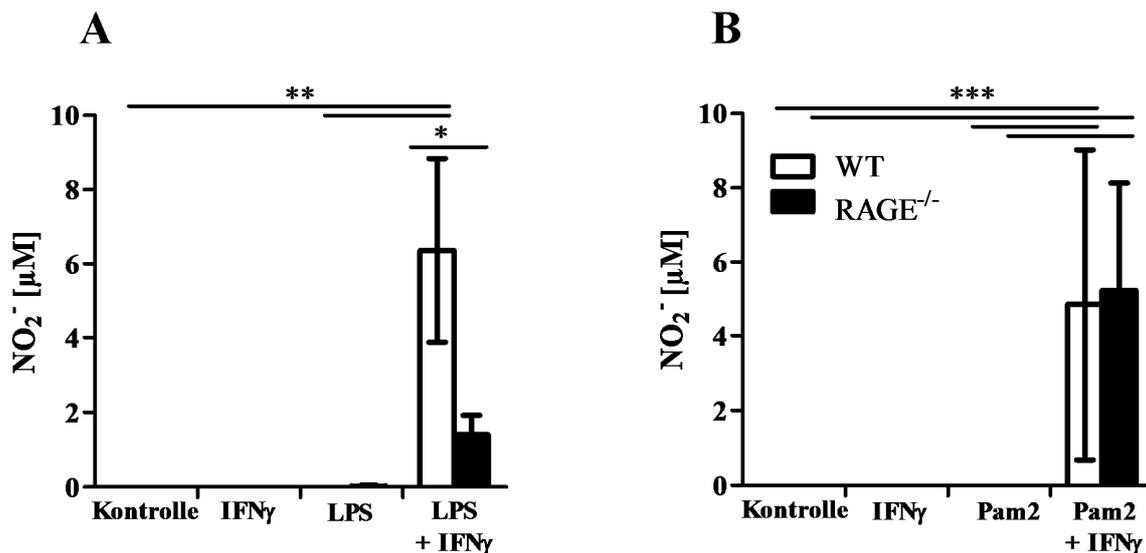


Abbildung 23: Freisetzung von Nitrit (NO_2^-) aus WT und $\text{RAGE}^{-/-}$ Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und den TLR Liganden LPS und Pam2CSK4. Alveolarmakrophagen wurden aus WT und $\text{RAGE}^{-/-}$ Mäusen isoliert und unter *ex vivo* Bedingungen zunächst für 16 Stunden mit $\text{IFN}\gamma$ aktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit LPS bzw. Pam2CSK4 (Pam2) stimuliert und 24 Stunden später die freigesetzte NO_2^- Menge mittels des Griess Reagenz bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Kontrolle: WT n=10, $\text{RAGE}^{-/-}$ n=12; $\text{IFN}\gamma$: WT n=10, $\text{RAGE}^{-/-}$ n=11; LPS bzw. Pam2: WT n \geq 10, $\text{RAGE}^{-/-}$ n \geq 12; $\text{IFN}\gamma$ + LPS bzw. Pam2: WT n \geq 11, $\text{RAGE}^{-/-}$ n \geq 12); mean \pm SD (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Zusätzlich zu der klassischen Aktivierung der Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ und TLR Liganden wurde versucht die Alveolarmakrophagen mit Zigarettenrauchextrakt zu stimulieren. Dazu wurde der Rauch von zwei ungefilterten Zigaretten in 25 mL PBS eingesprudelt und das Extrakt anschließend auf die Zellen gegeben. Allerdings führten weder niedrige Konzentrationen (5%)

noch höhere Konzentrationen (20%) des Zigarettenrauchextraktes zu einer detektierbaren Abgabe von inflammatorischen Mediatoren (Daten nicht gezeigt).

4.4. Funktion des epithelialen Zytokins IL-17C bei einer bakteriell induzierten Entzündung

In einer Reihe von Experimenten wurde die Funktion von IL-17C bei rauchinduzierter Entzündung analysiert. Im akuten Rauchmodell wiesen IL-17C^{-/-} Mäuse jedoch keine zu WT Mäusen unterschiedliche pulmonale Entzündung auf (Daten nicht gezeigt). Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch bei der chronischen Exposition mit Zigarettenrauch. In Hinblick auf einen rauchinduzierten Lungenschaden konnte weder durch invasive Lungenfunktionsmessungen (Abbildung 24) noch durch stereologische Analysen des parenchymalen Gewebes (Daten nicht gezeigt) ein Unterschied zwischen IL-17C^{-/-} und WT Mäusen festgestellt werden.

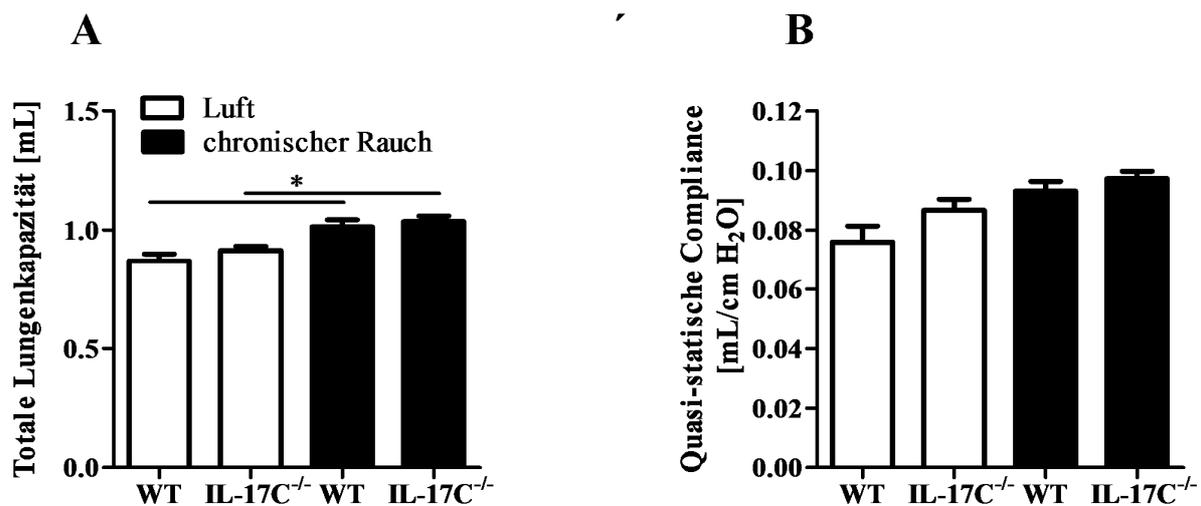


Abbildung 24: Invasive Lungenfunktionsmessung in WT und IL-17C^{-/-} Mäusen zur Detektion eines rauchinduzierten Lungenschadens. WT und IL-17C^{-/-} Mäuse wurden für sechs Monate Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert. 24 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mit Hilfe des FlexiVent-Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. (A) Totale Lungenkapazität. (B) Quasi-statische Compliance (Dehnbarkeit des Lungengewebes). Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: WT n=7, IL-17C^{-/-} n=7; chronischer Rauch: WT n=6, IL-17C^{-/-} n=18); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

In vielen akuten und chronischen Erkrankungen der Lunge spielen neben inhalierten Schadstoffen wie Zigarettenrauch auch mikrobielle Pathogene eine wichtige Rolle. Respiratorische Erkrankungen wie beispielsweise die Zystische Fibrose oder die COPD sind

durch eine chronische Atemwegsinflammation charakterisiert, die durch Bakterien hervorgerufen wird [110, 292]. Eine Patientenstudie ergab zudem, dass im Bronchialepithel von Patienten, die an diesen Krankheiten leiden, IL-17C exprimiert wird [245]. Um die Funktion von IL-17C in bakteriell induzierten pulmonalen Entzündungsprozessen zu untersuchen, wurden Mäuse verwendet, die aufgrund einer vollständigen Deletion des Genes zu keiner IL-17C Expression in der Lage waren.

4.4.1. IL-17C wird von alveolaren Epithelzellen nach bakterieller Stimulation exprimiert

Um herauszufinden, welche Reize für die Induktion einer IL-17C Expression in der Lunge verantwortlich sind, wurden WT und IL-17C^{-/-} Mäuse mit verschiedenen Bakterienspezies oder mit Zigarettenrauch stimuliert. 24 Stunden nach der Vernebelung von hitzeinaktivierten NTHi (Abb. 25A) oder auch nach der Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (Abb. 25B) konnte in den Lungen von WT Mäusen eine signifikante Induktion der IL-17C Expression beobachtet werden. In IL-17C^{-/-} Mäusen war keine IL-17C mRNA nachweisbar. Eine Exposition mit Zigarettenrauch verursachte im Vergleich zu der bakteriellen Stimulation keine Veränderung der pulmonalen IL-17C Expression (Abb. 25C). Dies zeigt, dass ein bakterieller Reiz benötigt wird, um eine Expression von IL-17C im Lungengewebe zu induzieren.

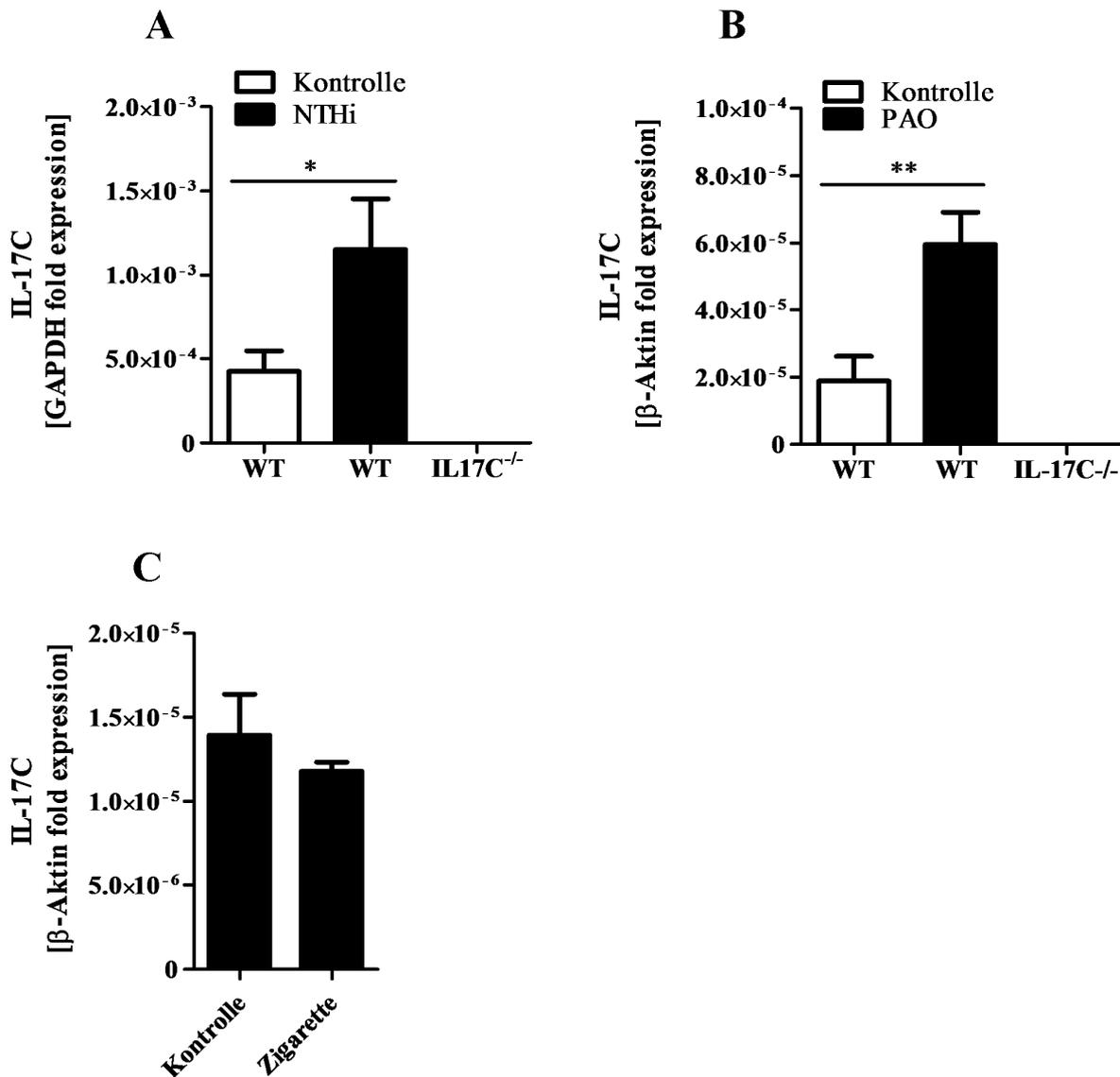


Abbildung 25: Zur Induktion einer pulmonalen IL-17C Expression wird ein bakterieller Reiz benötigt. WT und IL-17C^{-/-} Mäuse wurden (A) vernebelten NTHi-Lysaten exponiert (WT Kontrolle n=6; WT NTHi n=6; IL-17C^{-/-} NTHi n=6), (B) mit lebendigen PAO1 infiziert (WT Kontrolle n=6; WT PAO n=7; IL-17C^{-/-} n=5) oder (C) akutem Zigarettenrauch exponiert (WT Kontrolle n=6; WT Zigarette n=5). 24 Stunden nach der jeweiligen Behandlung wurde die Gesamt-RNA aus den Mauslungen gewonnen, cDNA synthetisiert und die IL-17C Expression mit qRT-PCR analysiert. Statistik: Mann-Whitney-Test zwischen den WT Gruppen; mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01).

Um zu untersuchen welche Zelltypen für die pulmonale IL-17C Expression verantwortlich sind, wurden alveolare Epithelzellen und Alveolarmakrophagen aus WT Mäusen isoliert und *in vitro* mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* stimuliert. Abbildung 26A zeigt, dass eine bakterielle Stimulation der alveolaren Epithelzellen zu einer signifikant verstärkten IL-17C Expression

fürte. In den Alveolarmakrophagen konnte hingegen weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand IL-17C mRNA festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde analysiert, ob die beiden Zelltypen zu einer Expression der Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE in der Lage sind. Bei den beiden Rezeptoren handelt es sich um Proteine, die für die IL-17C Signalweiterleitung von essentieller Bedeutung sind [46, 255, 303]. Die Untersuchung ergab, dass nicht nur in alveolaren Epithelzellen (Abb. 26B) sondern auch in Alveolarmakrophagen (Abb. 26C) eine Expression der Rezeptoren vorliegt. In beiden Zelltypen ist der IL-17RA in einem deutlich höheren Maße exprimiert als der IL-17RE.

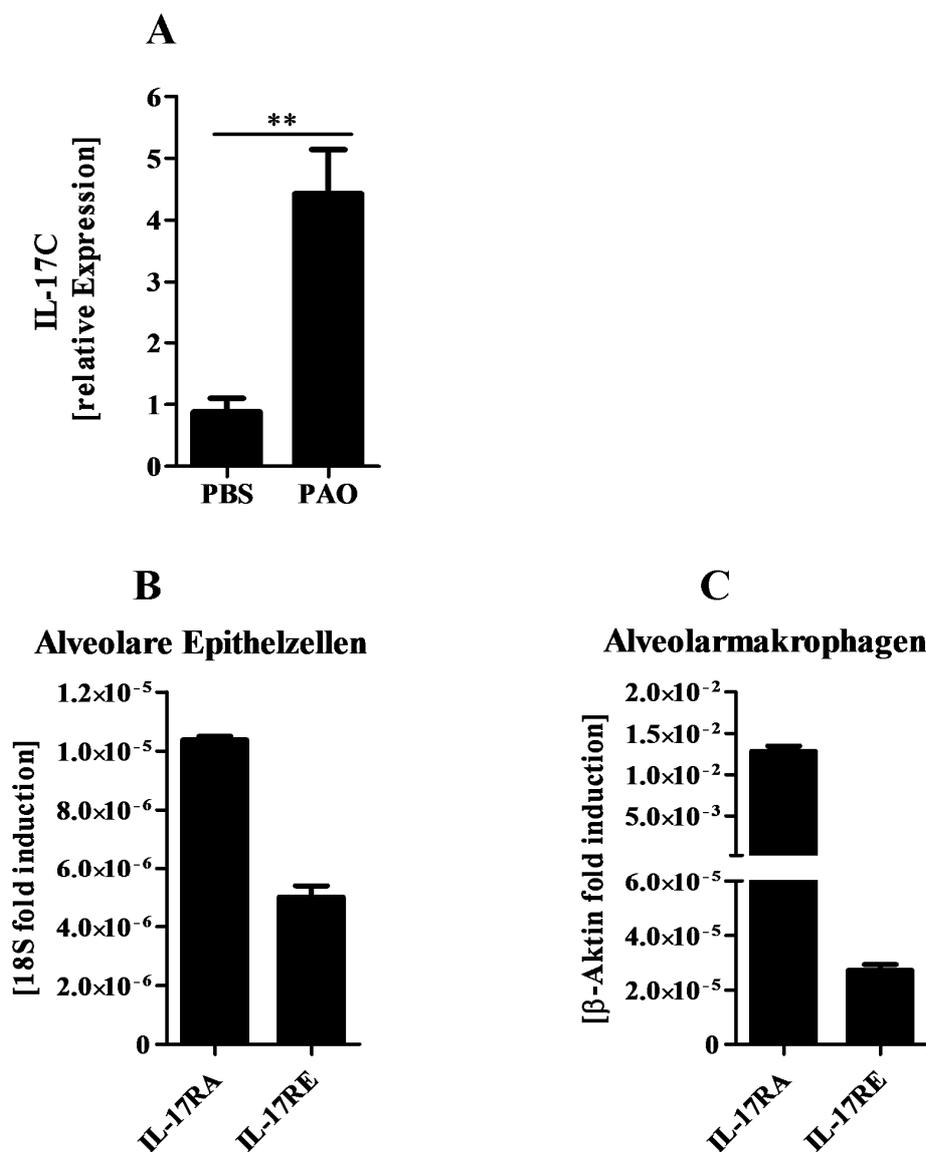


Abbildung 26: Expression von IL-17C und den IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE in alveolaren Epithelzellen und Alveolarmakrophagen. Aus den isolierten Zellen wurde die Gesamt-RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und die mRNA Expression mittels qRT-PCR analysiert. (A) IL-17C Expression in alveolaren

Epithelzellen nach Stimulation mit hitzeinaktivierten PAO1 (PBS n=3; PAO n=4). Statistik: Mann-Whitney-Test; mean±SEM (Signifikanzniveau: **p<0,01). Expression der IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE in (B) alveolaren Epithelzellen (jeweils n= 3) und (C) in Alveolarmakrophagen (jeweils n=6); mean±SEM.

4.4.2. IL-17C vermittelt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einer *P. aeruginosa* Pneumonie

Da eine Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* eine Expression des epithelialen IL-17C im pulmonalen Gewebe induzieren kann, wurde im Folgenden untersucht, welche Funktion IL-17C in einer durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen Pneumonie übernimmt. Hierzu wurden WT und IL-17C^{-/-} Mäuse intranasal mit lebendigen *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 oder mit PBS als Kontrolle infiziert und 24 Stunden später in Hinblick auf verschiedene Entzündungsparameter analysiert.

WT und IL-17C^{-/-} Kontrollmäuse zeigten in ihren Lungen keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl und Zusammensetzung der Entzündungszellen (Abb. 27A-D). Eine intranasale Applikation von lebendigen PAO1 verursachte in WT und IL-17C^{-/-} Mäusen einen starken Einstrom von Entzündungszellen, der jedoch in den IL-17C^{-/-} Mäusen signifikant geringer ausfiel (Abb. 27A). Die Differenzierung der Entzündungszellen in die unterschiedlichen Subtypen ergab, dass die PAO1 Infektion zu einer neutrophilen Granulozyten-dominierten Entzündung führte. Die Anzahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten war in den infizierten IL-17C^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen jedoch signifikant verringert (Abb. 27B). Bei den Makrophagen (Abb. 27C) und Lymphozyten (Abb. 27D) konnten keine Unterschiede zwischen den infizierten Mausstämmen beobachtet werden.

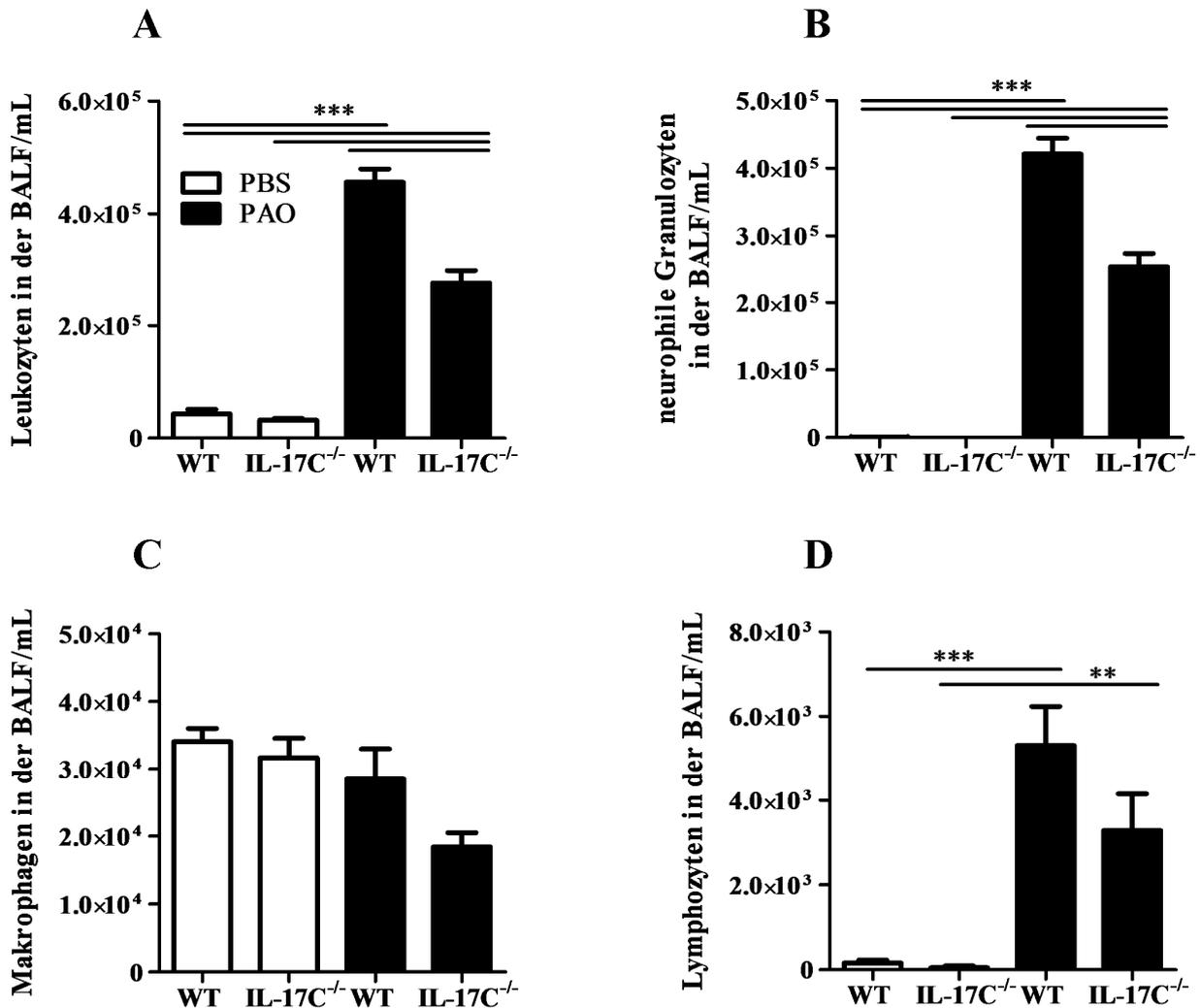


Abbildung 27: Leukozyten in der BALF von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa*. WT und IL-17C^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit lebendigen *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (CFU: 4×10⁶-6×10⁶) oder PBS als Kontrolle infiziert. 24 Stunden später wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Anfertigen von Cytospin-Präparaten wurden die einzelnen Leukozytensubtypen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Gesamtzahl der Leukozyten in der BALF. (B) Anzahl der neutrophilen Granulozyten, (C) Makrophagen und (D) Lymphozyten im Differentialzellbild. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: WT n=6, IL-17C^{-/-} n=6; PAO: WT n=12, IL-17C^{-/-} n=9); mean±SEM (Signifikanzniveau: **p<0,01; ***p<0,001).

Des Weiteren wurden die Konzentrationen von verschiedenen proinflammatorischen Botenstoffen im Lungengewebe der Mäuse durch ELISA Messungen bestimmt (Abb. 28). In den IL-17C^{-/-} Mäusen konnte 24 Stunden nach der bakteriellen Infektion eine im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant verringerte Konzentration des Chemokines KC festgestellt werden (Abb. 28A). Die Konzentrationen an MIP-2 (Abb. 28B), IL-17A (Abb. 28C), TNFα (Abb. 28D) und IL-6 (Abb. 28E) waren von der IL-17C Defizienz nicht signifikant beeinflusst.

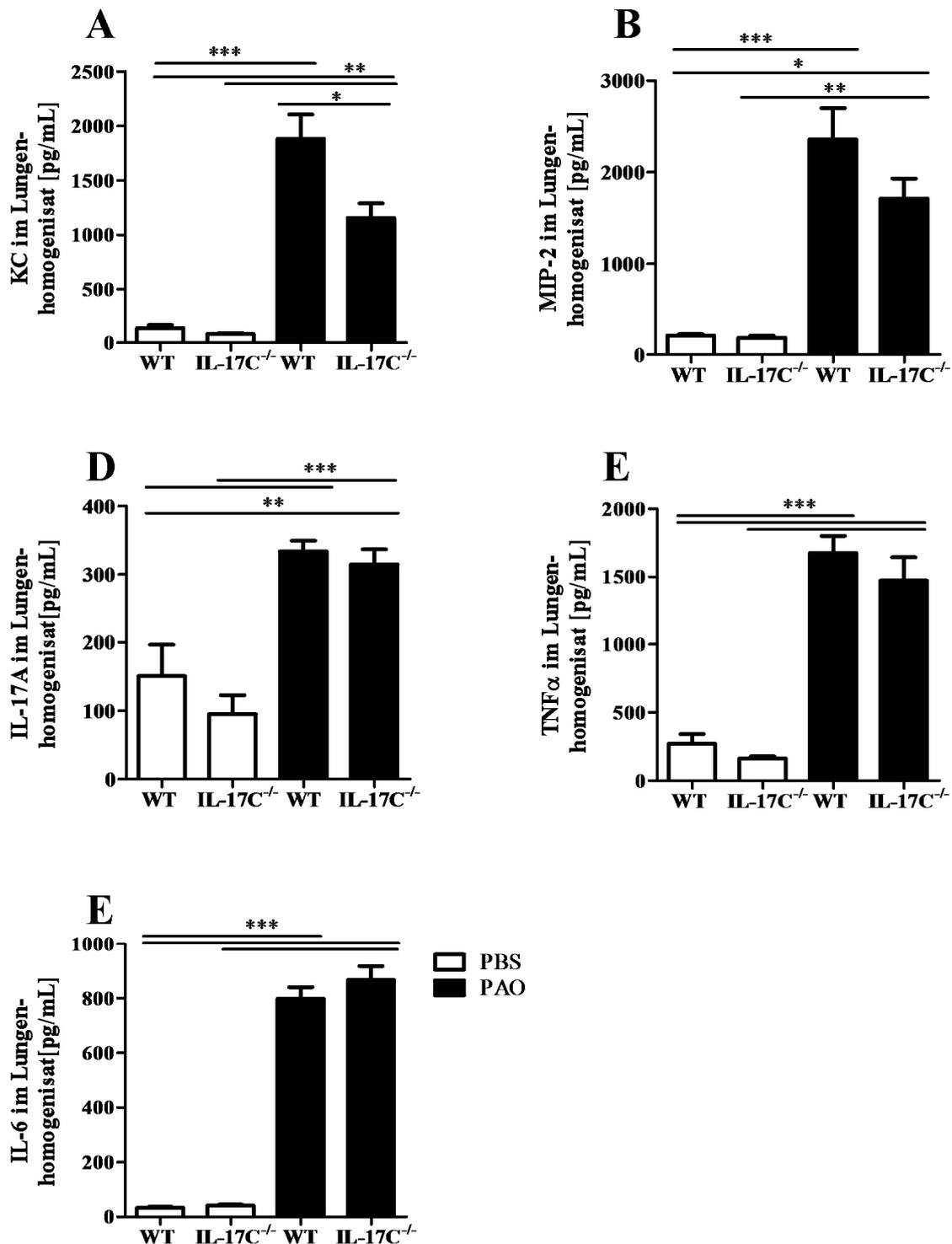


Abbildung 28: Konzentrationen der proinflammatorischen Mediatoren KC, MIP-2, IL-17A, TNF α und IL-6 im Lungenhomogenisat von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa*. 24 Stunden nach der intranasalen Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 wurde im Lungenhomogenisat von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen die Konzentrationen an (A) KC, (B) MIP-2, (C) IL-17A, (D) TNF α und (E) IL-6 mittels ELISA bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: WT n \geq 3, IL-17C^{-/-} n \geq 3; PAO: WT n \geq 12, IL-17C^{-/-} n \geq 9); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Expressionsanalysen, die mittels qRT-PCR durchgeführt wurden, zeigten zudem eine signifikant verringerte Induktion von KC (Abb. 29A), MIP-2 (Abb. 29B) und dem antimikrobiellen Peptid CRAMP (Abb. 29C) im Lungengewebe von infizierten IL-17C^{-/-} Mäusen.

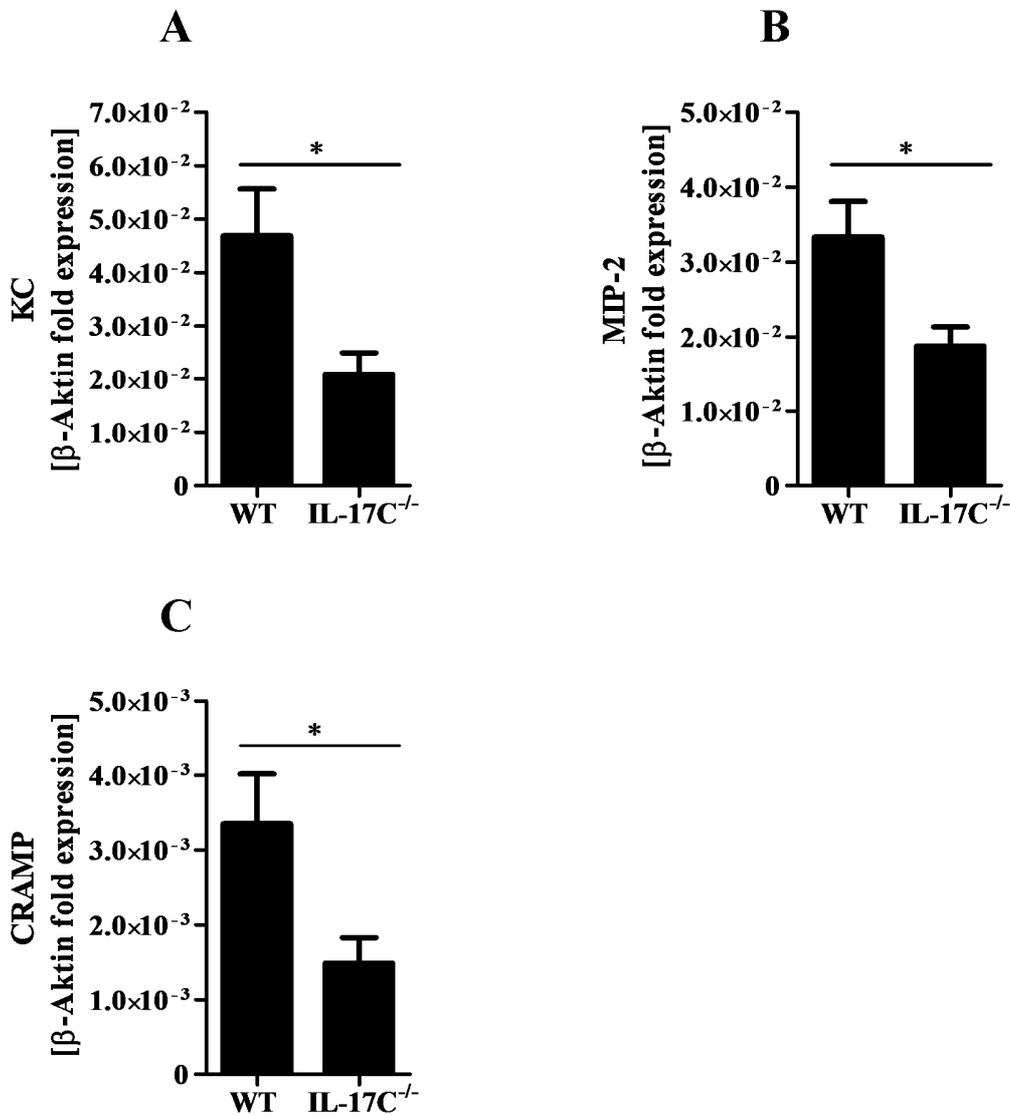


Abbildung 29: Pulmonale Expression von KC, MIP-2 und CRAMP in WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa*. 24 Stunden nach der intranasalen Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 wurde aus den Lungen von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen die Gesamt-RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und die Expression von (A) KC, (B) MIP-2 und (C) CRAMP analysiert. Statistik: Mann-Whitney-Test (WT n= 7; IL-17C^{-/-} n=5); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

4.4.3. IL-17C fördert die Ausbildung einer systemischen Entzündung während einer *P. aeruginosa* Pneumonie

WT und IL-17C^{-/-} Mäuse zeigten keine Unterschiede in Hinblick auf die Anzahl an lebendigen Bakterien, die 24 Stunden nach der Infektion aus den Lungen der Mäuse gewonnen werden konnten (Abb. 30A). Dies zeigt, dass die Klärung der Bakterien durch die Defizienz von IL-17C nicht beeinflusst wurde. Aus den Abbildungen 30B und 30C kann zudem entnommen werden, dass eine IL-17C Defizienz keine Auswirkung auf die durch inflammatorische Prozesse erzeugte Lungenpathologie hatte. Zwar erweckte die Histologie des Lungengewebes den Eindruck, dass in den IL-17C^{-/-} Mäusen verglichen mit den WT Mäusen fokal weniger Infiltrate vorhanden waren und diese auch nicht so stark ausgeprägt waren (Abb. 30B), jedoch ergab die systematische Bewertung des Gewebes hinsichtlich inflammatorischer Parameter keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen (Abb. 30C).

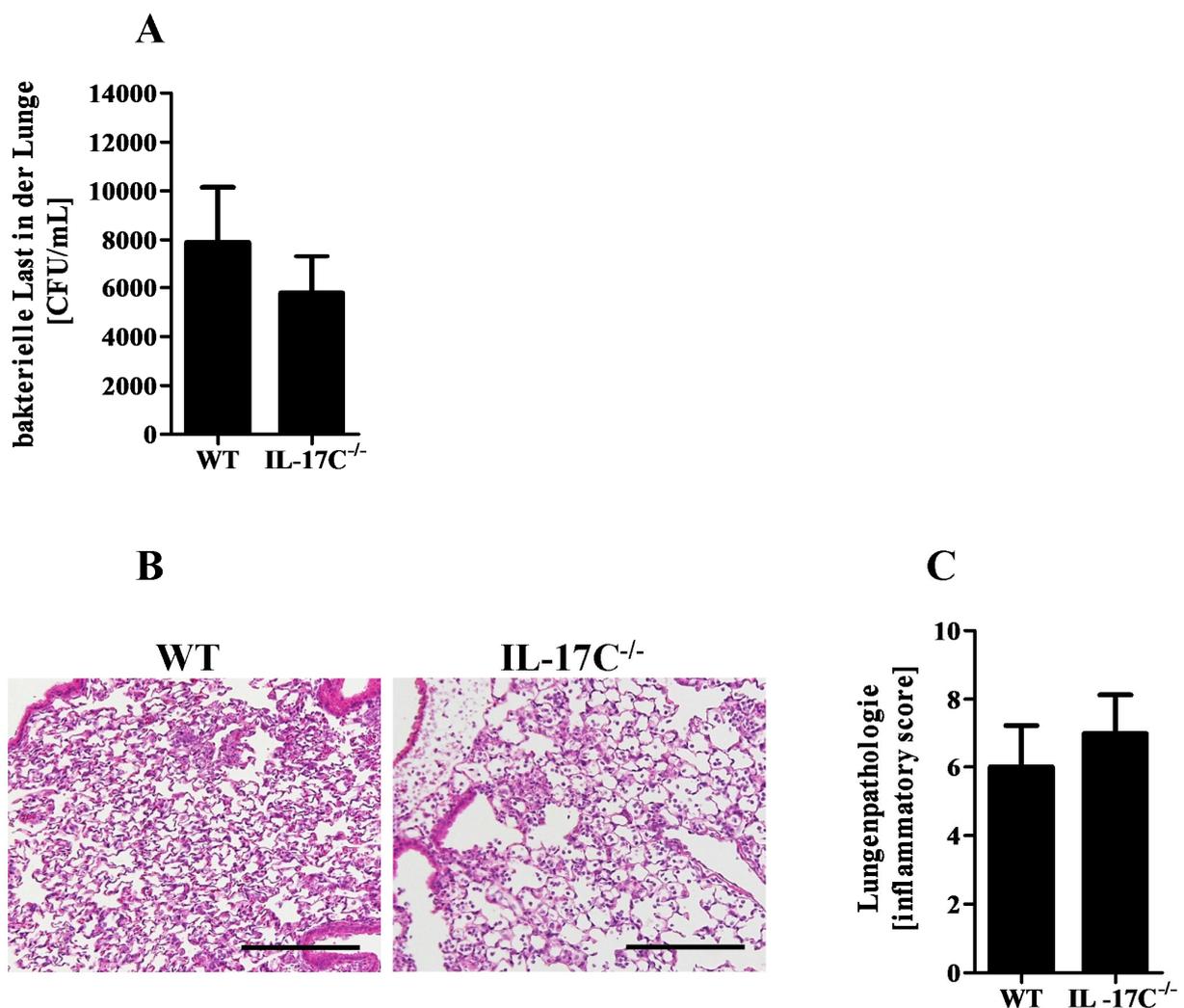


Abbildung 30: Bestimmung der bakteriellen Klärung und der Lungenpathologie in WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa*. (A) Die bakterielle Last in den WT und IL-17C^{-/-} Mäusen wurde 24 Stunden nach der intranasalen Infektion mit *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 durch Ausplattieren von Lungenhomogenisat auf Agarplatten und Auszählen der CFU (colony forming units) bestimmt (WT n=11; IL-17C^{-/-} n=9). Zur inflammatorischen Bewertung der Lungenpathologie wurden die Lungen der Mäuse 24 Stunden nach der Infektion mit 4% Formaldehyd fixiert, Gewebeschnitte angefertigt und die pathologischen Gegebenheiten lichtmikroskopisch evaluiert. (B) Repräsentative Histologie (Hämalaun-Eosin-Färbung) von infizierten WT und IL-17C^{-/-} Mäusen. Scale bar: 200µm. (C) Lungenpathologie (WT n=10; IL-17C^{-/-} n=9); mean±SEM.

Um herauszufinden, ob eine IL-17C Defizienz auch die systemischen Zytokinkonzentrationen während einer bakteriellen Pneumonie beeinflusst, wurde das Plasma von infizierten Mäusen analysiert. Es zeigte sich, dass in IL-17C^{-/-} Mäusen 24 Stunden nach der Infektion mit *P. aeruginosa* signifikant geringere Konzentrationen an IL-6 vorhanden waren als in den ebenfalls infizierten WT Mäusen (Abb. 31A). Die Plasmakonzentrationen von TNF α lagen in beiden Mausstämmen unterhalb der Detektionsgrenze von 31 pg/mL und sind aus diesem Grund hier graphisch nicht aufgeführt. Da eine systemische Entzündung ein typisches Kennzeichen einer schweren nosokomial erworbenen Pneumonie ist und diese im längeren Verlauf auch zum Tod des Patienten führen kann, wurde der Einfluss einer IL-17C Defizienz auf die Überlebensrate nach einer *P. aeruginosa* Infektion analysiert. Dazu bekamen WT und IL-17C^{-/-} Mäuse intranasal lebendige PAO1 verabreicht und wurden für 48 Stunden überwacht. Es zeigte sich, dass die Infektion in den WT Mäusen zu einer deutlich höheren Sterberate führte und lediglich 25% der Mäuse die 48 Stunden überlebten. Bei den IL-17C^{-/-} Mäusen lag die Überlebensrate bei 100% (Abb. 31B).

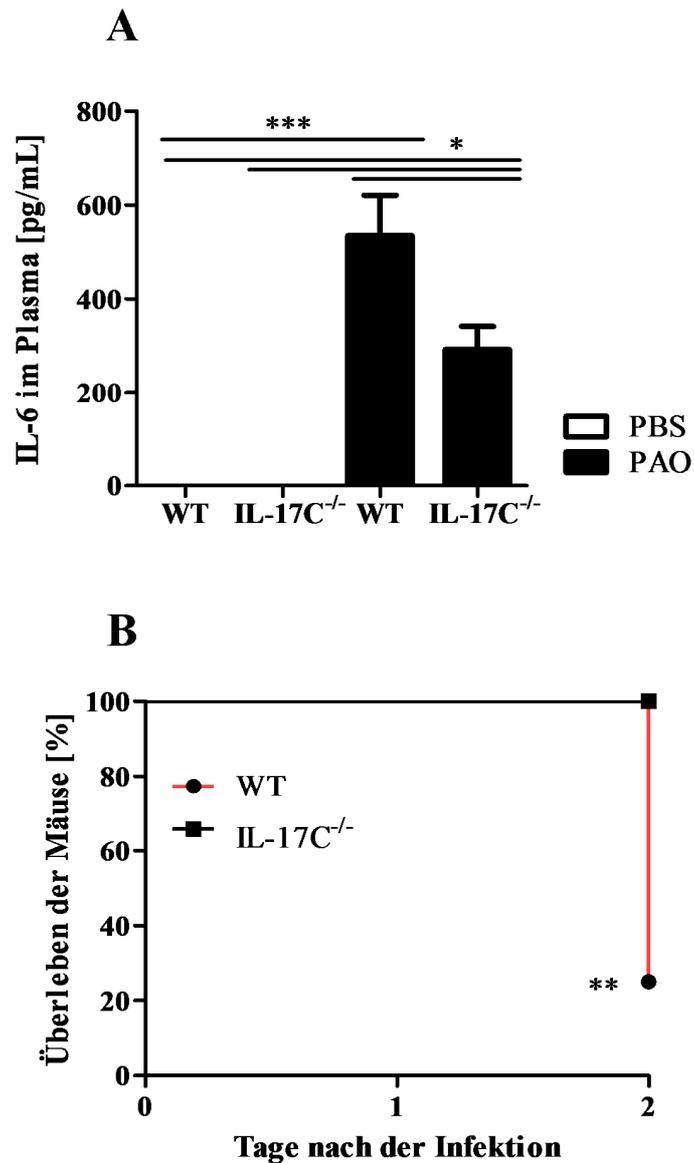


Abbildung 31: IL-6 Konzentrationen im Plasma und Überlebensrate von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa*. (A) 24 Stunden nach einer intranasalen Infektion mit *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 wurde die IL-6 Konzentration im Plasma von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: WT n=5, IL-17C^{-/-} n=6; PAO: WT n=7, IL-17C^{-/-} n=8) (B) Überlebensrate von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen 48 Stunden nach einer Infektion mit *P. aeruginosa*. Statistik: Log-rank Test (Mantel Cox Test) (jeweils n=8 pro Gruppe); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.4.4. IL-17C vermittelt eine pulmonale Inflammation unabhängig von der Lebensfähigkeit der Bakterien

Da es keinen Unterschied in der Anzahl der lebendigen Bakterien gab, die aus den Lungen von infizierten WT und IL-17C^{-/-} Mäusen gewonnen werden konnten, wurde im nächsten Schritt die Beteiligung von IL-17C an einer pulmonalen Inflammation unabhängig von der Lebensfähigkeit der Bakterien analysiert. Dazu wurden den Mäusen intranasal hitzeinaktivierte *P. aeruginosa* verabreicht und 24 Stunden später in Hinblick auf das Entzündungsgeschehen untersucht. In beiden Mausstämmen nahm die Anzahl der Leukozyten durch die Stimulation mit den inaktivierten Bakterien deutlich zu. Im Vergleich zu den WT Mäusen war der Zelleinstrom in den IL17C^{-/-} Mäusen allerdings signifikant verringert (Abb.32A). Diese Beobachtung konnte auf eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die IL-17C-defizienten Lungen zurückgeführt werden (Abb. 32B). Makrophagen (Abb. 32C) und Lymphozyten (Abb. 32D) wanderten durch die Stimulation ebenfalls in die Lungen ein. Die Anzahl der rekrutierten Makrophagen und Lymphozyten war jedoch im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten deutlich geringer und zudem konnten bei diesen Zelltypen keine Unterschiede zwischen den WT und den IL-17C^{-/-} Mäusen festgestellt werden.

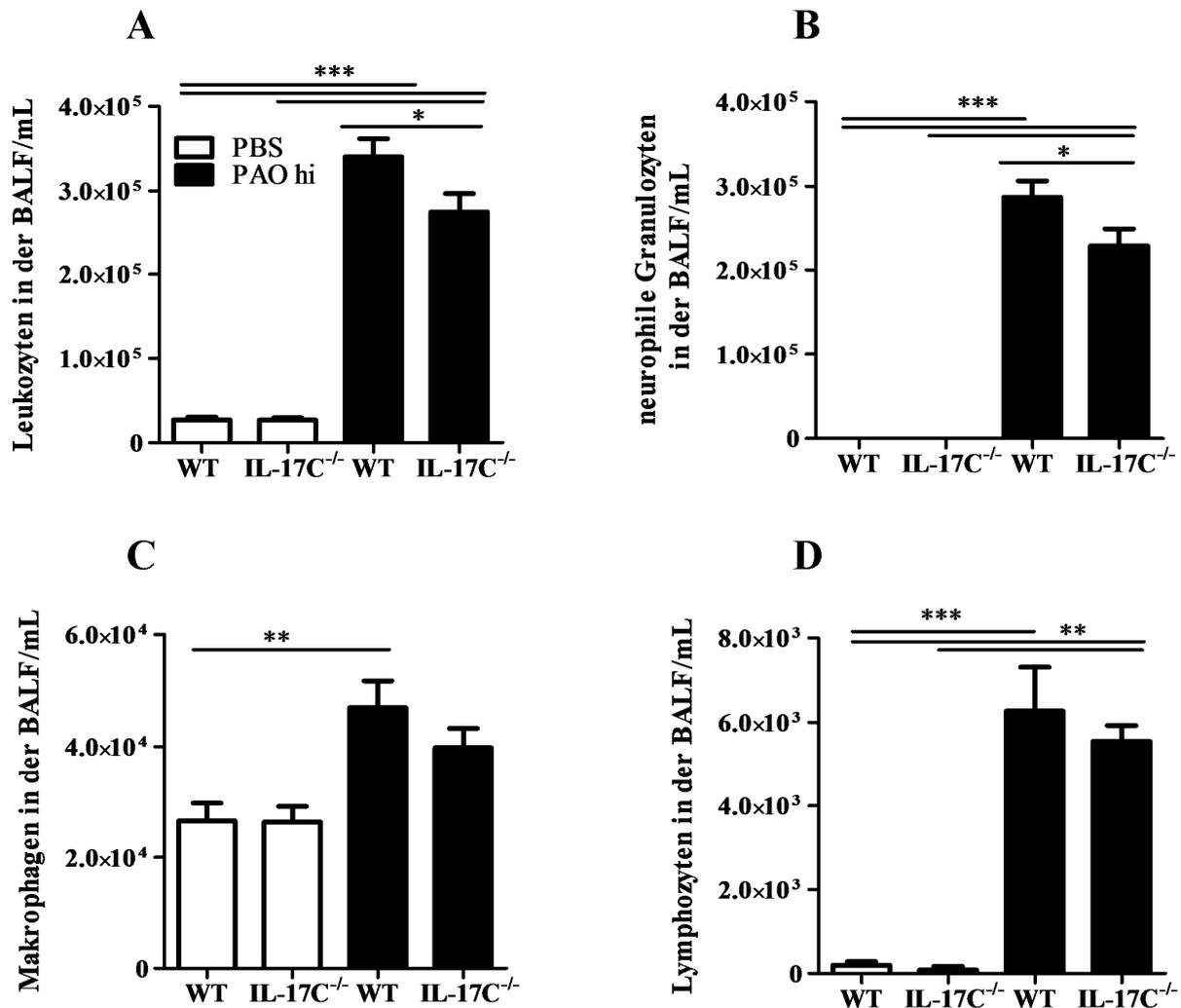


Abbildung 32: Leukozyten in der BALF von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*. WT und IL-17C^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (PAO hi) (CFU: 4x10⁶-6x10⁶) oder PBS als Kontrolle stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Anfertigen von Cytospin-Präparaten wurden die einzelnen Leukozytensubtypen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Gesamtzahl der Leukozyten in der BALF. (B) Anzahl der neutrophilen Granulozyten, (C) Makrophagen und (D) Lymphozyten im Differentialzellbild. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: WT n=9, IL-17C^{-/-} n=10; PAO hi: WT n=10, IL-17C^{-/-} n=8); mean±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Neben den Entzündungszellen wurden die Mäuse auch in Hinblick auf inflammatorische Botenstoffe untersucht. Durch die Stimulation mit den hitzeinaktivierten Bakterien wurden in beiden Mausstämmen signifikant mehr Zytokine und Chemokine freigesetzt als in den jeweiligen Kontrollmäusen (Abb. 33). In der BALF (Abb. 33A) und im Lungenhomogenisat (Abb. 33B) von infizierten IL-17C^{-/-} Mäusen konnten verglichen mit den WT Mäusen signifikant bzw. tendenziell

geringere Konzentrationen des Chemokines KC detektiert werden. Eine unterschiedliche Freisetzung von MIP-2 (Abb. 33C und 33D) und IL-17A (Abb. 33E) in den Lungen der WT und IL-17C^{-/-} Mäusen konnte nicht beobachtet werden.

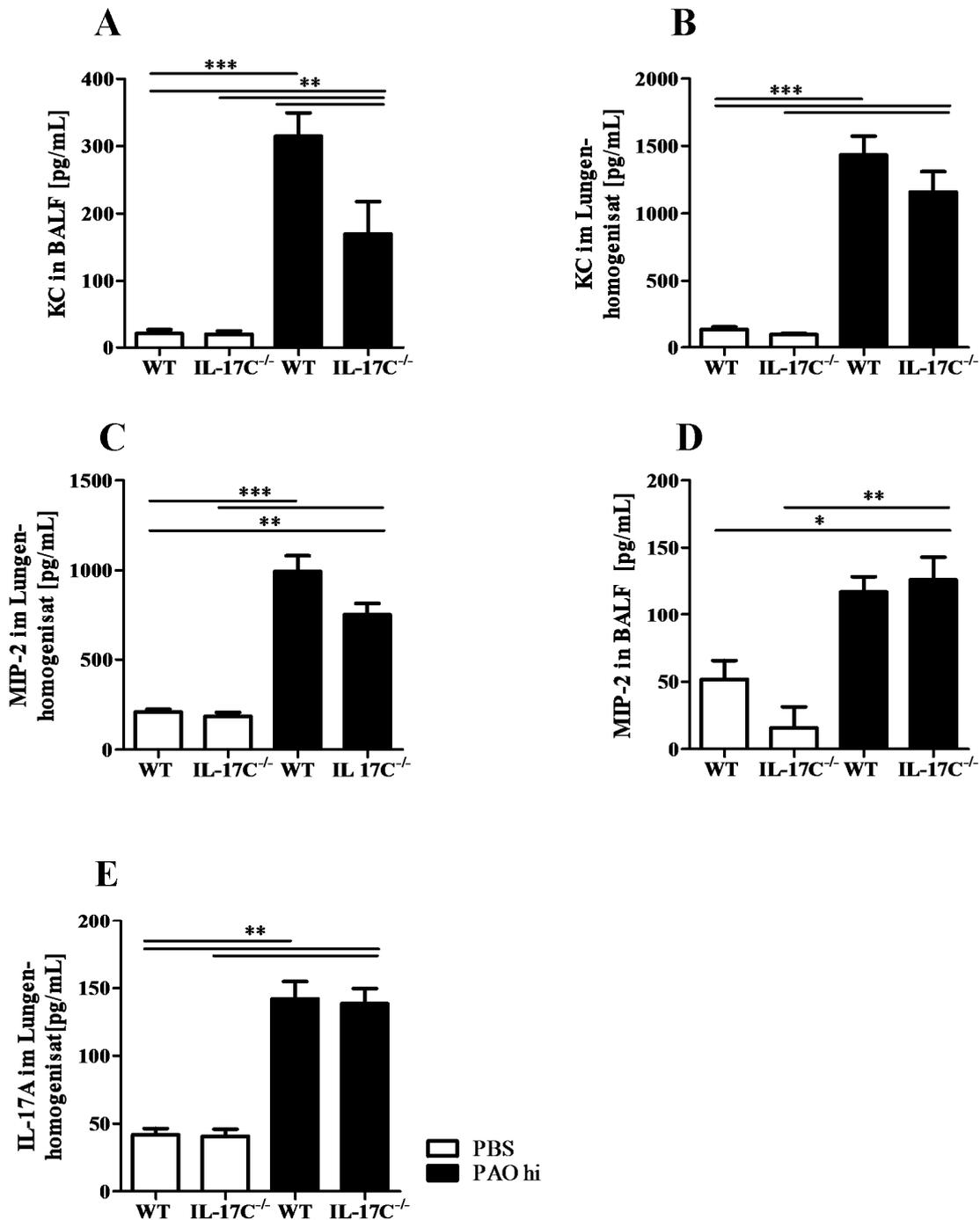


Abbildung 33: Konzentrationen der proinflammatorischen Mediatoren KC, MIP-2 und IL-17A in den Lungen von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*. 24 Stunden nach der intranasalen Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (PAO hi) oder PBS wurde die KC Konzentration in der BALF (A) und im Lungenhomogenisat (B) mittels ELISA bestimmt. Ebenso

wurden die Konzentrationen von MIP-2 in der BALF (C) und im Lungenhomogenisat (D) sowie die Konzentration von IL-17A im Lungenhomogenisat (E) untersucht. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: WT $n \geq 3$, IL-17C^{-/-} $n \geq 3$; PAO hi: WT $n \geq 9$, IL-17C^{-/-} $n \geq 7$); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Eine Expressionsanalyse auf mRNA Ebene ergab zudem, dass in infizierten IL-17C^{-/-} Mäusen signifikant weniger KC (Abb. 34A) und MIP-2 (Abb. 34B) vorhanden ist als in den WT Mäusen.

Eine Beeinflussung der CRAMP Expression durch die IL-17C Defizienz konnte nicht verzeichnet werden (Abb. 34C).

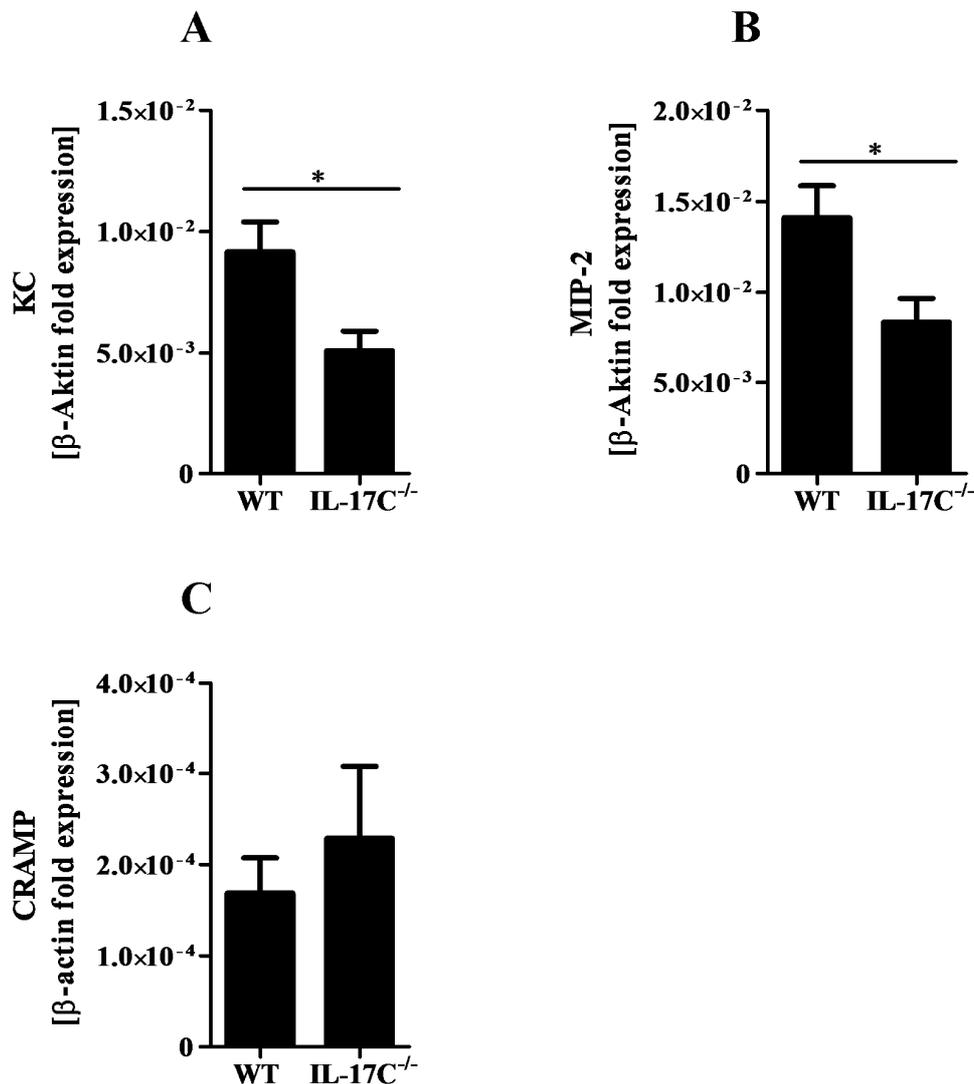


Abbildung 34: Pulmonale Expression von KC, MIP-2 und CRAMP in WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach einer intranasalen Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*. 24 Stunden nach der intranasalen Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 wurde aus den Lungen von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen die Gesamt-RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und die Expression von (A) KC, (B) MIP-2 und (C) CRAMP analysiert. Statistik: Student's t-Test; zweiseitig (WT $n = 10$; IL-17C^{-/-} $n = 8$); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

4.4.5. IL-17C vermittelt die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokinen in alveolaren Epithelzellen

Alveolare Epithelzellen sind, anders als Alveolarmakrophagen, in der Lage IL-17C nach bakterieller Stimulation zu exprimieren. Zudem besitzen die Zellen die IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE, wodurch eine autokrine Stimulation der Zellen möglich ist. Um herauszufinden, welche Funktion IL-17C in diesen Zellen bei einer bakteriellen Stimulation übernimmt, wurden alveolare Epithelzellen zunächst aus murinem Lungengewebe isoliert, unter *ex vivo* Bedingungen polarisiert und anschließend mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 stimuliert. Die Applikation der inaktivierten Bakterien führte zu einer vermehrten Freisetzung der beiden neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokine KC (Abb. 35A) und MIP-2 (Abb. 35B). Wurden die alveolaren Epithelzellen zusätzlich mit rekombinantem IL-17C stimuliert, so zeigte sich, dass IL-17C die durch *P. aeruginosa* induzierte Freisetzung des Chemokines KC noch zusätzlich signifikant verstärken kann (Abb. 35A).

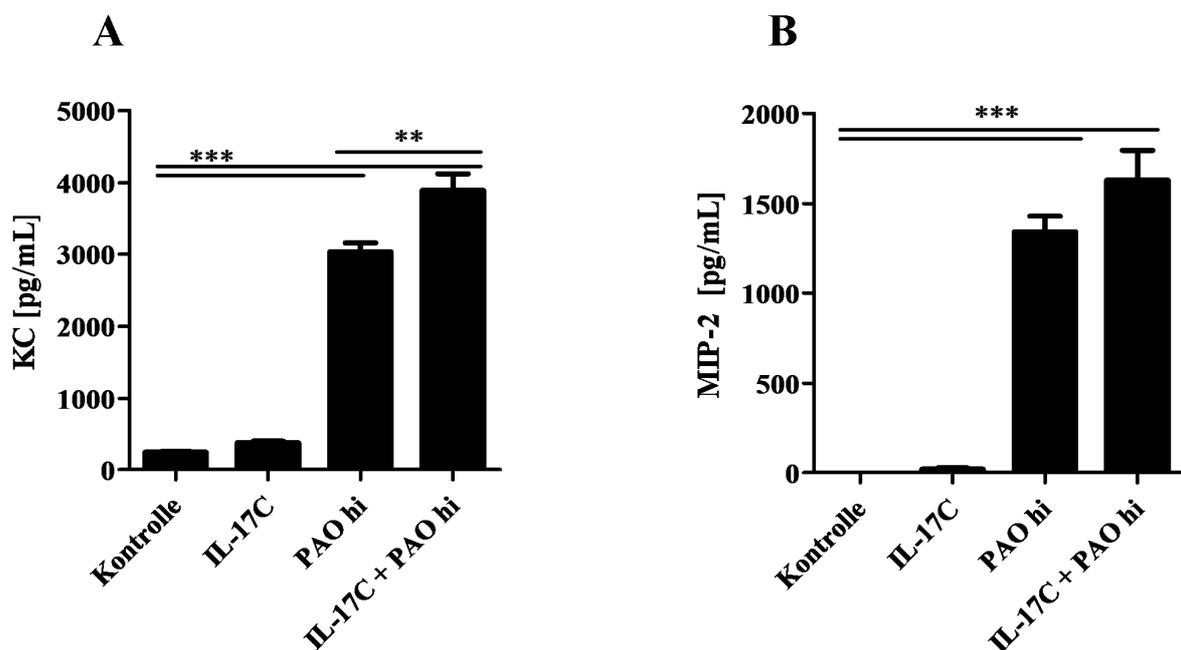


Abbildung 35: Freisetzung der Chemokine KC und MIP-2 aus primären murinen alveolaren Epithelzellen nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* und IL-17C. Murine alveolare Epithelzellen wurden aus den Lungen von WT Mäusen isoliert, unter *ex vivo* Bedingungen polarisiert und mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (PAO hi), rekombinantem IL-17C oder einer Kombination aus beiden Stimulantien stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Konzentrationen an KC (A) und MIP-2 (B) im Kulturmedium mittels ELISA bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Kontrolle n=4; IL-17C n=4; PAO hi n=4; IL-17C + PAO hi n=5); mean±SD (Statistikkniveau: **p<0,01; ***p<0,001).

Da die *in vivo* Daten zeigten, dass eine IL-17C Defizienz die *P. aeruginosa* induzierte pulmonale Freisetzung von TNF α und IL-17A nicht beeinflusst, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der beiden Zytokine auf die IL-17C Expression analysiert. Hierzu wurden polarisierte murine alveolare Epithelzellmonolayer mit TNF α , IL-17A und der Kombination der beiden Zytokine stimuliert (Abb. 36). Während die Applikation von 10 ng/mL und 100 ng/mL IL-17A zu einer deutlichen Induktion der IL-17C Expression führte, verursachte die alleinige Gabe von TNF α keine signifikante Veränderung der detektierbaren IL-17C mRNA. Durch die kombinierte Stimulation zeigte sich allerdings, dass TNF α die durch IL-17A induzierte IL-17C Expression noch zusätzlich signifikant verstärken kann.

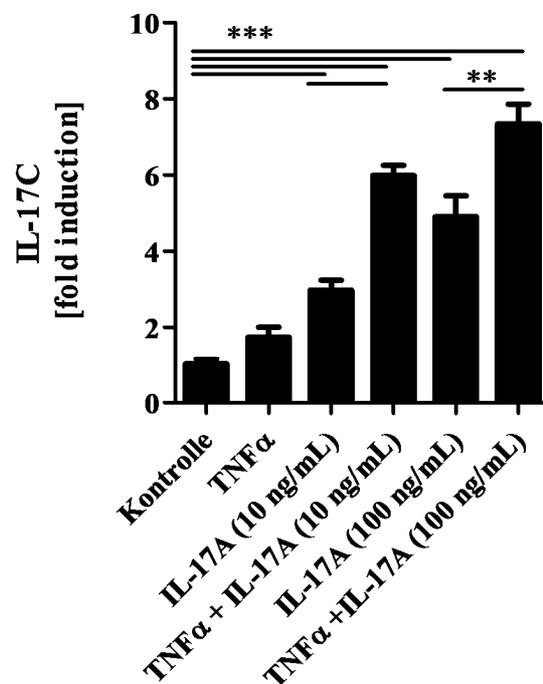


Abbildung 36: Relative Expression von IL-17C nach einer Stimulation mit TNF α und IL-17A in murinen primären alveolaren Epithelzellen. Murine alveolare Epithelzellen wurden aus den Lungen von WT Mäusen isoliert, unter *ex vivo* Bedingungen polarisiert und mit TNF α und unterschiedlichen Konzentrationen an IL-17A (10 ng/mL und 100 ng/mL) stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen gewonnen, cDNA synthetisiert und die relative IL-17C Expression normiert auf die unbehandelten Kontrollen bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Kontrolle n=5; TNF α n=6; IL-17A (10 ng/mL) n=7; TNF α + IL-17A (10 ng/mL) n=7; IL-17A (100 ng/mL) n=7; TNF α + IL-17A (100 ng/mL) n=7); mean \pm SD (Statistikkniveau: **p<0,01; ***p<0,001).

Die Freisetzung der neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokine KC (Abb. 37A) und MIP-2 (Abb. 37B) wurde durch die Stimulation mit IL-17A und TNF α ebenfalls moduliert. Während die alveolaren Epithelzellen auf die Applikation von IL-17A mit einer starken Abgabe

von KC und MIP-2 reagierten, führte die Stimulation mit TNF α zu keiner messbaren Konzentrationszunahme. Die Abbildungen 37A und 37B zeigen jedoch, dass TNF α die durch IL-17A induzierte Freisetzung der beiden Chemokine signifikant verstärken kann.

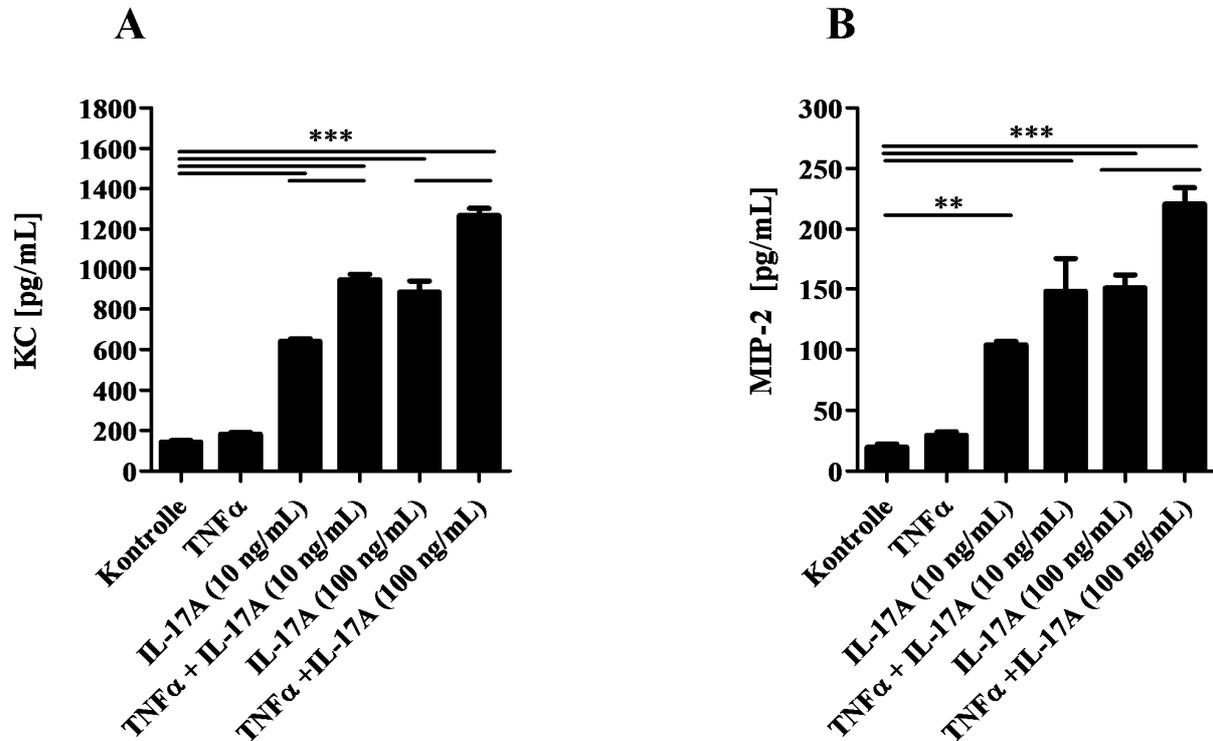


Abbildung 37: Freisetzung der Chemokine KC und MIP-2 aus primären murinen alveolaren Epithelzellen nach einer Stimulation mit TNF α und IL-17A. Murine alveolare Epithelzellen wurden aus den Lungen von WT Mäusen isoliert, unter *ex vivo* Bedingungen polarisiert und mit TNF α und unterschiedlichen Konzentrationen an IL-17A (10 ng/mL und 100 ng/mL) stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Konzentrationen an KC (A) und MIP-2 (B) im Kulturmedium mittels ELISA bestimmt. Statistik: One way ANOVA mit Bonferroni Anpassung (Kontrolle n=5; TNF α n=6; IL-17A (10 ng/mL) n=7; TNF α + IL-17A (10 ng/mL) n=7; IL-17A (100 ng/mL) n=7; TNF α + IL-17A (100 ng/mL) n=7); mean \pm SD (Statistikkniveau: **p<0,01; ***p<0,001).

4.4.6. Die durch IL-17C vermittelte pulmonale Entzündung während einer *P. aeruginosa* Pneumonie wird von IL-17A reguliert

Die Ergebnisse der *ex vivo* Versuche mit alveolaren Epithelzellen zeigten, dass IL-17A die Expression von IL-17C reguliert und eine Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren induzieren kann. Im nächsten Schritt wurden WT und IL-17A^{-/-} Mäuse mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* stimuliert und 24 Stunden später in Hinblick auf das Entzündungsgeschehen analysiert. Die mit PBS stimulierten Kontrolltiere zeigten keinen Unterschied in der Anzahl der

im pulmonalen Gewebe vorhandenen Leukozyten (Abb. 38A-D). Durch die intranasale Applikation der Bakterien kam es in beiden Mausgruppen zu einer deutlichen Zunahme der Leukozytenzahl. In den IL-17A^{-/-} Mäusen war der Leukozyteneinstrom im Vergleich zu den infizierten WT Mäusen jedoch signifikant geringer (Abb. 38A). Die Differenzierung der eingewanderten Zellen ergab, dass die IL-17A Defizienz eine reduzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Abb. 38B) verursachte, während die Anzahl der Makrophagen (Abb. 38C) und Lymphozyten (Abb. 38D) nicht beeinflusst wurde.

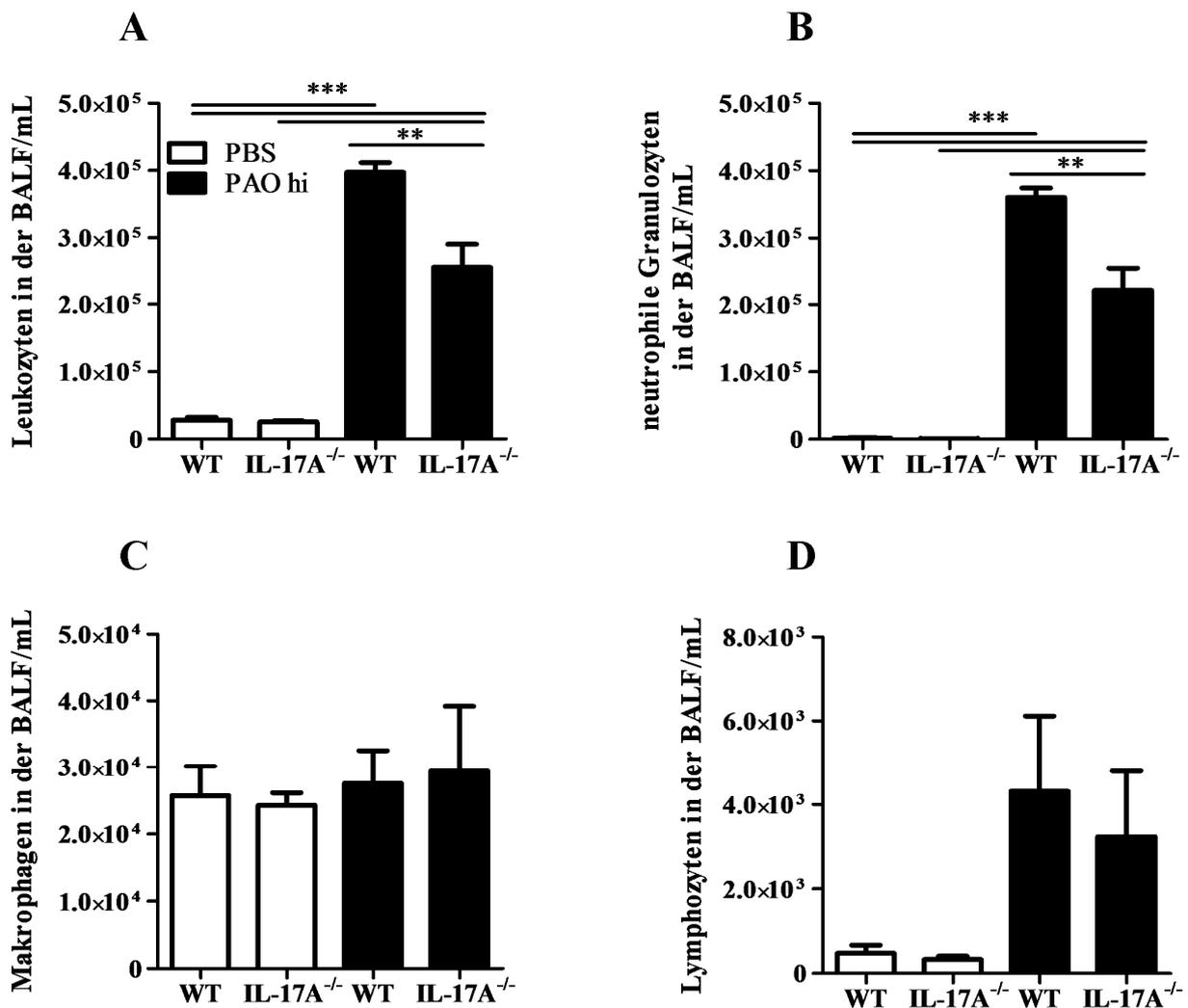


Abbildung 38: Leukozyten in der BALF von WT und IL-17A^{-/-} Mäusen nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*. WT und IL-17A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (PAO hi) (CFU: 4×10^6 - 6×10^6) oder PBS als Kontrolle stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Anfertigen von Cytospin-Präparaten wurden die einzelnen Leukozytensubtypen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Gesamtzahl der Leukozyten in der BALF. (B) Anzahl der neutrophilen Granulozyten, (C) Makrophagen und (D) Lymphozyten im Differentialzellbild. Statistik: One way ANOVA mit

post-hoc Tukey's Test (PBS: WT n=4, IL-17A^{-/-} n=4; PAO hi: WT n=8, IL-17A^{-/-} n=11); mean±SEM (Signifikanzniveau: **p<0,01; ***p<0,001).

Die Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* verursachte in den WT Mäusen eine signifikante Zunahme der KC Konzentration in der BALF (Abb. 39A). In infizierten IL-17A^{-/-} Mäusen konnten im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Abbildung 39B zeigt zudem, dass die MIP-2 Konzentration in der BALF der infizierten IL-17A^{-/-} Mäusen gegenüber den infizierten WT Mäusen signifikant verringert war. Die pulmonale Freisetzung von TNF α wurde durch die IL-17A Defizienz nicht signifikant beeinflusst (Abb. 39C).

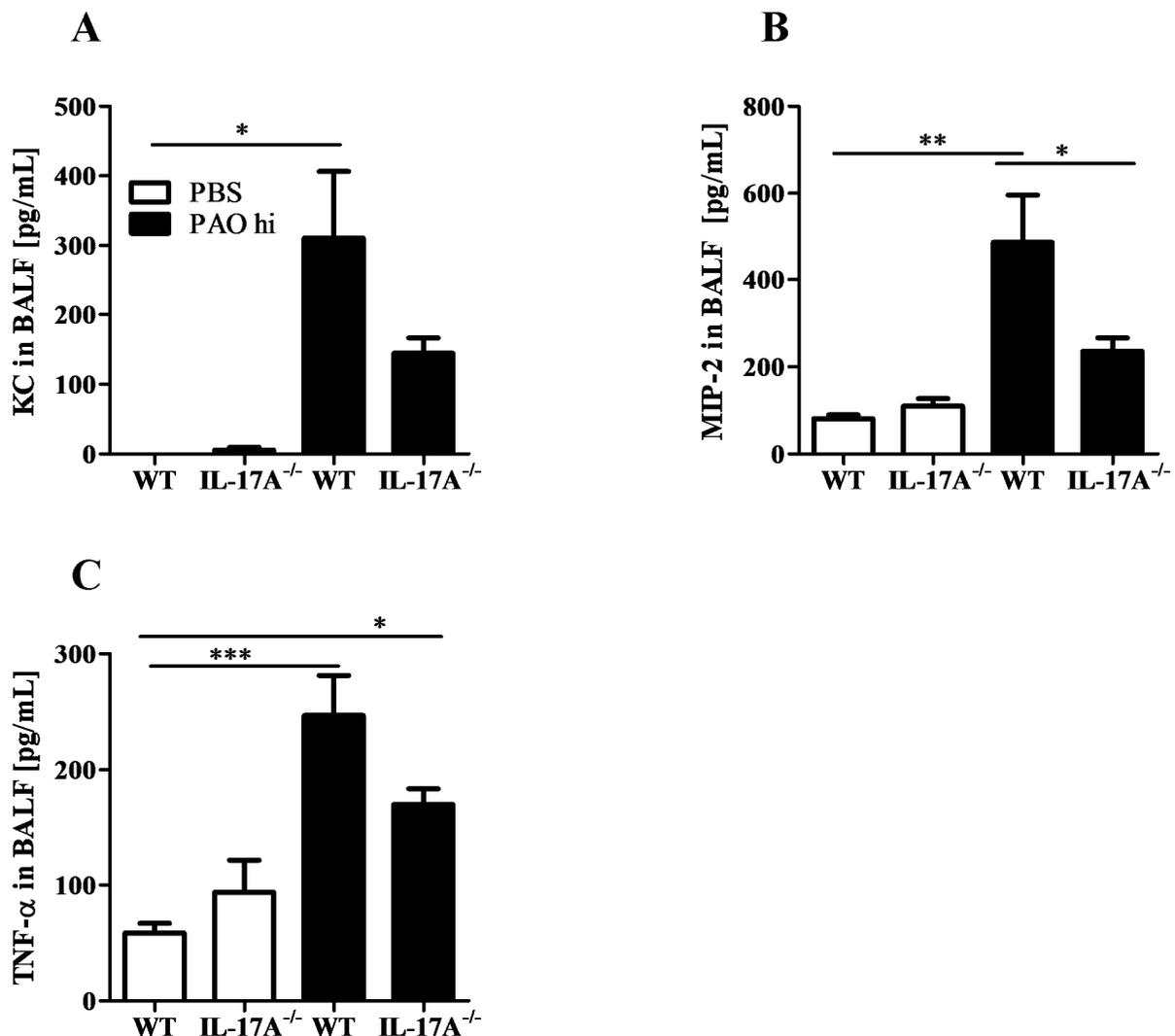


Abbildung 39: Konzentrationen der proinflammatorischen Mediatoren KC, MIP-2 und TNF α in der BALF von WT und IL-17A^{-/-} Mäusen nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*. WT und IL-17A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (PAO hi) (CFU: 4x10⁶-6x10⁶)

oder PBS als Kontrolle stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Konzentrationen an KC (A), MIP-2 (B) und TNF α (C) in der BALF mittels ELISA analysiert. Statistik: One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test bei KC und MIP-2 (PBS: WT n=4, IL-17A^{-/-} n=4; PAO hi: WT n=8, IL-17A^{-/-} n=11); Kruskal-Wallis mit post hoc Dunn's Multiple Comparison Test bei TNF α (jeweils n=4 pro Gruppe); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die Untersuchung der IL-17C Expression im Lungengewebe zeigte, dass es nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* nur in den WT Mäusen zu einer Zunahme der IL-17C mRNA kam (Abb. 40).

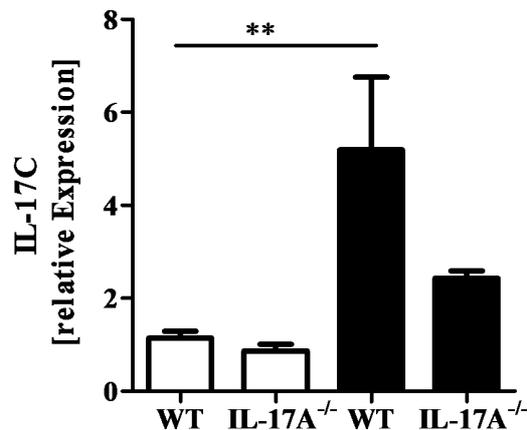


Abbildung 40: Relative Expression von IL-17C in WT und IL-17A^{-/-} Mäusen nach einer intranasalen Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*. WT und IL-17A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 (PAO hi) (CFU: 4x10⁶-6x10⁶) oder PBS als Kontrolle stimuliert. Nach 24 Stunden wurde aus den Lungen die Gesamt-RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und die relative IL-17C Expression normiert auf WT PBS bestimmt. One way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: WT n=4, IL-17A^{-/-} n=4; PAO hi: WT n=8, IL-17A^{-/-} n=11); mean \pm SEM (Signifikanzniveau: **p<0,01).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden epithelialen Faktoren RAGE und IL-17C bei einer durch äußere Faktoren hervorgerufenen Entzündung der Lunge untersucht. Es zeigte sich, dass RAGE die Lungenmechanik und die Homöostase des Lungengewebes unter physiologischen Bedingungen und unter Einfluss von Zigarettenrauch reguliert. Dem Zytokin IL-17C konnte hingegen bei einer rauchinduzierten Entzündung keine Funktion zugewiesen werden.

In Hinblick auf das Entzündungsgeschehen in einer *P. aeruginosa* induzierten Pneumonie konnten neue Erkenntnisse mit Hilfe eines akuten murinen Pneumoniemodells und durch *in vitro* ausdifferenzierte Pneumozyten gewonnen werden. Es zeigte sich, dass epitheliales IL-17C über das Zytokin IL-17A reguliert wird und an der pulmonalen Inflammation in einer durch *P. aeruginosa* induzierten Infektion beteiligt ist, indem es die Freisetzung von Neutrophilen-rekrutierenden Chemokinen fördert und somit die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge verstärkt.

5.1. Mausmodelle einer akuten und chronischen Zigarettenrauchexposition

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zigarettenrauchexpositionsmodelle verwendet. Ein akutes Rauchmodell wurde gewählt, um den Einfluss von Zigarettenrauch auf frühe pulmonale Entzündungsprozesse zu studieren. Hierzu wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen Zigarettenrauch mit einer hohen Partikelkonzentration ausgesetzt. Charakteristisch für dieses Modell war ein starker Einstrom von neutrophilen Granulozyten, wie er bereits in anderen Studien mit akuter Zigarettenrauchexposition beschrieben wurde [68, 156, 309]. Durch die Verwendung von akuten Rauchmodellen konnte beispielsweise festgestellt werden, dass Alveolarmakrophagen auf einen Zigarettenrauchkontakt mit einer schnellen Freisetzung von IL-1 β reagieren und dadurch pulmonale Entzündungsreaktionen in Gang setzen [42]. Eine andere Studie ergab, dass TNF α ein weiteres zentrales proinflammatorisches Zytokin darstellt, das bei akuter Rauchexposition durch einen MMP-12 abhängigen Mechanismus aus Alveolarmakrophagen freigesetzt wird [56]. Zur Analyse eines rauchinduzierten Lungenschadens wurde ein chronisches Modell verwendet, in dem die Mäuse fünf Stunden pro Tag, an fünf Tagen

pro Woche, Zigarettenrauch mit einer niedrigen Partikelkonzentration ausgesetzt waren. Invasive Lungenfunktionsmessungen und stereologische Analysen, mit denen zuverlässig die Lungenstruktur bei Nagern beurteilt werden kann [93, 267, 289, 337], zeigten, dass eine sechsmonatige Rauchexposition zu pathologischen Veränderungen der Lunge führte. Neben einer erhöhten totalen Lungenkapazität und einer Zunahme der Lungen-Compliance konnte auf struktureller Ebene ein Verlust von Lungenparenchym festgestellt werden. Dieser war durch eine Verringerung der Alveolenoberfläche und einer Erhöhung des MCLs gekennzeichnet. Chronische Rauchmodelle, die dem in dieser Arbeit verwendeten Zigarettenrauchexpositionsmodell ähnlich sind, wurden bereits verwendet, um einen rauchinduzierten Lungenschaden mittels invasiver Lungenfunktion und stereologischer Analyse mechanistisch zu untersuchen. So wurden z.B. im chronischen Rauchmodell unter Zuhilfenahme von induzierbare NO-Synthase (iNOS)-defizienten Mäusen und pharmakologischen Wirkstoffen gezeigt, dass NO-Synthasen an der Ausbildung eines rauchinduzierten strukturellen Lungenschaden beteiligt sind [289]. Eine andere Studie ergab, dass Sirtuin 1 (SIRT1) und Forkhead Box Protein O3 (FOXO3) vor einem rauchinduzierten Lungenschaden im Mausmodell schützen, indem sie die durch den Zigarettenrauch hervorgerufene zelluläre Seneszenz reduzierten [355]. Bei einer IL-17A Defizienz konnte hingegen kein schützender Effekt bei der Ausbildung eines rauchinduzierten Lungenschadens festgestellt werden [337].

5.2. Die Rolle von RAGE bei einer akuten und chronischen Zigarettenrauchexposition

Die COPD ist eine progressiv verlaufende Lungenerkrankung, die hauptsächlich durch chronische Zigarettenrauchexposition hervorgerufen wird [326]. Eine dauerhafte Inhalation von Zigarettenrauch verursacht ein Absterben von pulmonalen Strukturzellen, was zu einer vermehrten Freisetzung von DAMPs führt. In COPD-Patienten können daher erhöhte Konzentrationen von verschiedenen DAMPs wie beispielsweise HMGB1 oder S100 Proteine detektiert werden [94, 248]. RAGE ist ein Multiligandenrezeptor, der unter physiologischen Bedingungen in einem sehr hohen Maße in der Lunge exprimiert wird [76] und der mit einer Vielzahl an DAMPs interagieren kann [27, 137, 141, 172, 297]. Im pulmonalem Gewebe von COPD-Patienten ist die RAGE Expression verglichen mit gesunden Personen um ein Vielfaches erhöht und wird auf die verstärkte Akkumulation von HMGB1, AGEs oder anderen RAGE

Liganden zurückgeführt [49, 94, 350]. Durch die Interaktion mit seinen Liganden kann RAGE verschiedene Signalkaskaden aktivieren, die zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren, Adhäsionsmolekülen und dem RAGE Rezeptor selbst führen [29, 52, 167]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass RAGE in dem chronischen Entzündungsgeschehen der Lunge, welches ein charakteristisches Merkmal der COPD darstellt, involviert sein könnte. Um die Beteiligung von RAGE an der rauchinduzierten pulmonalen Entzündung zu untersuchen, wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse in einem akuten und in einem chronischen Zigarettenrauchexpositionsmodell analysiert.

5.2.1. Eine Deletion von RAGE beeinflusst mechanische und strukturelle Eigenschaften der Lunge

Verglichen mit anderen Geweben und Organen zeigt RAGE unter physiologischen Bedingungen die höchste Expressionsrate in der Lunge [76]. Um näher zu charakterisieren welche Zelltypen RAGE exprimieren, wurden immunhistochemische Analysen mit murinem Lungengewebe durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Expression von RAGE in isolierten Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen unter *ex vivo* Bedingungen analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass RAGE hauptsächlich von alveolaren Epithelzellen und in einem geringen Maße auch von Alveolarmakrophagen exprimiert wird. In bronchialen Epithelzellen und im Bindegewebe der Lunge konnte hingegen keine RAGE Färbung detektiert werden. Diese Beobachtungen gehen einher mit anderen Studien, in denen das Lungengewebe von Menschen und Ratten immunhistochemisch oder durch Kolo-kalisationsexperimente mit spezifischen Alveolar Typ I und Typ II Zellmarkern untersucht wurde. Anhand dieser Analysen konnte festgestellt werden, dass RAGE hauptsächlich von Alveolar Typ I Epithelzellen produziert wird [76, 91], während in Alveolar Typ II Zellen, bronchialen Epithelzellen, Makrophagen und Endothelzellen keine oder nur eine geringe RAGE Expression vorhanden ist [76, 91, 219].

Angesichts der hohen Expressionsrate wird vermutet, dass RAGE eine spezifische Funktion im pulmonalen Gewebe erfüllt. Mittels invasiver Lungenfunktionsmessung und durch Untersuchungen der parenchymalen Strukturen wurde der Einfluss von RAGE auf die Lungenhomöostase überprüft. Dazu wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse in einem Alter von zwei, vier und zehn Monaten analysiert. In den RAGE^{-/-} Mäusen konnte unabhängig von ihrem Alter eine erhöhte Compliance des respiratorischen Systems und damit einhergehend eine

Verringerung der Elastance des respiratorischen Systems festgestellt werden. Beide Parameter geben Aufschluss über den Verlust der elastischen Rückstellkraft und die damit einhergehende Dehnung des Lungengewebes [332, 336]. Eine Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften der Lunge durch eine RAGE Defizienz wurde auch in einer anderen Studie beobachtet. Al-Robaiy et al. entnahmen die Lungen aus fünf, acht und 24 Monate alten WT und RAGE^{-/-} Mäusen und untersuchten sie unter *ex vivo* Bedingungen in Hinblick auf ihre biomechanischen Eigenschaften. Dabei konnten die Autoren feststellen, dass eine RAGE Defizienz zu einer Erhöhung der Compliance, ähnlich wie in der vorliegenden Studie beschrieben, und zu einer Verringerung des expiratorischen Atemflusses führte. Die Abhängigkeit der beiden Parameter von RAGE konnte in allen drei Altersklassen beobachtet werden, jedoch waren die Veränderungen der Compliance und des expiratorischen Atemflusses in den älteren RAGE^{-/-} Mäusen ausgeprägter als in den jüngeren Tieren. Anders als in der hier vorliegenden Studie konnten bei Al-Robaiy et al. in Mäusen, die jünger als drei Monate waren, keine Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften der Lunge festgestellt werden [6].

Anhand von stereologischen Untersuchungen des Lungengewebes wurde in dieser Arbeit zusätzlich die alveolare Oberfläche bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass zwischen den beiden Mausstämmen zu keinem der drei analysierten Zeitpunkte ein Unterschied in diesem Parameter vorlag. Trotzdem konnte in den RAGE^{-/-} Mäusen eine Veränderung der parenchymalen Strukturen festgestellt werden. Verglichen mit WT Mäusen war das pulmonale Gewebe der vier und zehn Monate alten RAGE^{-/-} Mäuse durch einen vergrößerten MCL charakterisiert. Eine vergleichbare Beobachtung konnte auch in einer Arbeit von Sambamurthy et al. gemacht werden, in der WT und RAGE^{-/-} Mäuse in einem chronischen Rauchmodell für sechs Monate mit Zigarettenrauch oder Raumluft exponiert wurden. Während die WT Mäuse durch die Rauchexposition eine Erhöhung des MCLs zeigten, konnte in den RAGE^{-/-} Mäusen keine rauchinduzierte Zunahme der MCL Werte festgestellt werden. Raumluftexponierte RAGE^{-/-} Mäuse zeigten jedoch, genau wie in der vorliegenden Arbeit, im Vergleich zu den WT Kontrollmäusen signifikant höhere MCL Werte. Dadurch folgerten Sambamurthy et al., dass eine RAGE Defizienz zur spontanen Entstehung eines emphysematösen Lungenschadens führt [279]. Aufgrund von fehlenden weitergehenden stereologischen Analysen hinsichtlich des Verlustes an Lungenparenchym überinterpretieren die Autoren jedoch den vergrößerten MCL in Bezug auf die Lungenstruktur der RAGE^{-/-} Mäuse. Die stereologischen Analysen in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein erhöhter MCL nicht mit einem Verlust an Lungenparenchym, gezeigt anhand der

alveolaren Oberfläche, gleichzusetzen ist. Zusammengefasst lässt sich daher feststellen, dass die Defizienz von RAGE zu einer veränderten Lungenmechanik, nicht aber zu einem Verlust an Lungenparenchym führt. Die stereologische Analyse zusammen mit der Lungenfunktion legen nahe, dass der erhöhte MCL bei den RAGE^{-/-} Mäusen nicht auf einer Zerstörung von Lungenparenchym beruht, sondern aus einer verstärkten Dehnbarkeit der Lunge resultiert.

Die Ursache für die veränderten mechanischen Eigenschaften in den RAGE-defizienten Lungen kann auf die physiologische Funktion des Rezeptors im pulmonalen Gewebe zurückgeführt werden. Verschiedene Studien beschreiben, dass es sich bei RAGE um ein wichtiges Adhäsionsmolekül handelt, das die Verbindung zwischen Zellen und den Proteinen der EZM herstellt [20, 76, 253, 291]. Demling et al. konnten beispielsweise zeigen, dass das Einbringen von RAGE cDNA in HEK293 Zellen zu einer besseren Anheftung und Ausbreitung der Zellen auf Kollagen beschichteten Oberflächen führte [76]. Andere *in vitro* Untersuchungen mit RAGE transfizierten R3/1 Zellen bestätigten die vorangegangenen beschriebenen Ergebnisse und ergaben zudem, dass RAGE zusätzlich zu Kollagen auch mit Fibronektin und Laminin in Kontakt treten kann [291]. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass RAGE bevorzugt an der Basalmembran von ausdifferenzierten Alveolar Typ I Epithelzellen lokalisiert ist [295], wird vermutet, dass RAGE auch in diesem Zelltyp den Kontakt zur EZM vermittelt. Durch die Zell-EZM-Interaktionen wird das Abflachen und Ausbreiten der Zellen gefördert, wodurch die Alveolar Typ I Epithelzellen ihre charakteristische dünne und flache Morphologie erhalten, die einen effektiven Gasaustausch ermöglicht [76]. Zusätzlich zu den Zell-EZM-Kontakten ist RAGE auch an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten involviert [6, 291]. Dies konnte unter anderem anhand von Kokultivierungsstudien mit NCI-H358 Zellen, die mit unterschiedlich markierten RAGE-Expressionsvektoren transfiziert wurden, festgestellt werden. Unter Nutzung von Immunfluoreszenz- und Immunpräzipitationsanalysen wurde deutlich, dass benachbarte Zellen über die Ausbildung von RAGE Homodimeren miteinander in Verbindung treten [6]. Auf Grundlage dieser Beobachtungen vermuten Al-Robaiy et al., dass die fehlenden Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte in RAGE^{-/-} Mäusen zu den veränderten biomechanischen Eigenschaften der Lunge führten [6].

Einhergehend mit der Literatur konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass RAGE eine wichtige Funktion im pulmonalen Gewebe übernimmt und die mechanischen Eigenschaften der Lunge beeinflusst. Durch eine RAGE Defizienz können Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte nicht vollständig ausgebildet werden, wodurch das pulmonale Gewebe eine geringe Steifigkeit besitzt,

was sich in einer erhöhten Compliance des respiratorischen Systems und somit auch in vergrößerten MCL Werten darstellt.

5.2.2. Eine RAGE Defizienz beeinflusst die Lungenmechanik, nicht aber den strukturellen Lungenschaden nach chronischer Zigarettenrauchexposition

In einer Studie von Waseda et al. wurde bereits beschrieben, dass RAGE in einem Elastase-induzierten Emphysemmodell für die Ausbildung eines Lungenschadens verantwortlich ist. Während es in WT Mäusen durch die Elastase-Applikation zu einer Zunahme der Lungen-Compliance und einer Vergrößerung des MCLs kam, zeigten RAGE^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen keine Veränderungen [339]. Der Verlust an Lungenparenchym wurde in dieser Arbeit jedoch nicht ermittelt. Das Elastase-induzierte Emphysemmodell ist ein sehr verbreitetes Modell, in dem innerhalb von kurzer Zeit ein Lungenschaden erzeugt werden kann, der vergleichbar ist mit den pulmonalen Veränderungen in COPD-Patienten [31]. Die Instillation von elastolytischen Enzymen verursacht eine sehr schnelle Zerstörung der parenchymalen Strukturen, was von einer heftigen, aber sehr kurzlebigen Inflammation begleitet wird [349]. Die Entstehung eines humanen Lungenschadens ist jedoch eher ein langsam fortschreitender Prozess, der mit einem konstanten Entzündungsgeschehen einhergeht. Zur Nachbildung dieses charakteristischen Verlaufs ist die Verwendung eines chronischen Rauchmodells besser geeignet [310]. Zudem ist Zigarettenrauch der Faktor, der am häufigsten für die Entstehung eines Lungenschadens verantwortlich gemacht wird [326]. Es ist daher fraglich, inwieweit das Elastase-Modell Aufschluss über zelluläre Mechanismen gibt, die der Entstehung des rauchinduzierten Lungenschadens bei Menschen zugrunde liegen.

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung eines chronischen Rauchmodells untersucht, ob und in welcher Art und Weise RAGE an der Entstehung eines rauchinduzierten Lungenschadens beteiligt ist. Der Lungenschaden wurde nach einer sechsmonatigen Zigarettenrauchexposition auf physiologischer Ebene durch invasive Lungenfunktionsmessungen und auf histologischer Ebene mittels stereologischer Analysen bestimmt und quantifiziert. In WT Mäusen konnten durch die Zigarettenrauchexposition funktionelle Veränderungen der Lungenmechanik wie z.B. eine signifikante Erhöhung der totalen Lungenkapazität und der parenchymalen Compliance beobachtet werden. In anderen chronischen Rauchstudien wurden diese Parameter ebenfalls zur Charakterisierung eines Lungenschadens verwendet und ergaben vergleichbare Resultate [267,

289, 337]. Während die rauchexponierten WT Mäuse Abweichungen in ihren Lungenfunktionsparametern zeigten, konnte in den RAGE^{-/-} Mäusen keine veränderte Lungenmechanik in Folge der Rauchexposition festgestellt werden. Diese Beobachtung geht einher mit der unveränderten Compliance der RAGE^{-/-} Mäuse nach einer Elastase-Instillation [339] und legt eine Beteiligung von RAGE an der Entstehung eines rauchinduzierten emphysemartigen Lungenschadens nahe.

Um den durch Zigarettenrauch hervorgerufenen Lungenschaden noch weiter zu charakterisieren, wurden zusätzlich strukturelle Untersuchungen in Form von stereologischen Analysen durchgeführt. Zur Definition eines rauchinduzierten Lungenschadens wird meist der MCL verwendet, um die Vergrößerung des distalen Luftraumes zu beschreiben [37, 118]. Angaben in Hinblick auf die Zerstörung der Alveolenwände z.B. in Form des totalen Alveolarwandvolumens, der totalen Alveolenoberfläche oder der totalen Anzahl der Alveolen sollten, wie bereits beschrieben, zusätzlich auch aufgeführt werden, um eine genauere Charakterisierung des Gewebeschadens zu gewährleisten [93]. Seimetz et al. zeigten aus diesem Grund in ihrer Studie zum Einfluss der iNOS auf die Entwicklung eines Lungenschadens, dass es durch die Inhalation von Zigarettenrauch neben einer Erhöhung des MCLs auch zu einer Abnahme der Septendicke kam [289]. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls mehrere Parameter zur Beschreibung des strukturellen Lungenschadens herangezogen. Es zeigte sich, dass eine Zigarettenrauchexposition bei den WT Mäusen zu einer Zunahme des MCLs und zu einer leichten Abnahme des Alveolarwandvolumens führte. Zudem konnte eine Verringerung der totalen Alveolenoberfläche in den rauchexponierten WT Mäusen festgestellt werden. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die WT Mäuse durch den Einfluss des Zigarettenrauches einen strukturellen bzw. emphysemartigen Lungenschaden entwickelten. Bei den RAGE^{-/-} Mäusen ergab die Auswertung der stereologischen Untersuchung kein eindeutiges Bild. Zwar zeigten die Mäuse genau wie die WT Tiere einen rauchinduzierten Verlust der Alveolenoberfläche, andere Parameter wie der MCL oder die Septendicke wurden durch den Einfluss des Zigarettenrauches jedoch nicht verändert. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt aufgeführt, alveolare Strukturen wie der MCL bei RAGE^{-/-} Mäusen schon im Basalzustand stark erhöht waren und die chronische Rauchexposition lediglich den abnormalen MCL nicht weiter vergrößerte. Da es nach der Zigarettenrauchexposition in RAGE^{-/-} Mäusen zu einem Verlust an alveolarer Oberfläche wie bei WT Tieren kam, scheint eine Defizienz von RAGE nicht vor einem rauchinduzierten Verlust an Lungenparenchym und dem Auftreten eines

Emphysems zu schützen, auch wenn RAGE die Lungenmechanik nach chronischer Rauchexposition beeinflusst. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine detaillierte stereologische Analyse notwendig ist, um emphysemartige Veränderungen in der Maus zu untersuchen. Wie bereits oben erwähnt, haben Sambamurthy et al. die Lungen von raumluft- und rauchexponierten RAGE^{-/-} Mäusen nicht weitgehend mit Hilfe stereologischer Analysen hinsichtlich eines Verlusts an Lungenparenchym analysiert. Die Schlussfolgerung von Sambamurthy et al., dass RAGE zur Ausbildung eines rauchinduzierten Lungenemphysems beiträgt, da Rauchexposition den erhöhten MCL bei RAGE^{-/-} Mäusen nicht weiter steigert [279], ist daher zweifelhaft.

Gemäß einer Arbeit von Fehrenbach ist eine genetisch modifizierte Maus für strukturelle Untersuchungen der Lunge nicht geeignet, wenn ihre Alveolarisierung durch eine Deletion oder durch eine Überexpression eines Genes gestört ist [92]. Es ist daher fraglich, ob die RAGE^{-/-} Maus ein guter Modellorganismus für die Untersuchung eines rauchinduzierten strukturellen Lungenschadens darstellt. Die Nutzung von konditionellen Knockout Mäusen wäre wahrscheinlich die bessere Wahl, denn bei diesen Mäusen besteht die Möglichkeit, das Gen zu bestimmten Zeitpunkten auszuschalten [92]. Durch die Verwendung einer konditionellen Maus, bei der eine RAGE Deletion erst nach Abschluss der Alveolarisierungsphase induziert wird, könnte sichergestellt werden, dass WT und RAGE^{-/-} Mäuse zu Beginn der Rauchexperimente die gleichen strukturellen Eigenschaften aufweisen und dass ein auftretender struktureller Lungenschaden lediglich durch den Einfluss des Zigarettenrauches entstanden ist.

Die pathologischen Veränderungen des pulmonalen Gewebes können auf eine dauerhaft anhaltende rauchinduzierte Entzündung zurückgeführt werden. In den Luftwegen, dem Parenchym, der BALF und dem Sputum von Rauchern und COPD-Patienten kann daher beispielsweise eine vermehrte Akkumulation von Makrophagen beobachtet werden [16, 164]. Viele Studien beschreiben, dass die Menge an Makrophagen mit dem Ausmaß der parenchymalen Zerstörung korreliert [78, 96, 262]. Residente Alveolarmakrophagen werden durch den inhalierten Zigarettenrauch aktiviert und geben eine Reihe von entzündlichen Mediatoren wie LTB₄, TNF α , MCP-1 und IL-8 ab. Dadurch kommt es zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus der Blutbahn und eine Entzündungsreaktion wird in Gang gesetzt [15, 310]. Aktivierte Makrophagen geben zudem vermehrt elastolytische Enzyme

wie MMPs und Cathepsine ab, die Bestandteile der EZM degradieren und somit die Zerstörung der parenchymalen Strukturen fördern [16, 273].

Um zu charakterisieren welche Vorgänge für die Entstehung des rauchinduzierten Lungenschadens verantwortlich sind und auf welche Art und Weise RAGE in diese Prozesse involviert ist, wurde das Entzündungsgeschehen in den Lungen von WT und RAGE^{-/-} Mäusen analysiert. Durch die Zigarettenrauchexposition konnte in der BALF der Mäuse eine deutliche Zunahme der Leukozytenzahlen festgestellt werden. Dieser Anstieg konnte hauptsächlich auf einen verstärkten Makrophageneinstrom zurückgeführt werden, der in seiner Ausprägung mit Beobachtungen aus anderen chronischen murinen Zigarettenrauchstudien übereinstimmte [26, 68]. Die Rekrutierung der Entzündungszellen verlief in diesem Zusammenhang unabhängig von RAGE, was anhand der vergleichbaren Anzahl an eingewanderten Makrophagen in den WT und RAGE^{-/-} Mäusen gezeigt werden konnte. In beiden Mausstämmen konnten zudem keine Unterschiede in Hinblick auf die Sezernierung von inflammatorischen Mediatoren beobachtet werden.

Generell verursachte die chronische Zigarettenrauchexposition keine vermehrte Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen und Chemokinen wie z.B. MIP-1 α , MIP-1 β , KC und RANTES. Die Ursache hierfür ist auf die Zigarettenrauchzusammensetzung und die Dauer der Exposition zurückzuführen. John et al. zeigten in ihrer Studie, dass sowohl die Verwendung von Mainstreamrauch (Rauch, der bei einem aktiven Zug an der Zigarette inhaliert wird) oder Sidestreamrauch (Rauch, der durch das Glimmen der Zigarette entsteht) sowie die im Zigarettenrauch vorhandene Partikelkonzentration die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren sehr stark beeinflussen kann. Während die Nutzung von Mainstreamrauch mit einer hohen Partikelkonzentration zu einer deutlich Abgabe von KC, TNF α oder MIP-1 α führte, konnte durch die Verwendung von Sidestreamrauch, egal ob mit hoher oder niedriger Partikelkonzentration, keine Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen hervorgerufen werden [156]. Der Zigarettenrauch, der in der vorliegenden Arbeit für die chronische Exposition der Mäuse verwendet wurde, setzte sich aus Mainstream- und Sidestreamrauch zusammen und war zudem durch eine sehr geringe Partikelkonzentration charakterisiert. Voss et al. verwendeten in ihrem chronischen Rauchmodell Zigarettenrauch mit der gleichen Zusammensetzung. Der Einfluss des Rauches auf das pulmonale Entzündungsgeschehen wurde in ihrer Studie allerdings bereits nach einer dreimonatigen Expositionsdauer analysiert und nicht wie in dieser Arbeit nach sechsmonatiger Exposition. In der Arbeit von Voss et al. zeigte sich eine erhöhte rauchinduzierte

Freisetzung von IL-1 α , IL-1 β und G-CSF. Nach einer Expositionsdauer von sieben Monaten konnten sie zudem feststellen, dass der Zigarettenrauch einen negativen Effekt auf die Freisetzung von inflammatorischen Substanzen wie z.B. MMP-9 ausübte [337]. Um die pathologischen Vorgänge, die durch den Zigarettenrauch hervorgerufen werden besser verstehen zu können, müsste die Analyse des pulmonalen Entzündungsgeschehens folglich zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt werden. Zudem ist es möglich, dass die Rauchinhalation auch Reparaturprozesse in der Lunge beeinflusst und die Interaktionen zwischen Entzündungs- und Epithelzellen stört [8, 260, 338], was sich nicht unbedingt in den pulmonalen Konzentrationen der in dieser Arbeit gewählten inflammatorischen Markern zeigen muss. Darüber hinaus kann chronische Rauchexposition auch zur Apoptose oder Nekrose von Epithelzellen führen, was ebenfalls zur Entstehung eines Lungenemphysems beitragen kann [75, 190, 247, 325].

Insgesamt konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass RAGE an der Entstehung eines mechanischen rauchinduzierten Lungenschadens beteiligt ist. In welche pathologischen Vorgänge RAGE in diesem Zusammenhang eingreift, ist bisher noch nicht bekannt und muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Ob RAGE auch in die rauchinduzierten strukturellen Veränderungen des Parenchyms involviert ist, lässt sich anhand der hier durchgeführten Analysen mit konventionellen Knockout Mäusen nicht sagen, da eine RAGE Defizienz bereits in nativen Mäusen die alveolare Architektur massiv beeinflusst.

5.2.3. Eine RAGE Defizienz verändert das pulmonale Entzündungsgeschehen nach akuter Zigarettenrauchexposition

RAGE wird als ein Schlüsselfaktor beschrieben, der für das Einsetzen und die Aufrechterhaltung von inflammatorischen Vorgängen verantwortlich gemacht wird [167]. Wie bereits erwähnt, ist RAGE unter physiologischen Bedingungen in sehr großen Mengen in der Lunge vorhanden. In Folge einer Zigarettenrauchinhalation kommt es im pulmonalen Gewebe zudem zu einem weiteren Anstieg der RAGE Expression. Durch immunhistochemische Analysen mit Lungengewebe aus Nichtrauchern sowie gesunden Rauchern und Rauchern, die an COPD erkrankt waren, konnten Ferhani et al. feststellen, dass die RAGE Expression in Rauchern, unabhängig von einer COPD Erkrankung, im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht ist [94]. Vergleichbare Resultate konnten auch Chen et al. in ihrer humanen Studie erzielen, wobei sie das Lungengewebe zusätzlich zur Immunhistochemie noch mit Western Blot und ELISA Analysen

untersuchten [49]. Wood et al. analysierten die rauchinduzierten Veränderungen der pulmonalen RAGE Expression in Mäusen, die für vier Wochen Sidestreamrauch exponiert waren. Unter Zuhilfenahme von immunhistochemischen Analysen, Western Blot und qRT-PCR konnte in den rauchexponierten Mäusen eine Zunahme der RAGE Expression um nahezu 80% beobachtet werden [348]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung des akuten Rauchmodells in Mäusen ebenfalls eine Zunahme der pulmonalen RAGE Expression erzielt werden, was anhand von qRT-PCR Analysen gezeigt werden konnte. Eine Induktion der Rezeptorexpression wird unter pathologischen Bedingungen durch eine Akkumulation von RAGE Liganden ausgelöst [52, 167, 287]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Lungenepithelzellen und neutrophile Granulozyten durch den Einfluss von Zigarettenrauch massiv geschädigt und in einen nekrotischen Zustand versetzt werden, wodurch es zu einer erhöhten Freisetzung von DAMPs kommt [132, 249, 250]. In einer *in vitro* Studie konnte so z.B. beobachtet werden, dass eine sechsstündige Inkubationsphase mit Zigarettenrauchextrakt in Zellen der epithelialen Zelllinie BEAS-2B einen nekrotischen Zelltod induzierte. Die eingeleitete Nekrose hatte zur Folge, dass große Mengen an HMGB1, mitochondriale DNA, ATP, etc. aus dem Zellinnern freigesetzt wurden, was in ungeschädigten Zellen zu einer MyD88-vermittelten Produktion von proinflammatorischen Mediatoren führte [250]. Diese Beobachtung konnte auch in humanen neutrophilen Granulozyten gemacht werden, die ebenfalls unter *in vitro* Bedingungen mit Zigarettenrauchextrakt behandelt wurden [132]. Des Weiteren zeigte eine Studie von Cerami et al., dass die im Zigarettenrauch enthaltenen Glykotoxine sowohl unter *in vitro* als auch unter *in vivo* Bedingungen zu einer vermehrten Bildung von AGEs führten [44]. Im Lungengewebe von Rauchern und rauchenden COPD-Patienten konnten daher auch erhöhte Konzentrationen von AGEs mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden [219, 350]. DAMPs und AGEs sind Substanzgruppen, die an den RAGE Rezeptor binden und zelluläre Signalkaskaden induzieren können [94, 116, 172, 248, 286]. Die intrazellulären Signale führen in sehr vielen Fällen zur Expression von NFκB-abhängigen Genen wie z.B. TNFα, IL-1β oder RANTES [149, 196, 266]. Li et al. und Tanaka et al. konnten feststellen, dass auch in der Promotorsequenz von RAGE eine funktionelle NFκB-Bindestelle vorhanden ist [195, 318]. Daher wird in Folge von Liganden-RAGE-Interaktionen neben inflammatorischen Zytokinen auch der Rezeptor selbst durch RAGE-vermittelte Signalwege vermehrt exprimiert, was zu einer Aufrechterhaltung und Verstärkung des ursprünglichen Signals und zu einer chronischen Entzündungsreaktion führt [29, 188, 287].

Um die Funktion von RAGE in einer akuten rauchinduzierten Entzündung zu untersuchen, wurden WT und RAGE^{-/-} Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen Zigarettenrauch exponiert. Im Gegensatz zum chronischen Modell kann mit dem akuten Modell eine extensive Entzündung in der Lunge hervorgerufen werden, die durch einen starken Einstrom von neutrophilen Granulozyten charakterisiert ist [68, 309]. Die Ursache hierfür liegt in der ausschließlichen Nutzung von Mainstreamrauch, der durch eine hohe Partikelkonzentration gekennzeichnet ist [156].

Einhergehend mit der Literatur konnte in dem hier verwendeten akuten Zigarettenrauchmodell eine massive pulmonale Entzündung ausgelöst werden. Durch die Exposition mit Zigarettenrauch konnte in der BALF der Mäuse ein starker Anstieg der Leukozytenzahl detektiert werden. In den WT Mäusen wurde diese Zunahme hauptsächlich durch einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten hervorgerufen. Bei den RAGE^{-/-} Mäusen fand ebenfalls eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge statt. Jedoch konnte in diesen Tieren auch eine ausgeprägte Zunahme der Makrophagen beobachtet werden, was einen im Vergleich zu den WT Mäusen deutlich stärkeren Anstieg der Leukozytenzahl verursachte. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu anderen *in vivo* Studien, in denen der Einfluss einer RAGE Defizienz auf die Rekrutierung von Entzündungszellen untersucht wurde. Robinson et al. beschreiben beispielsweise, dass eine intranasale Applikation von 10% Zigarettenrauchextrakt in RAGE^{-/-} Mäusen zu einem reduzierten Leukozyteneinstrom führte [268]. Diese Beobachtung findet sich auch in der Studie von Wood et al., in der sidestreamrauchexponierte WT und RAGE^{-/-} Mäuse untersucht wurden. Während in den WT Mäusen eine Akkumulation von Leukozyten in der BALF festgestellt werden konnte, was hauptsächlich durch einen verstärkten Einstrom von neutrophilen Granulozyten hervorgerufen wurde, zeigten die RAGE^{-/-} Mäuse keine Veränderung in Hinblick auf die zellulären Zusammensetzung der BALF [348].

Es ist bekannt, dass RAGE die Transmigration von Leukozyten aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe regulieren kann [48, 103, 237, 360]. Allerdings ist RAGE nicht das einzige Molekül, das diese Funktion übernimmt [103]. Im Falle einer Entzündung wird RAGE auf dem Endothel [48, 103] oder auch auf intestinalen Epithelzellen [360] vermehrt exprimiert und fungiert als Adhäsionsrezeptor für Leukozyten. Die Bindung der Entzündungszellen findet dabei über das β 2-Integrin Mac-1 statt [48]. Neben RAGE ist jedoch auch endotheliales ICAM-1 in der Lage eine Bindung mit Mac-1 einzugehen. Frommhold et al. konnten in ihrer Studie feststellen, dass während einer akuten Trauma-induzierten Inflammation nur die Abwesenheit von beiden

Proteinen zu einer vollständigen Verhinderung der Leukozytenadhäsion führte. Wird eines der beiden Proteine exprimiert, so können Leukozyten, durch die überlappende Funktion von RAGE und ICAM-1 weiterhin über das Endothel in das geschädigte Gewebe einwandern [103]. Diese Beobachtung zeigt, dass eine RAGE Defizienz nicht zwingend zu einem verminderten Leukozyteneinstrom führen muss.

Neben einer verstärkten pulmonalen Rekrutierung von Entzündungszellen kommt es durch die akute Zigarettenrauchexposition auch zu einer vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren. Hierbei wird vor allem das auf neutrophile Granulozyten wirkende Chemokin KC in großen Mengen abgegeben [156, 220]. Andere Zytokine und Chemokine wie beispielsweise $\text{TNF}\alpha$, MIP-2, MIP-1 α oder MCP-1, die an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten beteiligt sind, werden durch die akute Zigarettenrauchexposition ebenfalls im höheren Maße sezerniert [55, 156, 330, 335]. In den WT und RAGE^{-/-} Mäusen wurden in diesem Zusammenhang die Chemokine KC, MIP-1 α und MCP-1 analysiert. Die akute Rauchexposition führte in den Mäusen zwar zu einer Zunahme der pulmonalen Sezernierung von MIP-1 α und MCP-1, jedoch waren die messbaren Chemokinlevel eher gering. Die KC Konzentration stieg im Gegensatz dazu in den rauchexponierten Mäusen deutlich stärker an. Hierbei zeigte sich zudem, dass die Freisetzung von KC in den RAGE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant verringert war. In anderen Studien, bei denen der Einfluss von Zigarettenrauch auf die pulmonale Inflammation untersucht wurde, konnte in den rauchexponierten RAGE^{-/-} Mäusen ähnliche Zytokin- und Chemokinprofile beobachtet werden. Sowohl Reynolds et al. als auch Wood et al. konnten in rauchexponierten RAGE^{-/-} Mäusen eine verglichen mit WT Mäusen verringerte Abgabe von proinflammatorischen Mediatoren wie MIP-2, $\text{TNF}\alpha$ und RANTES feststellen [266, 348]. Damit einhergehend konnten Robinson et al. in ihrer Studie mit Alveolarmakrophagen, die aus RAGE^{-/-} Mäusen isoliert wurden, ebenfalls eine verminderte Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β feststellen, wenn die Zellen zuvor mit Zigarettenrauchextrakt stimuliert wurden [268].

Dass eine RAGE Defizienz auch unabhängig von einer Zigarettenrauchexposition die pulmonalen Entzündungsvorgänge modifizieren kann, zeigten Waseda et al. mit ihrer Elastase-Studie. RAGE^{-/-} Mäuse, die intratracheal Elastase verabreicht bekamen, zeigten gegenüber den unbehandelten Kontrollmäusen keine nennenswerte Veränderung in ihrem Zytokinprofil. Im Gegensatz dazu konnten in gleichbehandelten WT Mäusen eine signifikante Zunahme der IL-1 β ,

KC, MIP-2 und MCP-1 Konzentrationen festgestellt werden [339]. Eine vergleichbare Beobachtung konnte auch in den *ex vivo* Stimulationsversuchen beobachtet werden, die in der vorliegenden Arbeit mit primären Alveolarmakrophagen aus WT und RAGE^{-/-} Mäusen durchgeführt wurden. Um in den Zellen eine Entzündungsreaktion zu induzieren, wurden die Makrophagen mit IFN γ und TLR Liganden stimuliert. Diese klassische Aktivierung fördert in Makrophagen die Ausbildung eines inflammatorischen Phänotyps, der durch eine verstärkte Sezernierung von entzündungsfördernden Botenstoffen charakterisiert ist [222]. Nach der Applikation von IFN γ und den TLR Liganden kam es in beiden Gruppen zu einer gesteigerten Freisetzung von KC, IL-6 und TNF α . Jedoch war die Zytokinabgabe bei einer vorliegenden RAGE Defizienz deutlich vermindert.

Zusammengefasst konnte mit der Studie gezeigt werden, dass RAGE eine bedeutende Rolle in der akuten rauchinduzierten pulmonalen Entzündung übernimmt. Liegt eine RAGE Defizienz vor, so ist sowohl der Leukozyteneinstrom als auch die zugrundeliegende Freisetzung von inflammatorischen Botenstoffen gestört. Da RAGE in einer Vielzahl von Signalkaskaden involviert ist, gestaltet es sich jedoch schwierig dem Protein eine spezifische Funktion in der durch Zigarettenrauch hervorgerufenen Entzündung zuzuordnen.

5.2.4. RAGE stabilisiert die pulmonale Barriereintegrität

Die gesamte Oberfläche des Alveolarraumes wird von einer Epithelschicht bedeckt, die sich aus Alveolar Typ I und Alveolar Typ II Zellen zusammensetzt [119]. Eine der Hauptaufgaben des Alveolarraumes besteht im Gasaustausch zwischen der eingeatmeten Luft und dem Blut. Diese Funktion kann hauptsächlich auf die Alveolar Typ I Zellen zurückgeführt werden, da diese durch ihr sehr dünnes Erscheinungsbild und ihren direkten Kontakt zum Kapillarsystem eine effiziente Diffusion der Atemgase Sauerstoff und CO₂ zwischen den terminalen Lufträumen und dem Blutsystem ermöglichen [143]. Die alveolaren Epithelzellen bilden zudem eine funktionelle physikalische Barriere aus, die einen Übertritt von eingeatmeten Bakterien, Viren, Allergenen und anderen schädlichen Partikeln aus dem Alveolarraum in das Blut verhindern [119]. Diese Barriere wird durch sogenannte Tight Junctions hervorgerufen. Dabei handelt es sich um Komplexe aus Transmembran-, zytosolischen und Zytoskelettproteinen, die zwei benachbarte Zellen miteinander in Kontakt bringen und die den parazellulären Molekültransport regulieren [9, 178]. Solche Tight Junctions werden sowohl zwischen alveolaren Epithelzellen als auch

zwischen Epithel- und Endothelzellen ausgebildet, wodurch ein unkontrollierter Übertritt von Blutbestandteilen in den Alveolarraum verhindert wird [283].

Durch Zigarettenrauchexposition werden die Zell-Zell-Kontakte und somit die pulmonale Barrierefunktion massiv beeinflusst. Verschiedene *in vitro* [131, 160, 281] und *in vivo* Studien [40, 160] sowie Untersuchungen im Menschen [158] haben gezeigt, dass Zigarettenrauch die epitheliale Barriere zerstört und ein Austausch von Molekülen zwischen dem Alveolarraum und dem Blutkompartiment erleichtert wird. Burns et al. untersuchten beispielsweise den Einfluss von Zigarettenrauch auf die alveolare Barrierefunktion bei Meerschweinchen. Nach einer Zigarettenrauchexposition wurde in den Tieren die Translokation von eingeatmeten FITC-gekoppeltem Dextran in das Blutkompartiment analysiert. Die Studie zeigte, dass es durch den Zigarettenrauch zu einer Schädigung der Alveolar Typ I Zellen kam, wodurch die FITC-Dextran Moleküle leichter in das Blut übertreten konnten. Die Ursache hierfür liegt zum einen in der nicht mehr funktionsfähigen Epithelbarriere und zum anderen an der Tatsache, dass die Tight Junctions der vaskulären Barriere im Vergleich zu denen der epithelialen Barriere generell eine höhere Permeabilität aufweisen [40].

Neben Fluoreszenz-markierten Molekülen können auch endogene Substanzen für die Untersuchung der alveolaren Barriereintegrität herangezogen werden. In verschiedenen *in vivo* Studien wurde die endotheliale-epitheliale Barrierschädigung anhand des Übertritts des Serumproteins Albumin aus dem Blutsystem in die Lunge bestimmt [160, 177, 343, 364]. Zhao et al. konnten dadurch z.B. zeigen, dass TLR4 die durch Hyaluronfragmente hervorgerufene pulmonale Entzündung reguliert und die alveolare Barriereintegrität stabilisiert, wodurch weniger Albumin in den Alveolarraum übertritt [364]. In der hier vorliegenden Studie wurde ebenfalls die Albuminkonzentration in der BALF von Mäusen bestimmt, um den Einfluss von Zigarettenrauch auf die Alveolarbarriere zu untersuchen. In WT Mäusen kam es durch die akute Rauchexposition zu einer ausgeprägten Erhöhung der Albuminkonzentration in der Lunge. Die rauchinduzierte Beeinflussung der alveolaren Barriereintegrität konnte zudem mit verschiedenen *ex vivo* Experimenten, bei denen ausdifferenzierte alveolare Epithelzellen aus WT Mäusen Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, bestätigt werden. Durch die Rauchexposition kam es zu einer Abnahme der TEER Werte und zu einer Zunahme der FITC-Dextran Translokation vom apikalen in das basolaterale Kompartiment des Transwell-Kultursystems. Die Veränderungen dieser beiden Analyseparameter wurden auch bereits in anderen *in vitro* Studien verwendet, um eine

erhöhte Barrierepermeabilität für Ionen und Makromoleküle als Folge einer Zigarettenrauchexposition zu beschreiben [160, 235, 281].

Während die WT Mäuse durch den Einfluss von Zigarettenrauch einen Barrierschaden entwickelten, zeigten die RAGE^{-/-} Mäuse bereits im nativen Zustand einen Permeabilitätsdefekt. Der Albuminspiegel in Lungen unbehandelter RAGE^{-/-} Mäuse war im Vergleich zu den WT Mäusen um ein Vielfaches erhöht. Eine Exposition mit Zigarettenrauch führte in diesen Tieren zu einer weiteren leichten, aber nicht signifikanten Erhöhung der pulmonalen Albuminkonzentration, die auf dem Level von rauchexponierten WT Mäusen lag. In anderen Studien mit RAGE^{-/-} Mäusen konnten bisher keine vergleichbaren Beobachtungen gemacht werden [6, 265, 348]. Al-Robaiy et al. untersuchten die Lungen von nativen WT und RAGE^{-/-} Mäusen mit einem Alter von fünf, acht und 24 Monaten unter *ex vivo* Bedingungen hinsichtlich ihrer Kapillarpermeabilität. Hierzu wurden die Lungen zunächst aus dem Thorax entnommen und mit einem Puffer, der mit Fluoreszenz-markiertem Dextran versetzt war, perfundiert. Um die Kapillarpermeabilität zu analysieren, wurde schließlich der Übertritt des Fluoreszenz-markierten Dextrans aus dem Blut in die Lunge gemessen. Des Weiteren wurde bei den Lungen eine Lavage durchgeführt und der darin enthaltene Gehalt an Gesamtprotein bestimmt. Bei beiden Analysemethoden konnten jedoch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Mausgruppen festgestellt werden [6]. Reynolds et al. und Wood et al. verwendeten ebenfalls die Gesamtproteinmenge in der BALF zur Bestimmung der pulmovaskulären Permeabilität, jedoch konnten sie keine Unterschiede zwischen WT und RAGE^{-/-} Mäusen beobachten [265, 348]. Eine Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte in den verschiedenen Nachweismethoden liegen, die für die Charakterisierung der alveolaren Barriere verwendet wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Albuminkonzentration als Parameter verwendet und diese wurde, wie auch in anderen Studien beschrieben, mittels einem Antikörper-basiertem Nachweisverfahren bestimmt [160, 177, 343, 364]. Zur Analyse der Gesamtproteinmenge in der BALF nutzten die bereits erwähnten murinen Studien einen Bicinchoninsäure-Assay, bei dem die Proteinmenge über ein kalorimetrisches Verfahren ermittelt wurde [6, 265, 348]. Eine genaue Charakterisierung der Proteine ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich, wodurch nicht geklärt werden kann, ob die gemessenen Proteine wirklich aus dem Blutkompartiment stammen.

Einhergehend mit den *in vivo* Daten konnten auch bei alveolaren Epithelzellen, die aus RAGE^{-/-} Mäusen isoliert wurden, Veränderungen in den Barriereeigenschaften festgestellt werden. RAGE-defiziente Zellmonolayer bildeten während ihrer *ex vivo* Kultivierung auf Transwell-Einsätzen

deutlich geringere TEER aus als WT Zellen, was für eine höhere Durchlässigkeit für Ionen spricht. Durch die Zigarettenrauchexposition konnte zudem, genau wie im *in vivo* Experiment, keine weiteren Veränderungen der Barrierefunktion beobachtet werden.

Neben der erhöhten Ionenpermeabilität zeigten die alveolaren Epithelzellen aus RAGE^{-/-} Mäusen auch Veränderungen in den Expressionsmustern von verschiedenen Tight Junction Proteinen und Differenzierungsmarkern. Unterschiedliche Studien beschreiben, dass Alveolare Typ II Epithelzellen, die unter *ex vivo* Bedingungen auf Transwell-Einsätzen kultiviert werden, ihren Phänotyp verändern und charakteristische Eigenschaften von Alveolar Typ I Zellen annehmen [34, 73, 76, 113]. Durch die Kultivierung der Zellen auf mit EZM-Proteinen beschichteten Transwell-Membranen wird die Expression von typischen Alveolar Typ II Marker wie Surfactant Protein C oder D verringert. Gleichzeitig nimmt die Expression von beispielsweise AQP5 oder Caveolin-1 in den Zellen zu. Dabei handelt es sich um Proteine, die ausschließlich auf Alveolar Typ I Zellen zu finden sind [73, 76]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Surfactant Protein C und AQP5 mittels qRT-PCR analysiert. Sowohl in den Zellen, die aus WT Lungen isoliert wurden, als auch in den RAGE^{-/-} Zellen führte die Kultivierung zu einer signifikanten Abnahme der Surfactant Protein C Expression. In den Zellen aus WT Mäusen konnte zudem eine Hochregulation des Alveolar Typ I Markers AQP5 beobachtet werden, was eine Verschiebung der phänotypischen Eigenschaften der Zellen anzeigt. Eine solche Beobachtung konnte in den alveolaren Epithelzellen aus RAGE^{-/-} Mäusen nicht gemacht werden. In diesen Zellen war die Expression des AQP5 deutlich vermindert, was dafür spricht, dass die Transdifferenzierung von Alveolar Typ II in Alveolar Typ I Zellen unter *ex vivo* Bedingungen durch eine RAGE Defizienz gestört ist.

Zusätzlich zu den Differenzierungsmarkern wurden die alveolaren Epithelzellen auch hinsichtlich ihrer Tight Junction Proteine analysiert. Während bei einigen Proteinen wie beispielsweise ZO-1 oder Occludin kaum Unterschiede zu beobachten waren, zeigte das Expressionsprofil von Claudin 18 in den RAGE^{-/-} Zellen deutliche Veränderungen. Claudin 18 ist ein Protein, das in der Lunge ausschließlich auf den alveolaren Epithelzellen vorkommt und ist zudem das Claudin, welches auf den Alveolar Typ I Zellen am häufigsten exprimiert wird [183]. Da dieser Zelltyp den größten Teil der Alveolenoberfläche bedeckt und somit auch an der Ausbildung einer intakten Barriere maßgeblich beteiligt ist, untersuchten LaFemina et al. und Li et al. unabhängig voneinander Claudin 18 in Hinblick auf seine Beteiligung an der Barrierefunktion. In beiden

Studien konnte festgestellt werden, dass Claudin 18 für die Ausbildung und die Aufrechterhaltung der alveolaren Epithelbarriere von großer Bedeutung ist [184, 193]. Permeabilitätsstudien und elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Claudin 18-defizienten Mäusen zeigten, dass in den Tieren eine erhöhte Barrieredurchlässigkeit für Fluoreszenzmarkierte Tracermoleküle vorliegt und die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Alveolar Typ I Zellen nicht richtig ausgebildet sind. *In vitro* Experimente mit primären alveolaren Epithelzellen, die aus Claudin 18-defizienten Mäusen isoliert wurden oder bei denen ein Claudin 18 Knockdown mittels siRNA (small interfering RNA) durchgeführt wurde, bestätigten zudem eine Beteiligung von Claudin 18 an der Barrierefunktion. Eine Defizienz von Claudin 18 führte in den alveolaren Epithelzellen zu geringeren TEER Werten und zu einer erhöhten Durchlässigkeit von Makromolekülen [184, 193].

Die erhöhte Barrierepermeabilität in den RAGE^{-/-} Mäusen könnte folglich auf eine fehlerhafte Differenzierung der Alveolar Typ I Zellen zurückgeführt werden: Ist RAGE in der pulmonalen Entwicklungsphase nicht vorhanden, so werden Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen nicht richtig ausgebildet und die Alveolar Typ I Zellen können ihren Phänotyp nicht vollständig entwickeln [6, 76]. Die Expression von Claudin 18, das im großen Maße auf diesem Zelltyp exprimiert wird, ist bei deren fehlerhaften Differenzierung ebenfalls gestört. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Claudin 18 möglicherweise seine zentrale Rolle im parazellulären Transport der alveolaren Epithelzellen nicht mehr voll ausüben kann und es daher zu einem Barrieredefekt in den RAGE^{-/-} Mäusen kommt.

5.3. Die Rolle von IL-17C in einer bakteriell induzierten pulmonalen Entzündung

Akute Infektionen der Lunge sind global gesehen sehr weit verbreitete Erkrankungen, die jedes Jahr eine hohe Anzahl an Todesfällen verursachen [216]. Zu den am häufigsten auftretenden akuten Atemwegsinfektionen gehört die Pneumonie, die in vielen Fällen durch Bakterien hervorgerufen wird [159, 169, 224, 252]. Ein charakteristisches Merkmal der Pneumonie sind Entzündungsprozesse, die eine wichtige Funktion in der Pathogenabwehr übernehmen [43]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Zytokin IL-17C im Darm und in der Niere an inflammatorischen Abwehrmechanismen gegen mikrobielle Pathogene beteiligt ist [144, 303].

Eine Untersuchung der IL-17C Expression im Bronchialepithel von Patienten mit unterschiedlichen respiratorischen Erkrankungen ergab zudem, dass IL-17C in Patienten exprimiert wird, die an Zystischer Fibrose oder COPD leiden [245]. Ein Kennzeichen beider Erkrankungen ist die chronische Inflammation der Atemwege, die durch Bakterien hervorgerufen wird [110, 292]. Über die Beteiligung von IL-17C an akuten pulmonalen Entzündungsprozessen, wie sie bei einer durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen nosokomialen Pneumonie auftreten, ist momentan noch nichts bekannt. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe eines akuten Pneumoniemodells die Funktion von IL-17C in einer bakteriell induzierten pulmonalen Inflammation analysiert. Hierbei wurden neben WT Mäusen auch IL-17C- und IL-17A-defiziente Mäuse in die Analyse einbezogen.

5.3.1. Mausmodell einer *P. aeruginosa* induzierten Pneumonie

P. aeruginosa ist ein opportunistischer Erreger, der für sehr viele Infektionen des respiratorischen Systems verantwortlich ist. Während das Bakterium in ambulant erworbenen Pneumonien eher eine untergeordnete Rolle spielt [7], ist *P. aeruginosa* ein Hauptverursacher von nosokomialen Infektionen [176, 243, 274, 344]. Ein hohes Risiko eine nosokomiale *P. aeruginosa* Infektion zu erwerben, besteht unter anderem bei tracheotomierten Patienten, die maschinell beatmet werden [259]. Patienten, die in Folge einer Organtransplantation Immunsuppressiva einnehmen müssen oder auch Patienten, die an einer HIV Infektion leiden und über ein abgeschwächtes Immunsystem verfügen, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko an einer *P. aeruginosa* Infektion zu erkranken [2, 274]. Nosokomiale Pneumonien sind durch eine extensive lokale und systemische Inflammation gekennzeichnet, die in vielen Fällen zu Lungenschäden, einer Sepsis oder sogar zu dem Tod des Patienten führt [176, 344].

Um molekulare Mechanismen zu analysieren, die eine inflammatorische Antwort in Folge einer schweren bakteriellen Infektion der Lunge vermitteln, wurde in dieser Arbeit ein akutes murines Pneumoniemodell verwendet. Hierzu wurden die Mäuse für 24 Stunden mit dem *P. aeruginosa* Stamm PAO1 intranasal infiziert. Für die Infektion wurden sowohl lebendige als auch hitzeinaktivierte Bakterien verwendet. Durch die Applikation der Bakterien konnte in den Mäusen ein starker Einstrom von Leukozyten beobachtet werden, der hauptsächlich durch eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge verursacht wurde. Das vermehrte Vorkommen von neutrophilen Granulozyten ist ein typisches Kennzeichen einer *P. aeruginosa*

induzierten Pneumonie [217, 274] und konnte auch bereits in anderen akuten murinen Infektionsmodellen beobachtet werden [25, 84, 223, 352]. So zeigten beispielsweise Beisswenger et al., dass eine zweitägige Vorbehandlung der Mäuse mit dem Antibiotikum Moxifloxazin eine durch *P. aeruginosa* induzierte pulmonale Neutrophilie deutlich verringern konnte. Des Weiteren führte die Moxifloxazin-Behandlung zu einer reduzierten pulmonalen Sezernierung von proinflammatorischen Mediatoren wie KC, IL-1 β oder IL-17A [25]. Die vermehrte Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, die für eine Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen und für eine Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion benötigt werden, ist ein weiteres Kennzeichen einer bakteriell induzierten pulmonalen Infektion [33, 187, 217, 274]. In der vorliegenden Studie konnte in den infizierten Mäusen ebenfalls erhöhte pulmonale Konzentrationen der entzündungsfördernden Botenstoffe TNF α , KC, MIP-2, IL-6 und IL-17A festgestellt werden. Des Weiteren führte die Infektion mit *P. aeruginosa* zu einer ausgeprägten systemischen Inflammation, die sich in dieser Arbeit anhand von erhöhten IL-6 Konzentrationen im Blut darstellte.

5.3.2. IL-17C wird von Lungeneithelzellen nach Kontakt mit Bakterien exprimiert

Studien zeigen, dass die Expression von IL-17C in Epithelzellen des Darms [255, 303], der Niere [144] und der Haut [241, 255] nach einer Erkennung von pathogenen Mikroorganismen über PRRs wie TLRs induziert wird. Um zu untersuchen, wodurch eine IL-17C Expression im pulmonalen Gewebe hervorgerufen wird, wurden Mäuse mit lebendigen *P. aeruginosa* infiziert oder Zigarettenrauch und vernebelten, hitzeinaktivierten NTHi exponiert. qRT-PCR Analysen der murinen Lungen zeigten, dass es nach einer Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen bzw. einer Infektion mit lebendigen Bakterien zu einer Induktion der IL-17C Expression kam. Im Vergleich dazu verursachte eine Zigarettenrauchexposition der Mäuse keine messbare Induktion der pulmonalen IL-17C Expression. In vorangegangenen *in vitro* Studien wurde bereits beschrieben, dass IL-17C von bronchialen Epithelzellen exprimiert werden kann [181, 245]. So zeigten beispielsweise Pfeifer et al., dass eine Stimulation mit *P. aeruginosa*, *H. influenzae* und Flagellin zu einer gesteigerten Expression und Abgabe von IL-17C in humanen bronchialen Atemwegsepithelzellen führte [245]. Um zu überprüfen, ob auch andere pulmonale Zelltypen wie Alveolarmakrophagen und alveolare Epithelzellen IL-17C exprimieren, wurden diese Zellen aus murinen Lungen gewonnen, *ex vivo* kultiviert und mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* stimuliert.

Alveolarmakrophagen zeigten genau wie Monozyten, Lymphozyten oder andere Vertreter der hematopoetischen Zelllinie keine IL-17C Expression [41, 255, 303]. Im Gegensatz dazu konnte in den polarisierten alveolaren Epithelzellen nach der bakteriellen Stimulation eine deutliche Induktion von IL-17C mRNA beobachtet werden. Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass IL-17C durch autokrine Stimulation humane bronchiale Epithelzellen aktivieren kann [181, 245]. Auch in dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass IL-17C epitheliale Entzündungsprozesse verstärkt. Durch eine Stimulation der alveolaren Epithelzellen mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* kam es zu einer Sezernierung des neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokines KC. Wurden die Zellen noch zusätzlich mit rekombinantem IL-17C stimuliert, so konnte eine Verstärkung der Chemokinfreisetzung beobachtet werden. Es zeigte sich zudem, dass die IL-17C Rezeptoren IL-17RE und IL-17RA, die einen IL-17C spezifischen heterogenen Rezeptorkomplex ausbilden [46, 255, 303], von *ex vivo* kultivierten Alveolarepithelzellen exprimiert werden. IL-17C ist also ein Zytokin, das in Folge einer bakteriellen Infektion der Lunge in bronchialen und alveolaren Epithelzellen induziert wird und die epitheliale Freisetzung von entzündlichen Botenstoffen auf autokrine Art und Weise beeinflusst.

5.3.3. IL-17C reguliert die pulmonale Entzündungsreaktion in einer *P. aeruginosa* induzierten Pneumonie

Eine durch *P. aeruginosa* hervorgerufene nosokomiale Pneumonie ist durch eine starke Freisetzung von Entzündungsmediatoren und einem massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet [33, 187, 217, 274, 344]. Um herauszufinden, welche Funktion der epitheliale Faktor IL-17C bei dem durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen pulmonalem Entzündungsgeschehen übernimmt, wurden WT und IL-17C^{-/-} Mäuse in einem akuten Pneumoniemodell analysiert. Als Reaktion auf die intranasale Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* des Stammes PAO1 konnten in den Lungen der WT und IL-17C^{-/-} Mäusen signifikant erhöhte Konzentrationen von KC, MIP-2, IL-6, TNF α und IL-17A detektiert werden. Vergleichbare Zytokin- und Chemokinfreisetzungen wurden auch in anderen murinen Infektionsstudien mit PAO1 beobachtet [25, 230, 346]. Während die IL-17C Defizienz keinen Einfluss auf die Abgabe von TNF α , IL-6 und IL-17A in der Lunge hatte, waren die mRNA Expression und Proteinkonzentrationen der neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden

Chemokine KC und MIP-2 in den Lungen der IL-17C^{-/-} Mäusen signifikant verringert. Damit einhergehend konnte in den IL-17C^{-/-} Mäusen eine deutlich verminderte Menge an rekrutierten Leukozyten festgestellt werden, was hauptsächlich auf einen abgeschwächten Einstrom von neutrophilen Granulozyten zurückzuführen war. Dass IL-17C an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist, die zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge führen, wurde bereits beschrieben. Durch die intranasale Applikation eines Adenovirus, der IL-17C exprimiert, konnten Hurst et al. in den Lungen von Mäusen eine massive Neutrophilie hervorrufen [147].

Zusätzlich zu der Infektion mit lebendigen Bakterien wurden WT und IL-17C^{-/-} Mäuse auch mit hitzeinaktivierten PAO1 stimuliert. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise sollte die pulmonale Inflammation unabhängig von der bakteriellen Vitalität analysiert werden. Im Vergleich zu der Infektion mit lebendigen PAO1 war die pulmonale Entzündung in den Mäusen, die mit hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert wurden, etwas geringer ausgeprägt. Die Analyse der proinflammatorischen Mediatoren KC, MIP-2 und IL-17A in der BALF und im Lungenhomogenisat ergaben deutlich niedrigere Konzentrationen. Zudem war die Anzahl der rekrutierten Leukozyten in der BALF der Mäuse leicht verringert. Wie bei der Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* war die Expression von KC und MIP-2 sowie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach einer Stimulation mit inaktivierten Bakterien in den IL-17C^{-/-} Mäusen vermindert. IL-17C vermittelt folglich auch unabhängig von der Lebensfähigkeit der *P. aeruginosa* pulmonale Entzündung, indem es die Abgabe der neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokine KC und MIP-2 induziert.

Neben einer erhöhten lokalen Inflammation sind nosokomiale *P. aeruginosa* induzierte Pneumonien auch durch extensive systemische Entzündungen gekennzeichnet [176, 344]. Zur Bestimmung der systemischen Inflammation wurde das Zytokin IL-6 im Plasma der Mäuse bestimmt. Durch die bakterielle Infektion kam es in beiden Mausstämmen zu einem Anstieg der IL-6 Konzentrationen. Im Vergleich zu den WT Mäusen fiel die IL-6 Freisetzung in den IL-17C^{-/-} Mäusen jedoch deutlich schwächer aus. Die verminderte systemische Inflammation war zudem mit einer verbesserten Überlebensrate der Mäuse assoziiert. Während in der Gruppe der IL-17C^{-/-} Mäuse 48 Stunden nach der *P. aeruginosa* Infektion noch alle Tiere am Leben waren, lag die Überlebensquote bei den WT Mäusen bei lediglich 25%. Eine Studie zu IL-17C und seiner Funktion in einer systemischen Pilzinfektion ergab vergleichbare Beobachtungen. In der Arbeit von Huang et al. wurden WT und IL-17C^{-/-} Mäuse systemisch mit dem Pilz *Candida albicans*

infiziert. Die IL-17C^{-/-} Mäuse zeigten auch in diesem Versuchsaufbau signifikant verminderte IL-6 Konzentrationen im Serum, was mit einer verringerten Sterblichkeit der Mäuse assoziiert war. Die Keimbelastung der Mäuse mit *C. albicans* war dabei, genau wie bei der Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* in dieser Studie, durch die IL-17C Defizienz nicht beeinflusst [144].

Im Falle einer mikrobiellen Infektion müssen pro- und antiinflammatorische Signalkaskaden in einem ausbalancierten Verhältnis zueinander stehen [213]. Proinflammatorische Signale sind wichtig, um die Beseitigung der eingedrungenen Pathogene zu gewährleisten. Zu hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Entzündungsmediatoren können aber auch zu einer Schädigung des umgebenden Gewebes führen [329]. Aus diesem Grund müssen im Verlauf der Entzündungsreaktion auch antiinflammatorische Signale ausgesendet bzw. proinflammatorische Signale inhibiert werden, um eine unkontrollierte Entzündungsreaktion zu verhindern [290].

In verschiedenen murinen Pneumoniestudien konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Inhibierung von proinflammatorischen Signalen vorteilhaft auf den Verlauf einer schweren *P. aeruginosa* induzierten Infektion der Lunge auswirkt [58, 223, 288, 333, 346]. Die Inhibierung von IL-1 β oder die Blockade der Signalkaskade, welche für die Aktivierung von IL-1 β benötigt wird, führten z.B. zu einer weniger stark ausgeprägten Lungenpathologie und zu einer besseren Klärung der *P. aeruginosa* [58, 288, 333, 346]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Applikation des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 einen positiven Einfluss auf eine *P. aeruginosa* Infektion ausübte. Eine intraperitoneale Verabreichung von rekombinantem IL-10 förderte das Überleben der infizierten Mäuse und verringerte die Ausbildung eines bakteriell induzierten Lungenschadens [50, 280]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion von IL-17C ebenfalls die Ausbildung einer Hyperinflammation verhindert. Ein Knockout von IL-17C verringert, wie bereits beschrieben, die systemische Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und eine damit verbundene erhöhte Mortalitätsrate sowie die neutrophile Entzündung der Lunge. IL-17C scheint daher ein Faktor zu sein, der bei einer schweren *P. aeruginosa* Pneumonie den Übergang einer lokalen Entzündung in eine Sepsis vorantreibt.

Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass im Falle einer bakteriell induzierten pulmonalen Inflammation nicht ausschließlich eingewanderte Leukozyten das Entzündungsgeschehen kontrollieren. Lungenepithelzellen leisten ebenfalls einen wichtigen Beitrag, indem sie über die Expression von IL-17C die Freisetzung von Zytokinen und

Chemokinen regulieren und dadurch die Rekrutierung von Entzündungszellen an den Herd der Infektion fördern.

5.3.4. IL-17A beeinflusst die durch *P. aeruginosa* induzierte pulmonale Inflammation über die Regulation von IL-17C

Wie bereits beschrieben, gehören IL-17C und IL-17A zu der gleichen Zytokinfamilie [151, 221]. Über IL-17A ist bekannt, dass es an der Pathogenese von unterschiedlichen inflammatorischen Erkrankungen des respiratorischen Systems wie Asthma, COPD oder Zystische Fibrose beteiligt ist [228, 270, 317]. In der Lunge wird IL-17A von vielen verschiedenen Zelltypen freigesetzt und vermittelt die Rekrutierung von Immunzellen [84, 124, 198, 202, 223, 302]. Neuere *in vivo* Studien haben gezeigt, dass IL-17A auch in *P. aeruginosa* induzierten Infektionen und im ARDS (acute respiratory distress syndrome) Modell eine wichtige Rolle bei der Modellierung von inflammatorischen Prozessen übernimmt [83, 198, 203, 223, 347, 352]. Liu et al. verwendeten beispielsweise einen neutralisierenden Antikörper, um den Einfluss von IL-17A bei einer *P. aeruginosa* induzierten Infektion zu unterdrücken. Durch die Inhibierung des IL-17A Signals konnten die Autoren eine verringerte Zytokinfreisetzung und einen deutlich reduzierten Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das pulmonale Gewebe feststellen [198]. Vergleichbare Beobachtungen konnten auch mit einem neutralisierenden Antikörper gemacht werden, der gegen $\gamma\delta$ T-Zellen gerichtet war, welche für die Abgabe von IL-17A zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion verantwortlich sind [199]. Des Weiteren zeigten Untersuchungen mit IL-17A^{-/-} Mäusen, dass IL-17A während einer Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge fördert, indem es die Freisetzung von KC induziert [223, 347, 352]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Studie mit IL-17A^{-/-} und WT Mäusen zeigte zudem, dass auch bei einer Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* IL-17A benötigt wird, um die Freisetzung der neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokine zu induzieren und einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten zu verstärken. Die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-17A werden daher unabhängig von der Lebensfähigkeit der Bakterien vermittelt.

IL-17A und IL-17C übernehmen folglich in bakteriell induzierten Entzündungen nahezu die gleiche Funktion, indem sie die Sezernierung von KC und MIP-2 fördern und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus der Blutzirkulation in die Lunge unterstützen. Aus diesem

Grund stellte sich die Frage, ob die inflammatorischen Prozesse von IL-17A und IL-17C gemeinsam vermittelt werden und ob sich beide Zytokine gegenseitig regulieren können. Die *in vivo* Experimente zeigten, dass eine IL-17C Defizienz keinen Einfluss auf die Freisetzung von IL-17A hatte. Folglich wird die IL-17A Abgabe im akuten Entzündungsgeschehen nicht durch IL-17C reguliert. Im Gegensatz dazu war die Expression von IL-17C nach einer Infektion mit *P. aeruginosa* in IL-17A^{-/-} Mäusen vermindert. Um weiter zu analysieren, ob IL-17A die Expression von IL-17C in der Lunge reguliert, wurden primäre murine alveolare Epithelzellen mit rekombinantem IL-17A, TNF α und der Kombination der beiden Zytokine stimuliert. Hierbei konnte beobachtet werden, dass IL-17A alleine ohne die Anwesenheit von bakteriellen Substanzen eine IL-17C Expression induzieren konnte. Die Applikation von TNF α konnte eine solche Induktion nicht hervorrufen, allerdings konnte TNF α die durch IL-17A induzierte Expression noch zusätzlich verstärken. In einer *in vitro* Studie mit humanen intestinalen Epithelzellen wurde eine vergleichbare Beobachtung gemacht. Während die alleinige Verabreichung von IL-17A oder TNF α keine IL-17C mRNA Expression induzieren konnte, führte eine kombinierte Stimulation zu deutlich erhöhten IL-17C mRNA Levels [100]. Aufgrund dieser Beobachtungen kann gefolgert werden, dass IL-17A in der proinflammatorischen Signalkaskade oberhalb von IL-17C lokalisiert ist und dessen Expression regulieren kann. Über die IL-17A-IL-17C-Achse verstärken IL-17A exprimierende Entzündungszellen die Abgabe von inflammatorischen Mediatoren in Lungenepithelzellen. Inwiefern epitheliales IL-17C selbst wiederum auf IL-17RE exprimierende Immunzellen wie T-Lymphozyten [46, 145] bei einer Infektion der Lunge wirkt, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Dass IL-17A die pulmonale Entzündung in Folge einer durch *P. aeruginosa* induzierten Infektion aber nicht nur über IL-17C reguliert, kann anhand der Ergebnisse der Lungenpathologie festgestellt werden. Während eine IL-17C Defizienz keinen Einfluss auf pathologische Veränderungen des pulmonalen Gewebes hatte, konnte in IL-17A^{-/-} und WT Mäusen ein deutlicher Unterschied in der histologischen Bewertung des inflammatorischen Lungenschadens festgestellt werden [203]. Eine IL-17A vermittelte Entzündung unabhängig von IL-17C ist folglich für die Ausbildung eines *P. aeruginosa* induzierten Lungenschadens verantwortlich. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass IL-17A auch einen direkten Einfluss auf Epithelzellen ausüben kann und unabhängig von IL-17C und seinem Rezeptor IL-17RE in der Lage ist eine epitheliale Expression von Entzündungsmediatoren zu induzieren [106].

5.4. Schlussbemerkung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die beiden epithelialen Faktoren RAGE und IL-17C an zigarettenrauch- und bakteriell induzierten Entzündungsprozessen in der Lunge beteiligt sind.

Die Analysen ergaben, dass es sich bei RAGE um ein wichtiges Protein handelt, das unter physiologischen Bedingungen die Differenzierung von alveolaren Epithelzellen und die damit verbundene Entwicklung und Aufrechterhaltung der strukturellen und biomechanischen Eigenschaften der Lunge reguliert. Durch Verwendung von akuten und chronischen Zigarettenrauchexpositionsmo­dellen konnte eine Beteiligung von RAGE an der Freisetzung von inflammatorischen Botenstoffen und an der Rekrutierung von Entzündungszellen festgestellt werden. Zudem ist RAGE in die rauchinduzierten Veränderungen der Lungenmechanik, nicht aber in die Entstehung eines strukturellen emphysemartigen Lungenschadens, involviert.

Dem Zytokin IL-17C konnte hingegen keine Funktion in rauchinduzierten Entzündungsprozessen zugeschrieben werden. IL-17C wird von den Epithelzellen der Lunge erst nach einem bakteriellen Pathogenkontakt oder durch den Einfluss von IL-17A exprimiert. Im Falle einer *P. aeruginosa* Pneumonie ist IL-17C an der epithelialen Sezernierung von Chemokinen beteiligt und verstärkt dadurch die pulmonale Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie die Ausbildung einer systemischen Entzündungsreaktion.

6. Literaturverzeichnis

1. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2004;30(5):627-34.
2. Afessa B, Green B. Bacterial pneumonia in hospitalized patients with HIV infection: the Pulmonary Complications, ICU Support, and Prognostic Factors of Hospitalized Patients with HIV (PIP) Study. *Chest*. 2000;117(4):1017-22.
3. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-93.
4. Akinbi HT, Epaud R, Bhatt H, Weaver TE. Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice. *Journal of immunology*. 2000;165(10):5760-6.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
6. Al-Robaiy S, Weber B, Simm A, Diez C, Rolewska P, Silber RE, et al. The receptor for advanced glycation end-products supports lung tissue biomechanics. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;305(7):L491-500.
7. Almirall J, Bolibar I, Vidal J, Sauca G, Coll P, Niklasson B, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *The European respiratory journal*. 2000;15(4):757-63.
8. Amatngalim GD, Broekman W, Daniel NM, van der Vlugt LE, van Schadewijk A, Taube C, et al. Cigarette Smoke Modulates Repair and Innate Immunity following Injury to Airway Epithelial Cells. *PloS one*. 2016;11(11):e0166255.
9. Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 2001;16:126-30.
10. Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, et al. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(5):787-97.
11. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(16):9541-6.
12. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory research*. 2000;1(3):141-50.

13. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *The European respiratory journal*. 2004;23(2):327-33.
14. Baraldo S, Turato G, Saetta M. Pathophysiology of the small airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2012;84(2):89-97.
15. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *The European respiratory journal*. 2003;22(4):672-88.
16. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *Copd*. 2004;1(1):59-70.
17. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):515-48.
18. Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS medicine*. 2004;1(1):e20.
19. Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;41(6):631-8.
20. Bartling B, Hofmann HS, Weigle B, Silber RE, Simm A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):293-301.
21. Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*. 2002;105(7):816-22.
22. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(38):29731-6.
23. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest*. 2003;123(4):1240-7.
24. Beisswenger C, Platz J, Seifart C, Vogelmeier C, Bals R. Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2004;71(4):402-9.
25. Beisswenger C, Honecker A, Kamyschnikow A, Bischoff M, Tschernig T, Bals R. Moxifloxacin modulates inflammation during murine pneumonia. *Respiratory research*. 2014;15:82.
26. Bezerra FS, Valenca SS, Pires KM, Lanzetti M, Pimenta WA, Schmidt AC, et al. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011;177(2):120-6.
27. Bianchi R, Kastrisianaki E, Giambanco I, Donato R. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(9):7214-26.
28. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001;50(12):2792-808.

29. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine*. 2005;83(11):876-86.
30. Birchler T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *European journal of immunology*. 2001;31(11):3131-7.
31. Birrell MA, Wong S, Hele DJ, McCluskie K, Hardaker E, Belvisi MG. Steroid-resistant inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease is associated with a lack of nuclear factor-kappaB pathway activation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(1):74-84.
32. Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth PP, Martin E, et al. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Critical care*. 2008;12(1):201.
33. Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, et al. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013;17(2):e76-83.
34. Borok Z, Danto SI, Lubman RL, Cao Y, Williams MC, Crandall ED. Modulation of t1 alpha expression with alveolar epithelial cell phenotype in vitro. *The American journal of physiology*. 1998;275(1 Pt 1):L155-64.
35. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
36. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(5):1720-45.
37. Bracke KR, D'Hulst A I, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *Journal of immunology*. 2006;177(7):4350-9.
38. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5663):1532-5.
39. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(7):1117-28.
40. Burns AR, Hosford SP, Dunn LA, Walker DC, Hogg JC. Respiratory epithelial permeability after cigarette smoke exposure in guinea pigs. *Journal of applied physiology*. 1989;66(5):2109-16.
41. Butcher MJ, Waseem TC, Galkina EV. Smooth Muscle Cell-Derived Interleukin-17C Plays an Atherogenic Role via the Recruitment of Proinflammatory Interleukin-17A+ T Cells to the Aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016;36(8):1496-506.

42. Castro P, Legora-Machado A, Cardilo-Reis L, Valenca S, Porto LC, Walker C, et al. Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *European journal of pharmacology*. 2004;498(1-3):279-86.
43. Cazzola M, Matera MG, Pezzuto G. Inflammation--a new therapeutic target in pneumonia. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2005;72(2):117-26.
44. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, et al. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):13915-20.
45. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*. 2003;4(7):702-7.
46. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity*. 2011;35(4):611-21.
47. Chaput C, Sander LE, Suttorp N, Opitz B. NOD-Like Receptors in Lung Diseases. *Frontiers in immunology*. 2013;4:393.
48. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(10):1507-15.
49. Chen L, Wang T, Guo L, Shen Y, Yang T, Wan C, et al. Overexpression of RAGE contributes to cigarette smoke-induced nitric oxide generation in COPD. *Lung*. 2014;192(2):267-75.
50. Chmiel JF, Konstan MW, Knesebeck JE, Hilliard JB, Bonfield TL, Dawson DV, et al. IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas* infection in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(6):2040-7.
51. Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest*. 2004;125(1):71-6.
52. Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *International journal of inflammation*. 2013;2013:403460.
53. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal Supplement*. 2001;34:50s-9s.
54. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *The European respiratory journal*. 2008;31(6):1334-56.
55. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(6):849-54.
56. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(8):1083-9.

57. Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax*. 2007;62(8):706-13.
58. Cohen TS, Prince AS. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1630-7.
59. Cole AM, Thapa DR, Gabayan V, Liao HI, Liu L, Ganz T. Decreased clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from airways of mice deficient in lysozyme M. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(5):1081-5.
60. Correa RG, Milutinovic S, Reed JC. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Bioscience reports*. 2012;32(6):597-608.
61. Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(5 Pt 2):S21-5.
62. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2009;360(23):2445-54.
63. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS letters*. 1995;368(1):173-6.
64. Crapo JD, Young SL, Fram EK, Pinkerton KE, Barry BE, Crapo RO. Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *The American review of respiratory disease*. 1983;128(2 Pt 2):S42-6.
65. Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M, Aubier M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(2):731-40.
66. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(7):772-7.
67. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):479-89.
68. D'Hulst A I, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *The European respiratory journal*. 2005;26(2):204-13.
69. Dahlin K, Mager EM, Allen L, Tigue Z, Goodglick L, Wadehra M, et al. Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2004;31(3):309-16.
70. Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CW, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*. 2007;46(23):6957-70.
71. Daum N, Kuehn A, Hein S, Schaefer UF, Huwer H, Lehr CM. Isolation, cultivation, and application of human alveolar epithelial cells. *Methods in molecular biology*. 2012;806:31-42.

72. Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature medicine*. 2003;9(7):907-13.
73. Demaio L, Tseng W, Balverde Z, Alvarez JR, Kim KJ, Kelley DG, et al. Characterization of mouse alveolar epithelial cell monolayers. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296(6):L1051-8.
74. Demedts IK, Bracke KR, Maes T, Joos GF, Brusselle GG. Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(3):387-93.
75. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory research*. 2006;7:53.
76. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell and tissue research*. 2006;323(3):475-88.
77. Desch AN, Henson PM, Jakubzick CV. Pulmonary dendritic cell development and antigen acquisition. *Immunologic research*. 2013;55(1-3):178-86.
78. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(4):1277-85.
79. Diamond G, Beckloff N, Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *Journal of dental research*. 2008;87(10):915-27.
80. Drinda S, Franke S, Ruster M, Petrow P, Pullig O, Stein G, et al. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2005;25(6):411-3.
81. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005;60(4):293-300.
82. Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, et al. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(10):5296-301.
83. Dubin PJ, Kolls JK. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(2):L519-28.
84. Dubin PJ, Martz A, Eisenstatt JR, Fox MD, Logar A, Kolls JK. Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and immunity*. 2012;80(1):398-409.
85. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1758(9):1408-25.

86. Eddens T, Kolls JK. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Current opinion in immunology*. 2012;24(4):424-30.
87. Eisele NA, Anderson DM. Host Defense and the Airway Epithelium: Frontline Responses That Protect against Bacterial Invasion and Pneumonia. *Journal of pathogens*. 2011;2011:249802.
88. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;125(4):615-28.
89. Ezzati M. Indoor air pollution and health in developing countries. *Lancet*. 2005;366(9480):104-6.
90. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*. 2010;363(23):2233-47.
91. Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Shearman MS, Schuh D, Muller M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cellular and molecular biology*. 1998;44(7):1147-57.
92. Fehrenbach H. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2002;70(5):277-83.
93. Fehrenbach H. Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective. *European Respiratory Review*. 2006;15(101):136-47.
94. Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, Thibaudeau O, Grandsaigne M, Maret M, et al. Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(9):917-27.
95. Ferkol T, Schraufnagel D. The global burden of respiratory disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014;11(3):404-6.
96. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152(5 Pt 1):1666-72.
97. Fischer BM, Voynow JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(4):447-52.
98. Fleming A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*. 1922;93(653):306-17.
99. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2593-603.
100. Friedrich M, Diegelmann J, Schauber J, Auernhammer CJ, Brand S. Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal immunology*. 2015;8(4):943-58.

101. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(12):625-32.
102. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sorensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infection and immunity*. 1999;67(5):2561-6.
103. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Lukic IK, Socher I, et al. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood*. 2010;116(5):841-9.
104. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. 2007;176(2):231-41.
105. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*. 2008;43(3):402-7.
106. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):556-67.
107. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):693-7.
108. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(6):848-54.
109. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 2013;67(3):159-73.
110. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*. 1991;4(1):35-51.
111. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(11):8869-72.
112. Gomes M, Teixeira AL, Coelho A, Araujo A, Medeiros R. The role of inflammation in lung cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;816:1-23.
113. Gonzalez R, Yang YH, Griffin C, Allen L, Tigue Z, Dobbs L. Freshly isolated rat alveolar type I cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(1):L179-89.
114. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*. 2013;38(5):855-69.
115. Greene CM, McElvaney NG. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2005;53(5):418-27.
116. Grimm S, Ott C, Horlacher M, Weber D, Hohn A, Grune T. Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1. *The Biochemical journal*. 2012;448(1):127-39.

117. Grubor B, Meyerholz DK, Ackermann MR. Collectins and cationic antimicrobial peptides of the respiratory epithelia. *Veterinary pathology*. 2006;43(5):595-612.
118. Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(9):974-80.
119. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(11):2568-73.
120. Ha HL, Wang H, Pisitkun P, Kim JC, Tassi I, Tang W, et al. IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(33):E3422-31.
121. Hallstrand TS, Hackett TL, Altemeier WA, Matute-Bello G, Hansbro PM, Knight DA. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clinical immunology*. 2014;151(1):1-15.
122. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;22(6):714-21.
123. Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(1):183-94.
124. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*. 2005;6(11):1123-32.
125. Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infection and immunity*. 2002;70(2):953-63.
126. Hasenberg M, Stegemann-Koniszewski S, Gunzer M. Cellular immune reactions in the lung. *Immunological reviews*. 2013;251(1):189-214.
127. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
128. Hashimoto S, Pittet JF, Hong K, Folkesson H, Bagby G, Kobzik L, et al. Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections. *The American journal of physiology*. 1996;270(5 Pt 1):L819-28.
129. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(9):654-65.
130. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277(5334):2002-4.
131. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJ. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *The European respiratory journal*. 2012;39(2):419-28.

132. Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, de Bruin HG, Zijlstra GJ, van der Vaart H, et al. Cigarette smoke-induced damage-associated molecular pattern release from necrotic neutrophils triggers proinflammatory mediator release. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2015;52(5):554-62.
133. Hess C, Herr C, Beisswenger C, Zakharkina T, Schmid RM, Bals R. Myeloid RelA regulates pulmonary host defense networks. *The European respiratory journal*. 2010;35(2):343-52.
134. Hiemstra PS, McCray PB, Jr., Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *The European respiratory journal*. 2015;45(4):1150-62.
135. Hiraiwa K, van Eeden SF. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:619523.
136. Hirota JA, Hirota SA, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Beck PL, et al. The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(4):1116-25.e6.
137. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97(7):889-901.
138. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004;364(9435):709-21.
139. Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annual review of pathology*. 2009;4:435-59.
140. Hoppstadter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, et al. Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respiratory research*. 2010;11:124.
141. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(43):25752-61.
142. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(4):394-418.
143. Hsia CC, Hyde DM, Weibel ER. Lung Structure and the Intrinsic Challenges of Gas Exchange. *Comprehensive Physiology*. 2016;6(2):827-95.
144. Huang J, Meng S, Hong S, Lin X, Jin W, Dong C. IL-17C is required for lethal inflammation during systemic fungal infection. *Cellular & molecular immunology*. 2016;13(4):474-83.
145. Huang J, Yuan Q, Zhu H, Yin L, Hong S, Dong Z, et al. IL-17C/IL-17RE Augments T Cell Function in Autoimmune Hepatitis. *Journal of immunology*. 2017;198(2):669-80.
146. Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V, et al. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-

- stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(49):34457-68.
147. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *Journal of immunology*. 2002;169(1):443-53.
 148. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(2):81-93.
 149. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(28):19919-24.
 150. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS letters*. 2003;550(1-3):107-13.
 151. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011;34(2):149-62.
 152. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*. 2015;16(4):343-53.
 153. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20388-93.
 154. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging microbes & infections*. 2013;2(9):e60.
 155. Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *The British journal of dermatology*. 2009;160(2):319-24.
 156. John G, Kohse K, Orasche J, Reda A, Schnelle-Kreis J, Zimmermann R, et al. The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clinical science*. 2014;126(3):207-21.
 157. Johnston A, Fritz Y, Dawes SM, Diaconu D, Al-Attar PM, Guzman AM, et al. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *Journal of immunology*. 2013;190(5):2252-62.
 158. Jones JG, Minty BD, Lawler P, Hulands G, Crawley JC, Veall N. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet*. 1980;1(8159):66-8.
 159. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;51 Suppl 1:S81-7.
 160. Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Wolf A, Voss M, Wolf L, et al. Cigarette smoke-induced disruption of pulmonary barrier and bacterial translocation drive tumor-associated inflammation and growth. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015;309(6):L605-13.

161. Kalanuria AA, Ziai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Critical care*. 2014;18(2):208.
162. Kanazawa H, Tochino Y, Asai K, Ichimaru Y, Watanabe T, Hirata K. Validity of HMGB1 measurement in epithelial lining fluid in patients with COPD. *European journal of clinical investigation*. 2012;42(4):419-26.
163. Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *Journal of immunology*. 2004;173(5):3482-91.
164. Karimi R, Tornling G, Grunewald J, Eklund A, Skold CM. Cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid in smokers is dependent on cumulative smoking history. *PloS one*. 2012;7(3):e34232.
165. Kaufmann SH, Dorhoi A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions. *Current opinion in immunology*. 2013;25(4):441-9.
166. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):530-4.
167. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of leukocyte biology*. 2013;94(1):55-68.
168. Kirby AC, Coles MC, Kaye PM. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. *Journal of immunology*. 2009;183(3):1983-9.
169. Knapp S. LPS and bacterial lung inflammation models. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2009;6(4):113-8.
170. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):571-7.
171. Koh AY, Priebe GP, Ray C, Van Rooijen N, Pier GB. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and immunity*. 2009;77(12):5300-10.
172. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scandinavian journal of immunology*. 2005;61(1):1-9.
173. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
174. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(4):279-89.
175. Kooguchi K, Hashimoto S, Kobayashi A, Kitamura Y, Kudoh I, Wiener-Kronish J, et al. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and immunity*. 1998;66(7):3164-9.
176. Koulenti D, Lisboa T, Brun-Buisson C, Krueger W, Macor A, Sole-Violan J, et al. Spectrum of practice in the diagnosis of nosocomial pneumonia in patients requiring

- mechanical ventilation in European intensive care units. *Critical care medicine*. 2009;37(8):2360-8.
177. Kovach MA, Ballinger MN, Newstead MW, Zeng X, Bhan U, Yu FS, et al. Cathelicidin-related antimicrobial peptide is required for effective lung mucosal immunity in Gram-negative bacterial pneumonia. *Journal of immunology*. 2012;189(1):304-11.
178. Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annual review of physiology*. 2013;75:551-67.
179. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens*. 2015;11(3):e1004651.
180. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2007;55(5):443-52.
181. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, et al. Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;50(1):30-9.
182. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1993;92(4):537-48.
183. LaFemina MJ, Rokkam D, Chandrasena A, Pan J, Bajaj A, Johnson M, et al. Keratinocyte growth factor enhances barrier function without altering claudin expression in primary alveolar epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;299(6):L724-34.
184. LaFemina MJ, Sutherland KM, Bentley T, Gonzales LW, Allen L, Chapin CJ, et al. Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;51(4):550-8.
185. Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*. 2006;24(4):366-8.
186. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*. 2009;31(3):412-24.
187. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes and infection*. 2011;13(14-15):1133-45.
188. Leclerc E. RAGE and Its Ligands in Melanoma; Melanoma - Current Clinical Management and Future Therapeutics, Prof. Mandi Murph (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/59172. Available from: <https://www.intechopen.com/books/melanoma-current-clinical-management-and-future-therapeutics/rage-and-its-ligands-in-melanoma>. 2015.
189. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *Journal of dental research*. 2012;91(2):142-9.

190. Lee JH, Hanaoka M, Kitaguchi Y, Kraskauskas D, Shapiro L, Voelkel NF, et al. Imbalance of apoptosis and cell proliferation contributes to the development and persistence of emphysema. *Lung*. 2012;190(1):69-82.
191. Leissinger M, Kulkarni R, Zemans RL, Downey GP, Jeyaseelan S. Investigating the role of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in bacterial lung infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(12):1461-8.
192. Li D, Beisswenger C, Herr C, Hellberg J, Han G, Zakharkina T, et al. Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/beta-catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene*. 2014;33(10):1239-48.
193. Li G, Flodby P, Luo J, Kage H, Sipos A, Gao D, et al. Knockout mice reveal key roles for claudin 18 in alveolar barrier properties and fluid homeostasis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;51(2):210-22.
194. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(2):773-8.
195. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(26):16498-506.
196. Li Y, Wu R, Zhao S, Cheng H, Ji P, Yu M, et al. RAGE/NF-kappaB pathway mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar type I epithelial cells isolated from neonate rats. *Inflammation*. 2014;37(5):1623-9.
197. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(11):1641-50.
198. Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L, et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2011;61(2):179-88.
199. Liu J, Qu H, Li Q, Ye L, Ma G, Wan H. The responses of gammadelta T-cells against acute *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in mice via interleukin-17. *Pathogens and disease*. 2013;68(2):44-51.
200. Liu M, Yu Y, Jiang H, Zhang L, Zhang PP, Yu P, et al. Simvastatin suppresses vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE(-/-) mice by downregulating the HMGB1-RAGE axis. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(6):830-6.
201. Lizotte PP, Hanford LE, Enghild JJ, Nozik-Grayck E, Giles BL, Oury TD. Developmental expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its response to hyperoxia in the neonatal rat lung. *BMC developmental biology*. 2007;7:15.
202. Lore NI, Bragonzi A, Cigana C. The IL-17A/IL-17RA axis in pulmonary defence and immunopathology. *Cytokine & growth factor reviews*. 2016;30:19-27.
203. Lore NI, Cigana C, Riva C, De Fino I, Nonis A, Spagnuolo L, et al. IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*. 2016;6:25937.

204. MacRedmond R, Greene C, Taggart CC, McElvaney N, O'Neill S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respiratory research*. 2005;6:116.
205. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of immunology*. 2007;178(12):8090-6.
206. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *The European respiratory journal*. 2001;17(5):946-53.
207. Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Jansen HM, et al. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *The European respiratory journal*. 2006;28(3):622-6.
208. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(5):403-11.
209. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2006;11 Suppl:S12-5.
210. Maus UA, Janzen S, Wall G, Srivastava M, Blackwell TS, Christman JW, et al. Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(2):227-35.
211. Mayer AK, Dalpke AH. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2007;55(6):353-62.
212. McCormack FX, Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):707-12.
213. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
214. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(7):3076-80.
215. Miller MC, Tavares R, Johanson CE, Hovanesian V, Donahue JE, Gonzalez L, et al. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain research*. 2008;1230:273-80.
216. Mizgerd JP. Lung infection--a public health priority. *PLoS medicine*. 2006;3(2):e76.
217. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *The New England journal of medicine*. 2008;358(7):716-27.
218. Mizgerd JP. Respiratory infection and the impact of pulmonary immunity on lung health and disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(9):824-9.
219. Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung

- disease? *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2006;19(11):1437-45.
220. Morris A, Kinnear G, Wan WY, Wyss D, Bahra P, Stevenson CS. Comparison of cigarette smoke-induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2008;327(3):851-62.
221. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews.* 2003;14(2):155-74.
222. Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al].* 2008;Chapter 14:Unit 14.2.
223. Muir R, Osbourn M, Dubois AV, Doran E, Small DM, Monahan A, et al. Innate Lymphoid Cells Are the Predominant Source of IL-17A during the Early Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2016;193(4):407-16.
224. Musher DM, Thorner AR. Community-acquired pneumonia. *The New England journal of medicine.* 2014;371(17):1619-28.
225. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 2002;17(3):375-87.
226. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry.* 1992;267(21):14998-5004.
227. Nelson AL, Barasch JM, Bunte RM, Weiser JN. Bacterial colonization of nasal mucosa induces expression of siderocalin, an iron-sequestering component of innate immunity. *Cellular microbiology.* 2005;7(10):1404-17.
228. Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2009;123(5):986-94; quiz 95-6.
229. Niederman MS. Hospital-acquired pneumonia, health care-associated pneumonia, ventilator-associated pneumonia, and ventilator-associated tracheobronchitis: definitions and challenges in trial design. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2010;51 Suppl 1:S12-7.
230. Niederstrasser J, Herr C, Wolf L, Lehr CM, Beisswenger C, Bals R. Vitamin D deficiency does not result in a breach of host defense in murine models of pneumonia. *Infection and immunity.* 2016.
231. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax.* 2006;61(5):448-54.
232. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, et al. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax.* 2004;59(10):837-42.

233. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(3):852-7.
234. Ojielo CI, Cooke K, Mancuso P, Standiford TJ, Olkiewicz KM, Clouthier S, et al. Defective phagocytosis and clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung following bone marrow transplantation. *Journal of immunology*. 2003;171(8):4416-24.
235. Olivera DS, Boggs SE, Beenhouwer C, Aden J, Knall C. Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro. *Inhalation toxicology*. 2007;19(1):13-22.
236. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttrop N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(12):1294-309.
237. Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, et al. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *The EMBO journal*. 2007;26(4):1129-39.
238. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 2006;27(3):542-6.
239. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology*. 2014;2:411-29.
240. Pappas K, Papaioannou AI, Kostikas K, Tzanakis N. The role of macrophages in obstructive airways disease: chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Cytokine*. 2013;64(3):613-25.
241. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology*. 2011;134(1):8-16.
242. Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(2):189-201.
243. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*. 2010;362(19):1804-13.
244. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
245. Pfeifer P, Voss M, Wonneberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, et al. IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;48(4):415-21.
246. Pittet LA, Quinton LJ, Yamamoto K, Robson BE, Ferrari JD, Algul H, et al. Earliest innate immune responses require macrophage RelA during pneumococcal pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(3):573-81.
247. Plataki M, Tzortzaki E, Ryttila P, Demosthenes M, Koutsopoulos A, Siafakas NM. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2006;1(2):161-71.

248. Pouwels SD, Heijink IH, ten Hacken NH, Vandenabeele P, Krysko DV, Nawijn MC, et al. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal immunology*. 2014;7(2):215-26.
249. Pouwels SD, Hesse L, Faiz A, Lubbers J, Bodha PK, Ten Hacken NH, et al. Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2016;311(5):L881-192.
250. Pouwels SD, Zijlstra GJ, van der Toorn M, Hesse L, Gras R, Ten Hacken NH, et al. Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2016;310(4):L377-86.
251. Power MR, Peng Y, Maydanski E, Marshall JS, Lin TJ. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(47):49315-22.
252. Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2015;386(9998):1097-108.
253. Queisser MA, Kouri FM, Konigshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O, et al. Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;39(3):337-45.
254. Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2724-30.
255. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nature immunology*. 2011;12(12):1159-66.
256. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PloS one*. 2009;4(10):e7259.
257. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(10):3716-27.
258. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in immunology*. 2014;5:342.
259. Rello J, Lorente C, Diaz E, Bodi M, Boque C, Sandiumenge A, et al. Incidence, etiology, and outcome of nosocomial pneumonia in ICU patients requiring percutaneous tracheotomy for mechanical ventilation. *Chest*. 2003;124(6):2239-43.
260. Rennard SI, Togo S, Holz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(8):703-8.

261. Reppe K, Radunzel P, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S, et al. Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. *Infection and immunity*. 2015;83(12):4617-29.
262. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(3):469-73.
263. Reynolds JM, Martinez GJ, Nallaparaju KC, Chang SH, Wang YH, Dong C. Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *Journal of immunology*. 2012;189(9):4226-30.
264. Reynolds PR, Kasteler SD, Cosio MG, Sturrock A, Huecksteadt T, Hoidal JR. RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294(6):L1094-101.
265. Reynolds PR, Schmitt RE, Kasteler SD, Sturrock A, Sanders K, Bierhaus A, et al. Receptors for advanced glycation end-products targeting protect against hyperoxia-induced lung injury in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(5):545-51.
266. Reynolds PR, Kasteler SD, Schmitt RE, Hoidal JR. Receptor for advanced glycation end-products signals through Ras during tobacco smoke-induced pulmonary inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(2):411-8.
267. Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeke EK, Decramer M, et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. *Disease models & mechanisms*. 2012;5(3):333-41.
268. Robinson AB, Johnson KD, Bennion BG, Reynolds PR. RAGE signaling by alveolar macrophages influences tobacco smoke-induced inflammation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302(11):L1192-9.
269. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respiratory research*. 2006;7(1):29.
270. Roos AB, Sanden C, Mori M, Bjermer L, Stampfli MR, Erjefalt JS. IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;191(11):1232-41.
271. Rotta Detto Loria J, Rohmann K, Droemann D, Kujath P, Rupp J, Goldmann T, et al. Nontypeable Haemophilus Influenzae Infection Upregulates the NLRP3 Inflammasome and Leads to Caspase-1-Dependent Secretion of Interleukin-1beta - A Possible Pathway of Exacerbations in COPD. *PloS one*. 2013;8(6):e66818.
272. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(5):602-9.

273. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(4):L867-73.
274. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(11):1209-23.
275. Sadikot RT, Zeng H, Joo M, Everhart MB, Sherrill TP, Li B, et al. Targeted immunomodulation of the NF-kappaB pathway in airway epithelium impacts host defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of immunology*. 2006;176(8):4923-30.
276. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(3 Pt 1):822-6.
277. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, et al. TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS one*. 2011;6(8):e23132.
278. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*. 2009;374(9691):733-43.
279. Sambamurthy N, Leme AS, Oury TD, Shapiro SD. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) contributes to the progression of emphysema in mice. *PLoS one*. 2015;10(3):e0118979.
280. Sawa T, Corry DB, Gropper MA, Ohara M, Kurahashi K, Wiener-Kronish JP. IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of immunology*. 1997;159(6):2858-66.
281. Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Scientific reports*. 2015;5:8163.
282. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26(1):57-60.
283. Schlingmann B, Molina SA, Koval M. Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;42:47-57.
284. Schluger NW, Koppaka R. Lung disease in a global context. A call for public health action. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014;11(3):407-16.
285. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14987-97.
286. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(3):1395-403.

287. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(7):949-55.
288. Schultz MJ, Rijneveld AW, Florquin S, Edwards CK, Dinarello CA, van der Poll T. Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282(2):L285-90.
289. Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, et al. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell*. 2011;147(2):293-305.
290. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*. 2005;6(12):1191-7.
291. Sessa L, Gatti E, Zeni F, Antonelli A, Catucci A, Koch M, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). *PloS one*. 2014;9(1):e86903.
292. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2008;359(22):2355-65.
293. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(5 Pt 2):S29-32.
294. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *The American journal of pathology*. 2003;163(6):2329-35.
295. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2004;9(2):165-74.
296. Sibille Y, Marchandise FX. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *The European respiratory journal*. 1993;6(10):1529-43.
297. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology*. 2010;28:367-88.
298. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(25):14961-6.
299. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology*. 2004;172(6):3377-81.
300. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(1):L312-22.
301. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(6):427-39.

302. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *Journal of immunology*. 2008;181(9):6117-24.
303. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, et al. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nature immunology*. 2011;12(12):1151-8.
304. Song X, Qian Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cellular signalling*. 2013;25(12):2335-47.
305. Sorci G, Riuuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(1):101-9.
306. Sorensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*. 1997;90(7):2796-803.
307. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001;97(12):3951-9.
308. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 1996;51(3):267-71.
309. Stevenson CS, Docx C, Webster R, Battram C, Hynx D, Giddings J, et al. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(5):L1183-93.
310. Stevenson CS, Birrell MA. Moving towards a new generation of animal models for asthma and COPD with improved clinical relevance. *Pharmacology & therapeutics*. 2011;130(2):93-105.
311. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):699-705.
312. Sukkar MB, Ullah MA, Gan WJ, Wark PA, Chung KF, Hughes JM, et al. RAGE: a new frontier in chronic airways disease. *British journal of pharmacology*. 2012;167(6):1161-76.
313. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Makino H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(1):97-104.
314. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(13):3235-45.
315. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
316. Takeyama K, Dabbagh K, Jeong Shim J, Dao-Pick T, Ueki IF, Nadel JA. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *Journal of immunology*. 2000;164(3):1546-52.

317. Tan HL, Rosenthal M. IL-17 in lung disease: friend or foe? *Thorax*. 2013;68(8):788-90.
318. Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25781-90.
319. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, et al. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57(5):405-11.
320. Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate immunity*. 2010;16(3):151-9.
321. Toews GB. Cytokines and the lung. *The European respiratory journal Supplement*. 2001;34:3s-17s.
322. Travis SM, Conway BA, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999;20(5):872-9.
323. Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and immunity*. 2000;68(7):4289-96.
324. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *Journal of immunology*. 2003;170(8):4226-36.
325. Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;28(5):551-4.
326. Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2749-55.
327. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(11):2563-82.
328. Vabret N, Blander JM. Sensing microbial RNA in the cytosol. *Frontiers in immunology*. 2013;4:468.
329. van der Poll T, van Zoelen MA, Wiersinga WJ. Regulation of pro-and anti-inflammatory host responses. *Contributions to microbiology*. 2011;17:125-36.
330. van der Toorn M, Slebos DJ, de Bruin HG, Gras R, Rezayat D, Jorge L, et al. Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation. *Respiratory research*. 2013;14:45.
331. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology*. 2015;25(5):308-15.
332. Vanoirbeek JA, Rinaldi M, De Vooght V, Haenen S, Bobic S, Gayan-Ramirez G, et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and

- restrictive respiratory diseases. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(1):96-104.
333. Véliz Rodríguez T, Moalli F, Polentarutti N, Paroni M, Bonavita E, Anselmo A, et al. Role of Toll Interleukin-1 Receptor (IL-1R) 8, a Negative Regulator of IL-1R/Toll-Like Receptor Signaling, in Resistance to Acute *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Infection and immunity*. 2012;80(1):100-9.
334. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(5):530-51.
335. Vlahos R, Bozinovski S, Jones JE, Powell J, Gras J, Lilja A, et al. Differential protease, innate immunity, and NF-kappaB induction profiles during lung inflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(5):L931-45.
336. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clinical science*. 2014;126(4):253-65.
337. Voss M, Wolf L, Kamyschnikow A, Wonenberg B, Honecker A, Herr C, et al. IL-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015;309(2):L188-95.
338. Wang H, Liu X, Umino T, Skold CM, Zhu Y, Kohyama T, et al. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;25(6):772-9.
339. Waseda K, Miyahara N, Taniguchi A, Kurimoto E, Ikeda G, Koga H, et al. Emphysema requires the receptor for advanced glycation end-products triggering on structural cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2015;52(4):482-91.
340. Werner JL, Steele C. Innate receptors and cellular defense against pulmonary infections. *Journal of immunology*. 2014;193(8):3842-50.
341. Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, Subramanian M, Cohen TS, Prince AS, et al. Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*. 2014;506(7489):503-6.
342. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature immunology*. 2015;16(1):27-35.
343. Williams AE, Jose RJ, Brown JS, Chambers RC. Enhanced inflammation in aged mice following infection with *Streptococcus pneumoniae* is associated with decreased IL-10 and augmented chemokine production. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015;308(6):L539-49.
344. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010;15(7):1037-56.
345. Williams OW, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey BF, Evans CM. Airway mucus: From production to secretion. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;34(5):527-36.

346. Wonnenberg B, Tschernig T, Voss M, Bischoff M, Meier C, Schirmer SH, et al. Probenecid reduces infection and inflammation in acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2014;304(5-6):725-9.
347. Wonnenberg B, Jungnickel C, Honecker A, Wolf L, Voss M, Bischoff M, et al. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. *Innate immunity*. 2016.
348. Wood TT, Winden DR, Marlor DR, Wright AJ, Jones CM, Chavarria M, et al. Acute secondhand smoke-induced pulmonary inflammation is diminished in RAGE knockout mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;307(10):L758-64.
349. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(1):L1-15.
350. Wu L, Ma L, Nicholson LF, Black PN. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respiratory medicine*. 2011;105(3):329-36.
351. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes and infection*. 2007;9(1):78-86.
352. Xu X, Shao B, Wang R, Zhou S, Tang Z, Lu W, et al. Role of Interleukin-17 in defense against *pseudomonas aeruginosa* infection in lungs. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014;7(4):809-16.
353. Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, et al. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *Journal of immunology*. 2007;179(10):7128-36.
354. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of immunology*. 2011;186(5):3248-57.
355. Yao H, Chung S, Hwang JW, Rajendrasozhan S, Sundar IK, Dean DA, et al. SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(6):2032-45.
356. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology*. 1995;155(12):5483-6.
357. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
358. Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiological reviews*. 2007;87(3):1047-82.
359. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS letters*. 1995;374(1):1-5.
360. Zen K, Chen CX, Chen YT, Wilton R, Liu Y. Receptor for advanced glycation endproducts mediates neutrophil migration across intestinal epithelium. *Journal of immunology*. 2007;178(4):2483-90.

361. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, et al. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(51):35507-16.
362. Zhang SP, Wu YW, Wu ZZ, Liu HY, Nie JH, Tong J. Up-regulation of RAGE and S100A6 in rats exposed to cigarette smoke. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2009;28(2):259-64.
363. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infection and immunity*. 2005;73(11):7151-60.
364. Zhao H, Leu SW, Shi L, Dedaj R, Zhao G, Garg HG, et al. TLR4 is a negative regulator in noninfectious lung inflammation. *Journal of immunology*. 2010;184(9):5308-14.

7. Publikationen, Kongressbeiträge und Danksagung

7.1. Publikationen

Folgende Publikationen sind während der Anfertigung dieser Arbeit entstanden oder sind in Bearbeitung:

Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M, Wonnenberg B, Herr C, Schneider-Daum N, Lehr CM, Bals R, Beisswenger C. IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of physiology - Lung cellular and molecular physiology* 2016.

Wolf L, Herr C, Niederstraßer J, Beisswenger C, Bals R. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) maintains pulmonary mechanics and structure and regulates the response to cigarette smoke. Zur Publikation eingereicht.

Jungnickel C, Schmidt LH, Bittigkoffer L, **Wolf L**, Wolf A, Ritzmann F, Kamyschnikow A, Herr C, Menger MD, Spieker T, Wiewrodt R, Bals R, Beisswenger C. IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth. *Oncogene* 2017.

Niederstrasser J, Herr C, **Wolf L**, Lehr CM, Beisswenger C, Bals R. Vitamin D deficiency does not result in a breach of host defense in murine models of pneumonia. *Infection and immunity* 2016.

Wonnenberg B, Jungnickel C, Honecker A, **Wolf L**, Voss M, Bischoff M, Tschernig T, Herr C, Bals R, Beisswenger C. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. *Innate immunity* 2016.

Voss M, **Wolf L**, Kamyschnikow A, Wonnenberg B, Honecker A, Herr C, Lepper PM, Wegmann M, Menger MD, Bals R, Beisswenger C. IL-17A contributes to maintenance of

pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema. American journal of physiology - Lung cellular and molecular physiology 2015.

Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Wolf A, Voss M, **Wolf L**, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bals R, Beisswenger C. Cigarette smoke-induced disruption of pulmonary barrier and bacterial translocation drive tumor-associated inflammation and growth. American journal of physiology - Lung cellular and molecular physiology 2015.

7.2. Kongressbeiträge

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2016 in Hannover, Vortrag und Posterpräsentation „IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia“

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2015 in München, Vortrag „RAGE reguliert akute inflammatorische Prozesse bei Zigarettenrauch-induzierter Entzündung und fördert die Entwicklung einer intakten pulmonalen Barriere“ und „IL-17C mediates inflammation in acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia“

Jahreskongress der European Respiratory Society (ERS) 2015 in Amsterdam, Niederlande; Posterpräsentation „Receptor for glycation end products (RAGE) is involved in cigarette smoke induced inflammation and emphysema“

Kongress „Lung Science Conference“ 2015 in Estoril, Portugal; Posterpräsentation „Receptor for glycation end products (RAGE) is involved in cigarette smoke induced inflammation and emphysema“

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2014 in Lübeck, Vortrag

„Der Einfluss von RAGE bei Zigarettenrauch-induzierter Entzündung und bei der Entstehung eines Emphysems“

7.3. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und für seine fortwährende Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Christoph Beißwenger für die kompetente wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, für die vielen nützlichen Hinweise und Anregungen sowie die hilfreiche Unterstützung bei allen methodischen und theoretischen Fragen.

Für die Möglichkeit das Isolationsverfahren für alveolare Epithelzellen aus Mauslungen zu erlernen, danke ich Prof. Dr. Claus-Michael Lehr und seiner Arbeitsgruppe am Helmholtz Institut für Pharmazeutische Forschung in Saarbrücken.

Prof. Dr. Thomas Tschernig danke ich für die Unterstützung bei der Bewertung der histologischen Lungenpräparate in Hinblick auf die pulmonale Entzündung.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bals bedanke ich mich für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit, die stets von großer Hilfsbereitschaft, konstruktiven Diskussionen und motivierenden Gesprächen geprägt war.

Und nicht zuletzt geht ein herzlicher Dank an meine Familie, insbesondere an meine Eltern und Michael, die mich immer unterstützt haben.