

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

DISSERTATION

Pulmonale Expression und Regulation von IL-15 und den Rezeptoruntereinheiten  
IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  in der durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten  
Mauspneumonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Paul Lampe

aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. N. Suttorp
2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals
3. Prof. Dr. W. Weichert

Datum der Promotion: 08.04.2011

Für meine Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	6
1.1	Die Pneumonie .....	6
1.2	Das Bakterium <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	7
1.3	Das Zytokin Interleukin-15 .....	11
1.4	Der Interleukin-15-Rezeptorkomplex .....	15
1.5	Funktion von Interleukin-15 und seines Rezeptors .....	16
2	MATERIAL UND METHODEN .....	19
2.1	Maus-Pneumonie-Modell .....	19
2.1.1	Infektionsversuche mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	19
2.1.2	Infektionsversuche mit <i>Chlamydothila pneumoniae</i> .....	20
2.1.3	Entnahme der Lungen und experimentelles Protokoll .....	21
2.2	Nachweis des Proteins von IL-15 und seines Rezeptors .....	22
2.2.1	Immunhistologie.....	22
2.2.2	Westernblot.....	27
2.3	Nachweis der IL-15-mRNA .....	28
2.3.1	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	28
2.3.2	Mikroarray Transkriptom-Analyse .....	29
2.4	Statistische Auswertung.....	30
3	ERGEBNISSE .....	33
3.1	Verlauf der murinen bakteriellen Pneumonie .....	33
3.1.1	Klinischer Verlauf der pulmonalen Infektion.....	33
3.1.2	Histopathologische Veränderungen des Lungengewebes .....	33
3.2	Nachweis von IL-15 .....	34
3.2.1	Konstitutive Expression und Lokalisation von IL-15.....	34
3.2.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> induzierte Regulation von IL-15.....	35
3.2.3	Nachweis der Spezifität des Signals in der Immunhistologie .....	37
3.3	Nachweis des IL-15-Rezeptorkomplexes.....	37
3.3.1	Pulmonale Lokalisation der Rezeptoruntereinheiten.....	37
3.3.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> induzierte Regulation der Rezeptoruntereinheiten.....	38

3.4	Histologische Veränderungen und immunhistologische Regulation des Zytokins im Verlauf einer pulmonalen Infektion mit <i>Chlamydophila pneumoniae</i> .....	39
3.5	Abbildungen zu den Ergebnissen .....	40
3.6	Ergebnistabellen der semiquantitativen Bildanalyse.....	50
4	DISKUSSION.....	53
	Zukunftsausblick.....	66
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	67
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
7	ANHANG .....	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	79
7.2	Eigenständigkeitserklärung.....	81
7.3	Lebenslauf .....	82
7.4	Veröffentlichungen.....	83
7.5	Danksagung.....	84

„...the most wide spread and fatal of all acute diseases, pneumonia, is now captain of the Man of Death” Sir William Osler 1901, Principles and Practice of Medicine (1).

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Pneumonie

Eine der häufigsten letalen Infektionskrankheiten ist trotz verfügbarer anti-mikrobieller Therapeutika die Pneumonie, eine schwere Entzündung des Lungenparenchyms. Unterschieden wird zwischen der nosokomial und der ambulant erworbenen Pneumonie (community acquired pneumonia; CAP). Letztere ist definiert als jede Lungenentzündung, welche im privaten oder beruflichen Umfeld bzw. innerhalb der ersten zwei Tage eines Krankenhausaufenthaltes auftritt (2;3).

Besonders gefährdet sind Patienten mit eingeschränkter Funktion des Immunsystems, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, chronischen Leber- und Nierenerkrankungen, höherem Lebensalter (> 65 Jahren), Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus, aspirationsdisponierenden Erkrankungen, Nikotinexponierte sowie Säuglinge und Kleinkinder (< 5 Jahren) (2;4). Darüber hinaus treten insbesondere Pneumokokken-Pneumonien auch außerhalb der genannten Risikogruppen auf, bei denen sie ebenfalls schwere Verläufe nehmen können und trotz wirksamer Antibiotika eine höhere Mortalität als durch andere Erreger aufweisen (5).

Entsprechend des klinischen Verlaufes bzw. des Schweregrades werden die schwere CAP und die schwere Sepsis abgegrenzt. Zur frühzeitigen Prädiktion und Einleitung einer adäquaten Therapie (z.B. stationäre Aufnahme, intensivmedizinische Versorgung) stehen Bewertungskriterien wie der "PSI", "CURB" und der "CRB-65-Index" zur Verfügung. Letzterer bezieht sich ausschließlich auf anamnestische und klinische Kriterien (siehe Tab. 1.1) und ist entsprechend schnell anwendbar mit vergleichbarer gruppenspezifischer Prädiktion (6;7).

**Tab. 1.1** – Kriterien des CRB-65-Index für die Beurteilung der ambulant erworbenen Pneumonie (8)

- 
- Atemfrequenz  $\geq 30$ /min
  - diastolischer Blutdruck  $\leq 60$  mm Hg / systolischer Blutdruck  $< 90$  mm Hg
  - Bewusstseinstörung
  - Alter  $\geq 65$  Jahre
-

Die CAP wird überwiegend bakteriell (ca. 75 - 90 %), in geringerem Maße auch durch Viren (Nachweis in ca. 10 - 25 %) hervorgerufen (2;9). Als bedeutende bakterielle Erreger sind mit einer Häufigkeit von 25-45 % *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, synonym: Pneumokokken), neben *Haemophilus influenzae* (10 - 20 %) und *Mycoplasma pneumoniae* (10 - 12 %) bestimmend. Insbesondere bei schweren Krankheitsverläufen werden auch *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* sowie Influenza-Viren nachgewiesen (2;9). Im höheren Lebensalter gewinnen zusätzlich auch Enterobakterien und *Pseudomonas aeruginosa* an Bedeutung (2).

Abhängig von der geographischen Lokalisation und der Altersgruppe sind ca. 6-22 % aller Pneumonien mit *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) assoziiert, einer meist subklinisch verlaufenden Infektion (10;11). In einer neueren Studie wurden in Deutschland allerdings nur in 0,5 % der Fälle *C. pneumoniae* nachgewiesen (12). Bei *C. pneumoniae* handelt es sich um obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien, welche über eine Infiltration der Epithelien Bronchitiden, Sinusitiden und Pharyngitiden verursachen können. Des Weiteren wird ein Einfluss auf Otitis media, chronische Lungenerkrankungen und Arteriosklerose diskutiert (13;14).

## 1.2 Das Bakterium *Streptococcus pneumoniae*

Das 1881 erstmals beschriebene extrazelluläre Pathogen *S. pneumoniae* ist ein kugelförmiges gram-positives Bakterium (1). Der Erreger kommt meist als Diplokokken vor und besiedelt asymptomatisch den Nasen-Rachen-Raum. Neben der Ansteckung weiterer Individuen durch Tröpfcheninfektion kann es zur Dissemination des Erregers im Wirt kommen (5;15;16).

Pneumokokken-Infektionen haben trotz zur Verfügung stehender Antibiotika oft schwere Verläufe, einschließlich Bakteriämien (15-17). In den letzten 10 - 15 Jahren ist die Antibiotikaresistenz von *S. pneumoniae* signifikant angestiegen. Die Prävalenz von *S. pneumoniae* für eine Resistenz gegenüber Penicillin wird weltweit mit etwa 18 % angenommen (5;18), jedoch besteht eine starke regionale Heterogenität. Für Deutschland wird eine Prävalenz von 3 %, in Spanien jedoch von bis zu 50 % angenommen (2). Zeitgleich stieg ebenfalls die Resistenz gegenüber den zunehmend eingesetzten Makrolid-Antibiotika, Studien in Italien zeigten einen Anstieg von 6 % (1993) auf 31,7 % innerhalb von nur 9 Jahren (19).

Durch die Einführung des Impfstoffes Prevenar konnte seit dem Jahr 2000 in den USA das Risiko lebensbedrohlicher Verläufe bei Kleinkindern, Immunsupprimierten, Patienten nach Splenektomie sowie bei Menschen über 65 Jahre deutlich reduziert werden, wenn auch die respiratorische Infektion nicht verhindert werden konnten (2;20). Der Impfstoff deckt die sieben bedeutendsten der über 90 Serotypen von *S. pneumoniae* ab (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Eine Studie aus Cleveland, OH, USA konnte einen deutlichen Rückgang von Erkrankungen nachweisen. Jedoch zeigte sich aufgrund des neu entstandenen Selektionsdruckes (20) auch eine Verdopplung der Inzidenz für den Serotyp 19A, gegen den die Impfung keinen Schutz bietet.

Bedingt durch den nur teilweisen Schutz der Impfung, die metastabile Resistenzsituation, sowie die hohe Mortalität der Pneumokokken-Pneumonie, ergibt sich die Notwendigkeit, mittelfristig neue, molekulare Therapiestrategien jenseits der Antibiotika zu entwickeln. Dabei stehen aktuell mehrere Aspekte im Fokus, wie die negative Beeinflussung der bakteriellen Adhäsion oder die Neutralisierung von bakteriellen Toxinen/Noxen. Darüber hinaus gibt es Ansätze für eine Balancierung zwischen pro- und anti-inflammatorischer Wirtsabwehr (21;22). Diese fußen auf den derzeit bekannten pathophysiologischen Zusammenhängen für die Etablierung einer Pneumokokkeninfektion, wie zum Beispiel die Adhärenz der Keime als ein wichtiger initialer Schritt. Die meist asymptomatische Kolonisierung der Erreger im oberen und unteren Respirationstrakt, wird dabei durch verschiedene Liganden der Zellwand, z.B. das „choline binding protein-a“ (CbpA) ermöglicht (16). Im Rahmen einer geschädigten Zilienfunktion, z.B. durch Nikotinexposition oder eine vermehrte Mukosekretion bei viralen Infektionen, welche zu einer verminderten mukoziliären Clearance führt, wird die Ausbreitung von *S. pneumoniae* in die tiefen Atemwege erleichtert (2;16) und eine charakteristische Pneumokokken-Lobärpneumonie induziert.

Zu Beginn des Infektionsprozesses kommt es zeitgleich mit der Adhäsion der Erreger an Epithelzellen zum Kontakt der Bakterien mit Zellen der angeborenen Immunität. Pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP), z.B. Zellwandbestandteile oder auch RNA/DNA-Fragmente werden durch Rezeptoren wie die „Toll-like-receptors“ (TLR) und zytosolische „Nucleotide binding oligomerization domain like receptors“ (NLR) erkannt (23;24). Von den TLRs interagieren bei Infektionen mit Pneumokokken vor allem TLR-2 und TLR-6 mit den Peptidoglykanen (23;25-27). Eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Immunantwort gegenüber gram-negativen Bakterien nimmt TLR-4 ein, der



Lipopolysaccharide (LPS) erkennt. Über diesen Rezeptor wird jedoch auch Pneumolysin (PLY) erkannt, welches eine zentrale Rolle in der Pathogenität von *S. pneumoniae* einnimmt (28). *In vitro* ließ sich die Abhängigkeit der durch PLY induzierten Aktivierung von Makrophagen von TLR-4 nachweisen (29).

Klinisch relevante bakterielle Pneumonie-Erreger können sowohl Gewebe als auch Immunzellen invadieren. Für *S. pneumoniae* ist darüber hinaus ein Invadieren von pulmonalen Epithelzellen bekannt (30;31). Zytosolische Rezeptoren der Wirtszellen wie NLR können im Zytoplasma lokalisierte Pathogene bzw. deren Fragmente erkennen (23;32). Weiterhin konnte bei *S. pneumoniae* die Funktion von Nod-Proteinen für die Erkennung durch die Wirtszelle nachgewiesen werden. Optiz *et al.* zeigten, dass die Transfektion des Nod-2 Rezeptors zu einer gesteigerten Aktivierung des „Nuclear factor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) führt, wodurch wiederum eine pro-inflammatorische Signalkaskade aktiviert wird (31).

Durch die Induktion zentraler pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie des NF- $\kappa$ B oder „Activating Protein 1“ (AP-1) steigen konsekutiv pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin (IL) IL-1, IL-6, GM-CSF oder IL-8 an (33). Der klassische Weg des Komplementsystems wird entweder direkt durch die Bindung an C1q oder über die F<sub>C</sub>-Region des Wirts-Immunglobulin G (IgG) aktiviert, so dass die komplementabhängige Immunität zum Tragen kommt (34).

Diese Mechanismen finden im Rahmen der sogenannten Anschoppungsphase (Tag 1) der charakteristischen Lobärpneumonie im unbehandelten Verlauf statt, welche histopathologisch in vier Stadien eingeteilt wird. Diese ist durch ein reaktives, eiweißreiches seröses Exsudat gekennzeichnet, welches den Bakterien im Alveolarraum als Nährmedium dient und deren weitere Ausbreitung fördert (16;35). Zusätzlich erfolgt durch eine Autolyse der Pneumokokken die Freisetzung des zentralen Pathogenitätsfaktors PLY, welcher durch Porenbildung in den cholesterolhaltigen Zellmembranen die Invasion und Ausbreitung der Erreger weiter verstärkt (35;36). Im Verlauf der Infektion kommt es zu einer Schädigung von pulmonalen Alveolarepithel- und Endothelzellen, sowie deren Zell-Junktionen durch weitere Virulenzfaktoren (siehe Tab. 1.2). Weiterhin tragen Wirtsfaktoren wie die Interaktion von Phosphorylcholin der Bakterienzellwand mit dem Rezeptor des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF) zu einer Verstärkung der Invasion bei (5;35).

**Tab. 1.2** – Übersicht wichtiger Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Virulenzfaktor	Wirkung
Polysaccharidkapsel	Hemmt komplementvermittelte Phagozytose, durch reduzierte C3b-Opsonierung der Bakterienzellen (35;37;38)
Choline-binding proteins	
- CbpA	Adhärenzfaktor zur Kolonisation im Nasopharynx und Invasion (35;39)
- PspA	Hemmt komplementvermittelte Phagozytose, durch reduzierte C3b-Opsonierung (35)
- Lyt A,B und C	Autolyse (35)
IgA1-Protease	Schützt Pneumokokken vor spezifischen Antikörpern während der Kolonisation durch Spaltung von IgA-Antikörpern der Mukosa (35;40)
Pneumolysin	Fördert Invasion und Ausbreitung der Pneumokokken (35;36), Hemmt Zilienbewegung (35;36), Zell-Lyse durch Porenbildung (35;36), Aktiviert Komplement durch Bindung an die F <sub>c</sub> -Region von IgG (35;36)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Zytotoxisch, induziert Apoptose in Wirtszellen (35;41;42)

Die Phase der roten Hepatisation (Tag 2-3) ist durch eine zunehmende fibrinöse Entzündungsreaktion mit Hyperämie der Kapillaren, erweiterten Lymphgefäßen sowie einem verbreiterten Interstitium charakterisiert. In den Alveolen finden sich ein dichtes Fibrinnetz sowie abgelöste Alveolarepithelzellen. Erythrozyten, Makrophagen und Granulozyten treten aus der alveolo-kapillären Membran in den Alveolarraum über, gehäuft treten Thrombosen der Lungengefäße auf (16;35). Es findet eine weitere Proliferation von Pneumokokken statt (43). Dies induziert eine verstärkte Expression des Chemokins PAF sowie des Leukozytenadhäsionsmoleküls „Cluster of Differentiation“ (CD) CD18, die Migration von Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) (15;44) beziehungsweise Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (45) und weiterer Leukozyten.

Eine erhöhte Permeabilität der Gefäßendothelien bewirkt einen Serumeinstrom und ist mit einem Anstieg von Komplement- sowie Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven

Protein verbunden. Diese führen über die Opsonierung der Bakterien zu einer verstärkten Phagozytose (16). Im Rahmen der adaptiven Immunantwort werden T- und B-Lymphozyten aktiviert. Von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produzierte Interleukine wie IL-12 bewirken eine Differenzierung der T-Lymphozyten mit anschließender Sekretion von Interferon-gamma (INF $\gamma$ ), IL-2 und TNF $\alpha$ . Diese Zytokine steigern die Aktivität der Makrophagen sowie der T- und B-Lymphozyten (46). Spezifische, gegen die Bakterienkapsel gerichtete Antikörper (z.B. IgA und IgG gegen Phosphorylcholin) und PspA erhöhen ebenfalls die Effizienz der Opsonierung für die Phagozytose der Bakterien (5;44).

Kommt es zu einer Ausheilung der Erkrankung, schließt sich die Phase der grauen Hepatisation (Tag 4-6) an, die durch eine vermehrte Fibrinausfüllung des Alveolarlumens in Folge einer fibrinösen Exsudation gekennzeichnet ist. Im histologischen Präparat stellen sich vermehrt Makrophagen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) dar, die Lunge ist weißlich-grau gekörnt und leberartig verfestigt.

Die anschließende „Phase der Lösung“ (Tag 7-11) ist gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl von Leukozyten und Antikörpern. Freiwerdende Zellwand-Proteine und PLY führen vorübergehend zu einer verstärkten Entzündungsreaktion vor der Entfieberung (Krise) (16;35;43). Durch den Abtransport nekrotischen Gewebes über die Lymphbahnen sowie Abhusten steigert sich die Belüftung, die Alveolen können sich wieder entfalten.

Durch die Freisetzung von bakteriellen Zellbestandteilen (Tab. 1.2) besteht neben der erwähnten Resistenzentwicklung eine weitere Problematik der Antibiotika-Therapie von *S. pneumoniae*-Infektionen. Hier wird eine weitere Steigerung der Entzündungsreaktionen bzw. der hierdurch induzierten Zellschädigungen angenommen (47;48). Deshalb ist es notwendig, die Grundlage für weitere Behandlungsmethoden zu erarbeiten. In diesem Zusammenhang ist die vorliegende Arbeit der molekularen Pathogenese der durch *S. pneumoniae* induzierten Pneumonie adressiert, bzw. der Regulation des pro-inflammatorischen Zytokins IL-15 im pulmonalen Kompartiment.

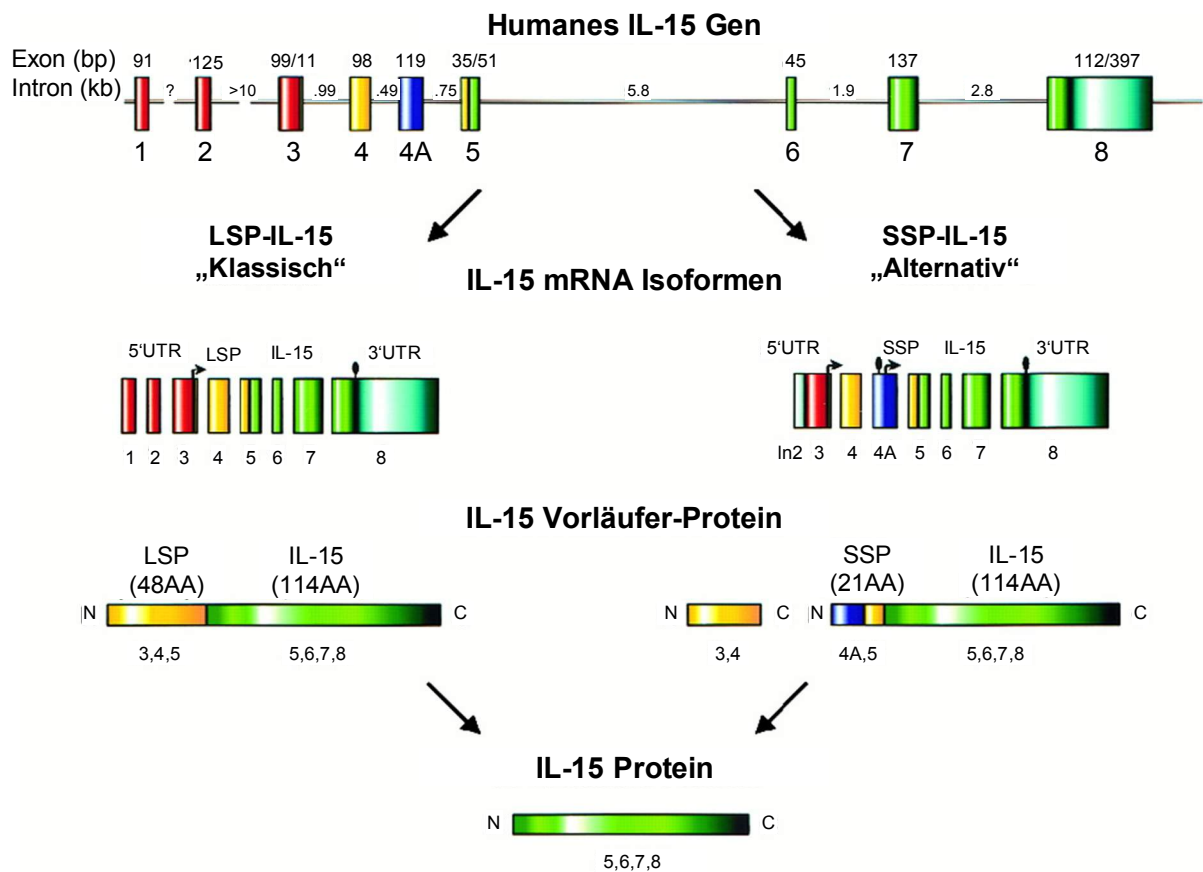
### **1.3 Das Zytokin Interleukin-15**

Das Zytokin IL-15 ist ein pleiotropes, pro-inflammatorisches Interleukin mit einem zentralen Einfluss auf Homöostase und Aktivierung von Zellen der Immunabwehr (49).

IL-15 nimmt unter anderem eine wichtige Rolle in der Bildung und Erhaltung von NK-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und T-Zellen mit dem Oberflächenprotein CD8 (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) ein (50;51). Die Erstbeschreibung erfolgte 1994 durch zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen: Grabstein *et al.* (52) und Bamford *et al.* (53). Beide identifizierten ein Zytokin, welches nach der Elimination des ebenfalls pro-inflammatorischen Zytokins IL-2 die Proliferation der T-Lymphozyten stimulierte.

IL-15 gehört ebenso wie IL-2 zu der 4 $\alpha$ -Helix-Familie und hat eine Größe von 15-17 kDa, im humanen Genom konnte das IL-15-Gen auf dem Chromosom 4q31 lokalisiert werden (52;54).

Es existieren zwei IL-15-mRNA-Isoformen, welche zum gleichen reifen IL-15-Protein führen. Die beiden IL-15-Vorstufenproteine unterscheiden sich jedoch durch die Signalsequenz: Zum einen ein Protein mit der langen N-terminalen Signalsequenz („Long Signal Peptide“, IL-15-LSP) von 48 Aminosäuren, kodiert von Exon 4 und 5. Zum anderen die kurze Form mit einer Signalsequenz von 21 Aminosäuren („Short Signal Peptide“, IL-15-SSP), welche vom Exon 4a sowie 5 kodiert wird (55-58). Nishimura *et al.* postulierten, dass die intrazellulär vorkommende IL-15-SSP-Variante des Vorläuferproteins durch Kolokalisation mit der Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  eine negative Regulation auf die auch extrazellulär vorkommende IL-15-LSP ausübt (59).



**Abb. 1.1** – Schematische Darstellung vom „Gen zum Protein“: Das humane IL-15-Gen besteht aus neun Exons und acht Introns. Es wurden zwei Isoformen der IL-15-mRNA beschrieben. Das IL-15-LSP mit einer Startsequenz von 48 Aminosäuren, kodiert durch Exon 4 und 5 sowie das alternative IL-15-SSP mit einer Startsequenz von 21 Aminosäuren, kodiert durch Exon 4a und 5. Das reife IL-15-Protein ist identisch. Modifiziert nach Fehninger *et al.* (54).

Die Regulation des Zytokins konnte auf den Ebenen der Transkription, Translation sowie der post-translationalen Modifikation und Translokation nachgewiesen werden. Die Transkription wird mittels verschiedener Transkriptionsfaktoren in der 5'-stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegenden Region reguliert: dem Interferon Regulatory Factor (IRF) 1 und 3, der NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle an der Promotorregion (60) sowie dem Interferon-Stimulated Response Element (50). Eine Hochregulation von IL-15 konnte durch Bindung von NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden (61). Verglichen mit anderen Zytokinen einschließlich IL-2 besteht jedoch eine Diskrepanz zwischen dem ubiquitären Nachweis der IL-15-mRNA und dem vergleichsweise geringen Vorkommen des Proteins (52;56).

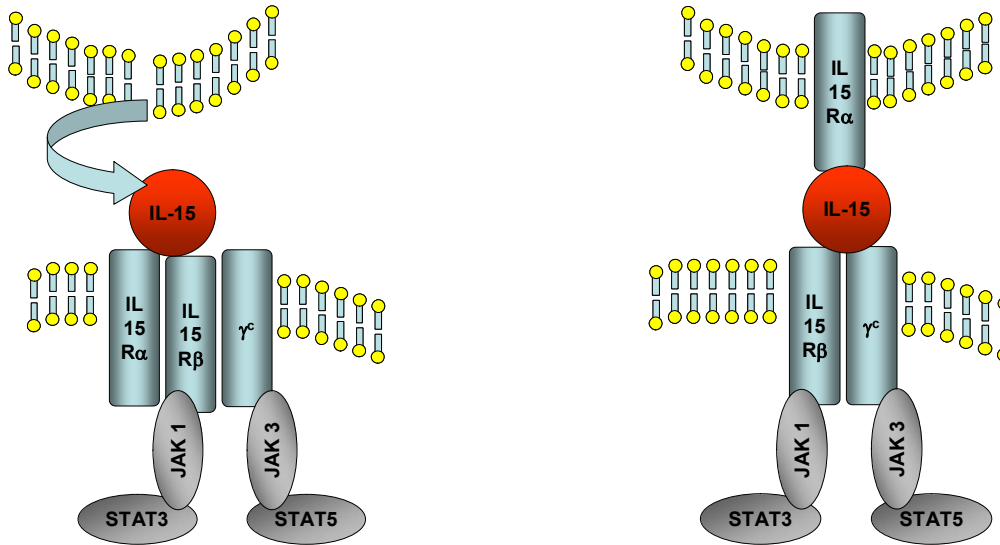
IL-15 hat eine lange und komplexe untranslatierte Region am 5'-Ende der mRNA, die multiple AUG-Sequenzen (5 im murinem, 10 im humanem Genom) einschließt (52;62). Negativ regulatorische Mechanismen der multiplen AUG-Wiederholungen in der

5'-untranslatierten Region (UTR) stromaufwärts des eigentlichen Startcodons, des Startcodons selbst sowie des inhibitorischen cis-Elements am 3'-Ende der IL-15-mRNA sind nachgewiesen worden (56;63). Durch alternatives Splicing können Wirkung und Regulation beeinflusst werden, ohne dass die Expression eines weiteren Gens erforderlich ist (58). Das kürzere Signalpeptid zeichnet sich durch eine höhere Effizienz bei der Translation und das Fehlen von hydrophoben Proteindomänen im Startpeptid des Translationsproduktes im Vergleich zum IL-15-LSP aus. Das vom IL-15-SSP abstammende reife IL-15-Protein wird vermutlich im Zellkern und Zytoplasma gelagert, da keine Kolokalisation in Endosomen, Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat nachgewiesen werden konnte (44;55;57;58).

Die intrazelluläre Verteilung des IL-15-LSP wird ebenfalls durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Nicht glykosyliertes IL-15 verbleibt zum größten Teil im Zytoplasma und wird abgebaut. Die Translokation in das ER, sowie die Sekretion ist meistens mit einer N-Glykosylierung von IL-15 Protein verbunden. Ein weiterer Schritt kann in einer Spaltung des IL-15-LSP bestehen, vermutlich durch eine Elimination von 29 Aminosäuren der LSP-Form (44). Die beobachtete Kolokalisation der IL-15-LSP-Isoform mit Endosomen, ER sowie dem Golgi-Apparat läßt Kurys *et al.* postulieren, dass dieses Protein sezerniert wird, anders als die IL-15-SSP-Isoform (44). Eine Sekretion von IL-15-Protein der LSP-Form führte bei transgenen Mäusen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Salmonella choleraesuis* bei angestiegener Anzahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie einer erhöhten Expression von INF $\gamma$ . Dahingegen bildeten transgene Mäuse mit einer cDNA von IL-15 analog zum IL-15-SSP zwar vermehrt intrazelluläres IL-15, das extrazelluläre nahm jedoch ab. Gleichzeitig sank die Anzahl der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und die Resistenz gegenüber *Salmonella choleraesuis* (59). Diese Beobachtung führt außerdem zu der Vermutung, dass das intrazelluläre IL-15 zur negativen Regulation von IL-15 beiträgt (59).

## 1.4 Der Interleukin-15-Rezeptorkomplex

Der IL-15-Rezeptor besteht ähnlich wie der IL-2-Rezeptor aus einem heterotrimeren Proteinkomplex. An die Rezeptoruntereinheiten IL-2/IL-15R $\beta$  und die „common gamma-chain“ ( $\gamma^c$ ) binden sowohl IL-2 als auch IL-15 (52;53). Spezifisch für IL-15 ist die Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$ , welche IL-15 mit sehr hoher Affinität  $K_a \approx 10^{11} \text{ M}^{-1}$  bindet (50;54), die Affinität von IL-15R $\beta/\gamma^c$  ist dagegen zwei Zehnerpotenzen geringer (54;64;65). Die Aktivierung des IL-15R $\beta/\gamma^c$ -Komplexes führt zu einer Reihe von Signalkaskaden, einschließlich der Aktivierung rezeptorständiger Tyrosinkinase der Janus-Kinasen-Familie (JAK), JAK-1-Kinase über IL-15R $\beta$  sowie der JAK-3-Kinase über  $\gamma^c$ . Anschließend erfolgt die Phosphorylierung von zytosolischen Proteinen „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) STAT5 bzw. STAT3 (54;66). Nach der Phosphorylierung bilden die STAT-Proteine Dimere, welche im Zellkern Gene aktivieren, z.B. für die Induktion der T-Zell-Proliferation (50;67). Weitere Signalwege erfolgen über die Src-abhängige zytoplasmatische Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> und p72<sup>syk</sup> sowie die Induktion der Expression des anti-apoptischen Proteins „B-cell-leukemia 2“ Bcl-2. Eine Infektion mit *S. pneumoniae* induzierte *in vitro* eine Abnahme von Bcl-2 sowie eine verstärkte Apoptose, wohingegen eine Überexpression von Bcl-2 der Apoptose entgegenwirkte (68). Darüber hinaus stimuliert IL-15 die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38. Eine Hemmung von p-38 führte im Tierversuch zu einer Verringerung des septischen Schockes (69). Eine Aktivierung des in den Mastzellen erst später entdeckten IL-15-Rezeptors IL-15RX (70) führt zu einer Phosphorylierung von Jak-2 mit anschließender nukleärer Translokation von STAT5 (50;54;70).



**Abb. 1.2** – Linke Abbildung: Das Protein IL-15 wird von Zellen sezerniert (oben), bindet an den IL-15-Rezeptorkomplex der Zielzelle (unten) und löst dort eine Signalkaskade aus. Rechte Abbildung: IL-15 ist an der IL-15R $\alpha$ -Rezeptoruntereinheit einer Zelle gebunden (oben) und wird der Zielzelle (unten) präsentiert. Modifiziert nach Fehniger *et al.* und Schluns *et al.* (54;71).

Auf der Zellmembran von Monozyten wurde isoliert die IL-15R $\alpha$ -Untereinheit nachgewiesen, welche aufgrund ihrer hohen Affinität für IL-15 mit dem Interleukin einen Komplex bildete. Diese Bindung ermöglicht die Präsentation von IL-15 bzw. deren Aktivierung (Abb. 1.2) über den IL-15R $\beta$ / $\gamma^c$ -Komplex ohne die Notwendigkeit einer eigenen IL-15R $\alpha$ -Untereinheit (54;64;71;72). So wird von aktivierten Monozyten IL-15 gebunden an die hochaffine Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$ , CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert und vermittelt eine Hemmung der Apoptose (64).

## 1.5 Funktion von Interleukin-15 und seines Rezeptors

Eine gesteigerte Expression von IL-15 zeigte sich bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (50;73;74). Durch die gemeinsame Nutzung der  $\beta$ / $\gamma^c$ -Rezeptoruntereinheiten von IL-2 und IL-15 bewirken beide Zytokine zum Teil ähnliche biologische Aktivitäten, insbesondere als Wachstumsfaktor und Aktivator für B-, T- und NK-Zellen (50;54). Jedoch unterscheidet sich IL-15 in der Verbreitung seiner Expression und durch unterschiedliche Phosphorylierungen von JAK-1, JAK-3 und STAT5 mit entsprechenden Gentranskriptionen (50), so wirkt IL-15 unter anderem der Apoptose *in vitro* und *in vivo* entgegen: Durch die Induktion anti-apoptotischer Proteine einschließlich Bcl-2 (75) und Bcl-xL (76), als auch durch Hemmung des Fas (77) und TNF $\alpha$  vermittelten Zelltodes (78). Entsprechend zeigte eine Überexpression von IL-15 in transgenen Mäusen einen



protektiven Effekt gegen die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose mit verbesserter Überlebensrate im gleichen Pathogenmodell (78). *In vitro* zeigten Hocke *et al.* an pulmonalen Epithelzellen eine verminderte Apoptose durch Überexpression von IL-15 (79). *In vivo* konnte IL-15 an renalen Epithelzellen als autokriner Überlebensfaktor nachgewiesen werden (80).

Weiterhin besteht ein ko-stimulierender Einfluss von IL-15 auf aktivierte B-Zellen. Es induziert die Produktion von polyklonalen IgM, IgG1 und IgA, welche zur Differenzierung der B-1-Zellen in IgA-produzierenden Zellen in der Schleimhaut beitragen soll (81;82). Nach dem Pathogenkontakt unterstützt IL-15 durch die Expressionssteigerung von Chemokinen wie z.B. IL-8 und deren Rezeptoren sowie über die Expression von Adhäsionsmolekülen die Rekrutierung immunkompetenter Zellen wie Lymphozyten, NK-Zellen und PMN (83). IL-15 trägt zur Aktivierung und funktionellen Reifung von phagozytierenden Zellen wie den antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, Makrophagen (84), Mastzellen (70) und PMN (85) bei. Dies führt zu einer gesteigerten Produktion inflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF $\alpha$  (84) und INF $\gamma$  (86) sowie einer erhöhten Phagozytosekapazität polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (87). Takano *et al.* wiesen im Mausmodell nach Neutralisierung von IL-15 eine verminderte Resistenz gegenüber *Escherichia coli* bei zeitgleicher Reduzierung von intestinalen intraepithelialen T-Lymphozyten (i-IEL) und einer geringeren Produktion von INF $\gamma$  nach (88). Hirose *et al.* zeigten am Rattenmodell nach oraler Infektion mit *Listeria monocytogenes* eine verstärkte Expression von IL-15 sowie einen Anstieg von i-IEL und INF $\gamma$  und nachfolgender Aktivierung von Makrophagen (89). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Nishimura *et al.*: Die Gabe von rekombinantem IL-15 führte zu einer vermehrten Stimulation der i-IEL der Darmmukosa mit anschließender Hochregulation von INF $\gamma$  nach einer Infektion mit *Salmonella choleraesuis* (90). Diese Untersuchungen und ebenso das hohe Maß der IL-15-Expression in der intestinalen Mukosa zeigten, dass IL-15 ein wichtiger Mediator des intestinalen Immunsystems, vor allem der mukosalen Barriere darstellt, der bereits in einer frühen Phase bedeutend zur effektiven Abwehr mikrobieller Infektionen beiträgt (89).

Das Epithel der Lunge gehört neben dem Darmepithel zu den größten Oberflächen des menschlichen Körpers, die direkten Kontakt zur Umwelt haben. Es konnte gezeigt werden, dass IL-15 nicht nur von intestinalen Epithelzellen, sondern auch von Bronchial- und Alveolarepithelzellen exprimiert wird (79;91;92). Bisher ist nur wenig über die pulmonale zelluläre Verteilung von IL-15, dessen Rezeptor, sowie der Funktion

von IL-15 während infektiöser Lungenerkrankungen bekannt. Der pulmonale Nachweis von IL-15 und dessen mRNA beim Menschen gelang in Alveolarmakrophagen (AM) und PMN im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch Sarkoidose oder Tuberkulose (74;93;94).

Schwere und Häufigkeit der durch *S. pneumoniae* induzierten Pneumonien sowie die Zunahme von Resistenzen gegenüber antibakteriellen Chemotherapeutika erfordern die weitere Erforschung der pathogenetischen Mechanismen. Möglicherweise sind die immunologischen Abwehrmechanismen in der Lunge auch durch Eigenschaften des pro-inflammatorischen Zytokins IL-15 mit beeinflusst. Es sollen deshalb in der vorliegenden Studie die konstitutive zelluläre Verteilung von IL-15 und dessen Rezeptor in der Lunge und die Regulation während der Pneumokokken-Pneumonie am Mausmodell genauer untersucht werden. Verglichen wird darüber hinaus der Verlauf mit der durch die obligat intrazellulär lebenden Bakterien *C. pneumoniae* induzierten Lungeninfektion, welche einen subakuten Krankheitsverlauf aufweist (95;96).

Insbesondere soll auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

- Gibt es eine konstitutive Expression von IL-15-Protein und des heterotrimeren Rezeptorkomplexes IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  im murinen Lungengewebe *in vivo*?
- Wie stellt sich das zelltyp-spezifische Expressionsmuster von IL-15 und dessen Rezeptorkomplex im Lungengewebe von Mäusen unter physiologischen Bedingungen dar?
- Wie verändert sich die zelluläre Expression von IL-15-Protein und des Rezeptorkomplexes während der Infektion mit *S. pneumoniae* im Mausmodell?
- Gibt es unterschiedliche Regulationsmechanismen während der Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zur Infektion mit dem intrazellulären Erreger *C. pneumoniae*?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Maus-Pneumonie-Modell

Für die Tierversuche wurden weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Alter von etwa 10 Wochen und einem Durchschnittsgewicht von ca. 19 g eingesetzt. Die Versuche wurden nach den Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes an der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter Überwachung der Aufsichtsbehörde des Landes Berlin (Landesamt für Gesundheit und Soziales, LAGeSo) in der zentralen Versuchstierabteilung der Charité unter pathogenfreien Bedingungen und 12 h hell-dunkel Rhythmus bei Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Zur Versuchsdurchführung wurden die Tiere in das Labor transportiert.

#### 2.1.1 Infektionsversuche mit *Streptococcus pneumoniae*

##### 2.1.1.1 Vorbereitung der Infektion

Die Infektionsversuche wurden mit einem bekapselten *S. pneumoniae* Serotyp 3 Stamm (NCTC 7978) durchgeführt. Die Keime wurden vor dem Versuch über Nacht in Kultur auf Blutagarplatten mit 5 % (v/v) Schaferythrozyten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten. Zwischen 5 und 10 einzeln stehende Kolonien wurden anschließend in Todd-Hewitt-Bouillion überführt, der 5 % Hefe und 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum zugesetzt war. Die Bakterien wuchsen in dieser Suspension für ca. 4 h (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>) bis zum Beginn der mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Dieser Zeitpunkt wurde photometrisch durch das Erreichen einer optischen Dichte von 0,30 bis 0,35 bei 600 nm Wellenlänge definiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (15 min, 2000 × g), der Überstand verworfen und der Rückstand in sterile PBS auf die Infektionsdosis resuspendiert.

##### 2.1.1.2 Bestimmung der Dosis für Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*

Die Infektionsdosis wurde durch Vorversuche bestimmt, in denen die Überlebenszeit der Tiere sowie die Änderung des Körpergewichtes in Abhängigkeit von der applizierten Keimmenge ( $7,5 \times 10^4$  –  $5 \times 10^6$ ) untersucht wurde. Die letale Dosis (LD) LD<sub>50</sub> lag zwischen  $7,5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Kolonie-Bildende-Einheiten (KBE). Entsprechend des beobachteten Krankheitsverlaufes für die unterschiedlichen Dosen wurde für das

murine Pneumokokken-Modell die Dosis auf  $5 \times 10^6$  KBE festgelegt, um die Induktion einer schweren Pneumonie in einem Zeitraum von bis zu 60 h *post infectionem* (*p.i.*) sicherzustellen (Abb. 3.1).

#### 2.1.1.3 Pneumonie-Modell

In die Experimente wurden drei Gruppen von Mäusen eingeschlossen:

- Durch intranasale Applikation von  $5 \times 10^6$  KBE *S. pneumoniae* (Serotyp 3, NCTC 7978) in 20  $\mu$ l steriler PBS wurden die Tiere infiziert. Die intranasale Applikation fand in leichter Anästhesie, durch intraperitoneale Applikation von 40  $\mu$ l einer Mischung aus fünf Teilen Ketamin (50 mg/ml) und zwei Teilen Xylazin (2 %) statt. Für jeweils fünf unabhängige Versuche wurde die Dauer auf 6, 12, 24, 48 und 60 h *p.i.* festgelegt. Nach dem Erreichen des jeweils festgelegten Zeitpunktes wurden die Lungenflügel in tiefer Anästhesie entnommen.
- Weitere Tiere erhielten eine intranasale Applikation von 20  $\mu$ l steriler PBS, um den Einfluss der Applikation selbst, des Puffers und der Narkose auf die Ergebnisse im Erkrankungsverlauf zu kontrollieren bzw. auszuschließen. 6 bzw. 48 h nach der Applikation wurden jeweils drei Tieren die Lungen in tiefer Anästhesie entnommen.
- In einer weiteren Kontrollgruppe, welche die Grundlage für die Referenzwerte bildete, wurden zehn unbehandelte Tiere untersucht.

Bis zum Ende des Versuches wurden die Tiere zweimal täglich insbesondere auf Änderungen von Aktivität, Sozialverhalten, Gewicht und Status des Fells als klinische Zeichen einer Infektion untersucht. Tiere, die vor dem festgelegten Ende des Versuches moribund wurden, sind in tiefer Anästhesie getötet und vom Versuch ausgeschlossen worden.

#### 2.1.2 **Infektionsversuche mit *Chlamydophila pneumoniae***

Für die Kultivierung von *C. pneumoniae* (TW-183; VR 2282; ATCC, Rockville, MD, USA) wurden HEp-2-Zellen (CCL 23, ATCC) verwendet. Die Anzucht dieser Zellen erfolgte in 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in HEp-2-Kulturmedium („Minimal Essential Medium Eagle“ komplementiert mit: 10 % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, nicht essentielle Aminosäuren, 2,5  $\mu$ g/ml Amphotericin B, 25  $\mu$ g/ml Gentamycin). Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde dieser passager mit 0,25% (w/v) Trypsin in PBS<sup>-</sup> behandelt um die Zellen abzulösen. Die Zellen aller

Kulturflaschen wurden zusammengeführt und zur nächsten Passage im Verhältnis 1:3 auf neue Kulturflaschen verteilt.

Für die Infektion mit *C. pneumoniae* wurde das Kulturmedium modifiziert mit 1 µg/ml Cycloheximid, jedoch ohne fetales Kälberserum. Zur Verbesserung des Kontaktes von Wirtszellen und Erreger wurden die Kulturflaschen vor der Inkubation zentrifugiert (45 min, 800 × g, 37° C). Nach 96 h wurde der Zellrasen mit einem sterilen Schaber vom Boden der Kulturgefäße gelöst und in sterile 50 ml Röhrchen überführt.

Zur Freisetzung der Chlamydien bzw. Zerstörung der HEp-2-Zellen wurde die Zellsuspension nach Zugabe von sterilen Glasperlen mit einem Laborschüttler für 90 s behandelt. Das chlamydienhaltige Zelllysat wurde zentrifugiert (45 min, 800 x g) und nach Resuspension des Sedimentes in SPG-Puffer erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Sediment Pellet erneut in SPG-Puffer aufgenommen und in 50 µl Portionen bei -80° C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration von *C. pneumoniae* erfolgte mittels Giemsa-Färbung infizierter HEp-2-Zellen, 48 h nachdem diese mit jeweils verschiedenen Verdünnungsstufen des Chlamydien-Überstandes behandelt wurden. Nach Fixierung der HEp-2-Zellen für 10 min in Methanol (-20° C) und anschließendem Trocknen wurden die Zellen für 30 min in 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung gefärbt und die Anzahl von Einschlusskörpern je 100 HEp-2-Zellen bestimmt, beziehungsweise die Anzahl der „inclusion forming units“ pro Milliliter (ifu/ml) ermittelt.

Für die Infektion mit *C. pneumoniae* wurden analog zu den Versuchen mit *S. pneumoniae* 5×10<sup>6</sup> KBE in einem Gesamtvolumen von 50 µl mittels eines Mikrosprayers (Penn-Century, Philadelphia, PA, USA) intratracheal appliziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 50 µl einer Suspension von HEp-2-Zellen oder eines sterilen Puffers. Die Infektionsdauer wurde auf 6 h, sowie 1, 3, 6 und 9 d *p.i.* für jeweils fünf Versuche festgelegt, bei den Kontrollen lag sie bei 3 und 9 d *p.i.* für jeweils fünf Versuche.

### **2.1.3 Entnahme der Lungen und experimentelles Protokoll**

Nach tiefer Narkotisierung durch intraperitoneale Applikation von 200 µl des Ketamin-Xylazin-Gemisches wurde die Trachea durchtrennt und eine intratracheale Kanüle eingelegt. Diese wurde an ein Beatmungsgerät für Mäuse (Mini Vent Typ 845, Hugo

Sachs Elektronik, March-Hugstetten) angeschlossen und die Beatmung mit einem Volumen von 120 ml/Hub Umgebungsluft (Frequenz: 150/min) durchgeführt.

Nach Laparotomie und Eröffnung des Diaphragmas wurden zur Antikoagulation 40 I.E. Heparin intrakardial appliziert. Anschließend wurden die Tiere sternotomiert und durch Eröffnung des rechten Ventrikels entblutet.

In der Pulmonalarterie wurde ein Katheter fixiert und zur Ermöglichung eines pulmonal-venösen Abflusses die Herzspitze entfernt. Die Lungen wurden 3 min mit ca. 4° C kalter Kochsalzlösung (0,9 %) gespült, um Serum und Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate über flüssigem Stickstoff getrocknet und für die weiteren Untersuchungen vorbereitet.

## **2.2 Nachweis des Proteins von IL-15 und seines Rezeptors**

### **2.2.1 Immunhistologie**

In die entnommenen Lungen wurde ein Gefriermedium aus einem Gemisch von gleichen Teilen PBS und OCT-Tissue Tek intratracheal instilliert, anschließend wurden sie über flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lungenflügel wurden an der trachealen Bifurkation getrennt und jeweils separat bei -80° C gelagert.

Von den Präparaten beider Lungenflügel wurden mit dem Gefrierschnittmikrotom (Kryostat HM560, Microm International, Walldorf) 10 µm Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern (Menzel Glaser, Braunschweig) aufgenommen. Präparate aller Lungen wurden in einer Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) standardisiert, nach Romeis (97) histologisch gefärbt und mikroskopisch auf einen regelrechten Zustand der Organstrukturen hin überprüft.

#### 2.2.1.1 Aufbereitung der Präparate

Zur Fixierung wurden die Präparate 5 min mit 3 %-iger Paraformaldehyd-Lösung behandelt und anschließend 3 × 5 min in PBS (0,01 M, 150 mM NaCl, pH 7,6) gespült.

Für intrazelluläre Färbungen wurde zur Permeabilisierung der Zellmembranen 1 % Triton X-100 in PBS für 15 min verwendet. Bei extrazellulären Färbungen wurde dieser Schritt übersprungen. Zur Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Schnitte für 30 min in PBS, die 5 % Serum der Spezies des sekundären Antikörpers (AK), 1 % Bovines Serum Albumin (BSA) und 0,05 % Tween-20 enthielt, vorinkubiert. Über Nacht wurde mit einem polyklonalen primären AK bei 4° C in PBS inkubiert,

dem 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 zugesetzt waren (Tab. 2.1). Die Schnitte wurden 3 × 5 min mit PBS gespült und mit dem entsprechenden sekundären AK (Verdünnung 1:2000) zusammen mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 erneut über Nacht inkubiert. Diese affinitäts-gereinigten IgG F<sub>(ab)2</sub>, Fragmente von AK mit einer Speziesspezifität gegen Ziege (705-4513, Rockland, Gilbertsville, PA, USA) beziehungsweise Kaninchen (711-1524, Rockland), waren kovalent an das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gebunden.

Diese Markierung wurde mit dem „Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit“ entsprechend dem Protokoll des Herstellers nachgewiesen. Die endogene AP wurde mit dem Substrat 2,5 mM Levamisol gehemmt. Die Zellkerne der Präparate wurden mit Methylgrün gegengefärbt und in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe entwässert. Anschließend wurden sie mit dem Lösungsvermittler Roticlear behandelt und mit dem permanenten Eindeckmedium Clarion unter einem Deckglas versiegelt.

Kontrollfärbungen, bei denen der primäre sowie der primäre und der sekundäre AK durch unspezifisches Serum ersetzt waren, wurden jeweils mitgeführt.

#### 2.2.1.2 Antikörper

Der immunhistologische Nachweis von IL-15 und dessen Rezeptoruntereinheiten IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  wurden polyklonale AK Santa Cruz (Heidelberg) verwendet, sowie der monoklonale AK MAB647 von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) (Tab. 2.1).

**Tab. 2.1** – Auflistung der verwendeten primären AK in der Immunhistologie und deren Verdünnung  
\* AK MAB647 wurde primär markiert mit dem „Zenon Alexa Flour 680 Mouse IgG, Labeling Kit“

Protein	Antikörper	Bestell-Nr.	Verdünnung
IL-15	goat anti-mouse	sc-1296	1:100
IL-15	mouse anti-human	MAB647	1:100*
IL-15R $\alpha$	goat anti-mouse	sc-5526	1:100
IL-2R $\beta$ / IL-15R $\beta$	rabbit anti-mouse	sc-672	1:20
IL-2R $\gamma$ / IL-15R $\gamma$ / $\gamma^c$	rabbit anti-mouse	sc-670	1:100

**Tab. 2.2** – Auflistung der verwendeten sekundären AK in der Immunhistologie

Spezifität	Label	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung
goat anti-rabbit	AP	Rockland, 711-1524	1:2000
Rabbit anti-goat	AP	Rockland, 705-4513	1:2000

Als Negativkontrolle für die Spezifität der Immunfärbung mit den AK von Santa Cruz wurden Versuche mit den jeweils korrespondierenden blockierenden Peptiden des gleichen Herstellers vorgenommen. Die primären AK wurden entsprechend den Protokollen von Santa Cruz vorinkubiert. Hierzu wurde vor der Verwendung der AK im Verdünnungsmedium mit dem jeweiligen korrespondierenden „Blocking Peptide“ im Überschuss inkubiert. Für alle vier untersuchten AK konnte eine erfolgreiche Unterdrückung der AK-Bindung durch die jeweiligen spezifischen „Blocking Peptide“ festgestellt werden.

Zur Bestätigung der zellulären Expression von IL-15 wurde ein weiterer, monoklonaler Maus-anti-IL-15-AK von R&D Systems eingesetzt (Minneapolis, MN, USA). Dieser wurde primär mit dem „Zenon Alexa Flour 680 Mouse IgG Labeling Kit“ (Z-25010, 70B1-1) von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) entsprechend dem Protokoll des Herstellers inkubiert. Dabei wurde der primäre AK vor der Anwendung am Gewebe mit einem Alexaflourochrom markiert.

#### 2.2.1.3 Auswertung der Intensität der Immunfärbung

Zur Dokumentation der Immunfärbungen in der Hell-Feld-Mikroskopie wurde eine digitale Farbbildkamera (AxioCam HRc, Zeiss) benutzt. Die Intensität der Immunfärbung wurde in 200-facher Vergrößerung semiquantitativ mit einer Skala von 0 bis 5 bewertet [keine (0), sehr schwach (1), schwach (2), deutlich (3), stark (4), sehr stark (5)]. Die Ergebnisse wurden durch einen zweiten Untersucher überprüft.



Insgesamt wurden untersucht:

- zehn Lungen unbehandelter Kontrolltiere
- jeweils drei Lungen von Tieren, denen sterile PBS intranasal instilliert wurde, mit einer jeweiligen Versuchsdauer von 6 bzw. 48 h
- jeweils fünf Lungen von Mäusen zu den Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 60 h nach transnasaler Infektion mit *S. pneumoniae*
- jeweils fünf Lungen von Mäusen zu den Zeitpunkten 6 h, sowie 1, 3, 7 und 9 d nach transnasaler Infektion mit *C. pneumoniae*
- jeweils fünf Lungen von Tieren, denen HEp-2-Zellen intranasal instilliert wurden, analog zu den Infektionsversuchen mit *C. pneumoniae*, mit einer jeweiligen Versuchsdauer von 3 bzw. 9 d.

Mit immunhistologischen Färbungen wurde die Expression von IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  an der Gewebeoberfläche untersucht. Weiterhin wurde eine Färbung gegen IL-15 an zuvor mit Triton X-100 permeabilisierten Schnitten durchgeführt, um die intrazelluläre Expression zu untersuchen. Von jeder Lunge wurden in beiden Flügeln alle Bronchien sowie alle positiv gefärbten anderen Strukturen semiquantitativ ausgewertet (Tab. 3.1-5).

#### 2.2.1.4 Digitale Bildanalyse

Die gefärbten Präparate wurden nach erfolgter semiquantitativer Bewertung anschließend mittels digitaler Bildanalyse ausgewertet. Alle Einstellungen am Mikroskop (Objektiv: 40x / 1,3 Oil; Plan-Neofluar, Zeiss) wurden stets konstant gehalten, als Lichtquelle diente eine stabilisierte Halogenlampe (HAL100, Zeiss, Jena). Zur Messung wurde ein auf die Absorption des Vector Red Substrates abgestimmter optischer Filter (zentrale Wellenlänge: 525 nm, Halbbandbreite: 10 nm  $\pm$  2 nm) von Chroma Technology Corp. (Brattleboro, VT, USA) verwendet. Vor den Messungen ist das System mit einem Referenz-Objektträger überprüft worden.

Mit einer an das Mikroskop (Axioskop 2 mot, Zeiss) angeschlossenen digitalen monochromen Kamera (AxioCam MRm, Zeiss) wurden von den zu untersuchenden Strukturen Graustufenbilder hergestellt. Die Bilder wurden als 12-Bit Graustufen-Bilder auf einem Pentium III 1 GHz Computer (FSC, Paderborn) mit einer linearen Modulations-Amplitude digitalisiert. Daraus ergab sich eine Skalierung der Grauwerte in Intensitätsstufen von 0 bis 4095. Die Messung der mittleren Grauwerte der jeweils

untersuchten Struktur wurde mit dem Programm ImagePro 4.5 (Media Cybernetics, Del Mar, CA, USA) durchgeführt.

Zur Visualisierung wurde eine Falschfarbenskala gewählt. Basierend auf Messungen der Hintergrundfärbung, die verursacht wird durch unspezifische Absorption, unspezifische Antikörperbindung und falsch positives Farbsignal, wurden ausschließlich Intensitäten jenseits von 995 Grauwertstufen als spezifische Signale in die Messungen einbezogen und Signale unterhalb dieser als Hintergrund (Schwarz) definiert.

Nachdem sich in der konventionellen Auswertung der Immunfärbungen eine deutliche Änderung der Expression von IL-15 nach Infektion mit *S. pneumoniae* darstellte, schloss sich eine digitale Bildanalyse an. Bei den mit *C. pneumoniae* behandelten Lungen fand sich keine Änderung, weshalb diese von einer weiteren Bildanalyse ausgeschlossen wurden. Insgesamt wurden gemessen:

- rechte und linke Lunge von zehn Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe
- rechte und linke Lunge von jeweils drei Tieren der Kontrollgruppe, 6 bzw. 48 h nach Applikation von steriler PBS
- rechte und linke Lunge von jeweils fünf mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen von jedem Versuchsendpunkt (6, 12, 24, 48, 60 h *p.i.*).

Von der jeweils zu untersuchenden Gewebestruktur wurden fünf bis zehn Graustufenbilder von einem Schnitt erstellt, der mittlere Grauwert bestimmt und in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel 9.0, Microsoft, Unterschleißheim) übertragen. Die Ergebnisse einer Lunge wurden gemittelt und als Ergebnis eines unabhängigen Experimentes gewertet.

Die Ergebnisse der Kontrolltiere dienten als Bezugsgröße für die Skalierung der Grauwerte des entsprechenden Kompartimentes der infizierten Tiere. Die Ergebnisse der einzelnen unabhängigen Experimente wurden als Grauwerte in Prozent des mittleren Grauwertes der entsprechenden Strukturart in der unbehandelten Kontrollgruppe für jedes untersuchte Kompartiment (proximales und distales Bronchialepithel, Bronchialmuskulatur, Gefäßmuskulatur von Arterien, Venen und teilmuskularisierten Gefäßen, Alveolarmakrophagen, Alveolarepithelzellen, Alveolarsepten) angegeben.

## 2.2.2 Westernblot

### 2.2.2.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Dabei wurden die Proteine (80 µg) in SDS-Ladepuffer (Glyzerin 200 µl, SDS 10 % (w/v) 0,4 ml, Bromphenolblau 1 % (w/v) 100 µl, *A. bidest.* 950 µl), der mit β-Mercaptoethanol (1 % (v/v) 100 µl) versetzt wurde, zur Denaturierung für 5 min bei 95° C erhitzt.

Es wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel nach Laemmli (98) mit einem niederprozentigen Sammelgel (0,5 M, Tris-HCl, pH 6,8) und einem höherprozentigem Trenngel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) verwendet. Für IL-15 wurde ein 10 %-iger Acrylamid-Anteil, für Aktin ein von 13 %-iger Anteil benutzt. Das gegossene Sammelgel wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde dieses entfernt, das Sammel- über das Trenngel geschichtet und anschließend Kämme eingesetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung im Laufpuffer (Glycin 14,4 g, Trizma Base 3 g, SDS 1 g, *A. bidest. ad* 1000 ml) erfolgte bis zum Einlaufen der Proteine in das Trenngel mit 100 V, dann weiter mit konstant 120 V. Als Standard für das Molekulargewicht wurde der Rainbow-Marker (Amersham Life Science, Braunschweig) verwendet.

**Tab. 2.3** – Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele

	Trenngel (10 %)	Trenngel (13 %)	Sammelgel
A. bidest.	4,85 ml	4 ml	6 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl
Acryl-/Bisacrylamid 40 %	2,5 ml	3,35 ml	1,3 ml
APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl

### 2.2.2.2 Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese auf eine Blotmembran aus Nitrozellulose (Hybond-ECL, Amersham Life Science) übertragen, mit einer eisgekühlten Nass-Apparatur bei 100 V für 1 h in Transferpuffer (14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, *A. bidest ad* 1000 ml). Der Transfer wurde mit einer

reversiblen Proteinfärbung der Membran durch Ponceau S (1 Spatelspitze, 5 ml Eisessig; *A. bidest.* ad 100 ml) kontrolliert und anschließend durch Waschen mit *A. bidest.* wieder entfernt. Die verbliebenen Proteinbindungskapazitäten der Membran wurden mit einem Blockierungspuffer (Odyssey™ Blocking Buffer LI-Cor Biosciences, Bad Homburg), der zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt wurde, für 90 min abgesättigt. Der immunologische Nachweis von IL-15 erfolgte mit einem polyklonalen AK (sc-1296, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg), verdünnt 1:2000 in einem Medium aus gleichen Teilen Blockierungspuffer und PBS mit 0,1 % Tween. Am nächsten Tag wurde die Membran mit PBS gespült und 1 h mit einem IRDye800-markiertem sekundären AK (Odyssey infrared imaging system, LI-Cor Biosciences) inkubiert, verdünnt 1:2000 in dem gleichen Medium wie der primäre AK. Die Messung und Dokumentation erfolgte mit dem „Odyssey Infrared Imaging Systems“ (LI-Cor Biosciences), zur semi-quantitativen Messung wurde die „Equal Protein Load“ bestimmt. Die gebundenen AK wurden zunächst mit einem Stripping-Puffer (1,9 g Glycin, 1 % SDS, *A. bidest.* ad 1000 ml, pH 2,0) von der Membran entfernt, anschließend gewaschen und dann wurden erneut freie Proteinbindungskapazitäten abgesättigt. Für die Messung wurde das „Extracellular-Signal-Related Kinase 2“ (ERK2) mit einem polyklonalen primär AK (sc-154, Santa Cruz) und einem Cy5.5 markiertem sekundär AK (LI-Cor Biosciences) nachgewiesen.

## 2.3 Nachweis der IL-15-mRNA

### 2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Gefrorenes Lungengewebe wurde analog zum WB (2.2.2) homogenisiert. Die RNA wurde mit dem „RNEasy Mini Isolation Kit“ (Quiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers extrahiert und die Reinheit fotometrisch mittels des A260/A280 Quotient bestimmt. Für die Synthese der cDNA wurden 2 µg RNA mit dem Pro Star First Strand Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit einem Oligo (dT) Primer revers transkribiert. Es wurde jeweils eine PCR von murinem IL-15 mit 40 Zyklen (jeweils 1 min 95° C, 63° C und 72° C) sowie von mG3PDH (murine Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) zur Bestimmung der relativen Mengen von cDNA durchgeführt. Die Proben wurden in 1,2 % Agarose-Gel aufgetrennt. Als Primer wurde für murines IL-15 (5'-GCC ATA GCC AGC TCA TCT TC-3' und 5'-GCA

ATT CCA GGA GAA AGC AG-3') sowie für mG3PDH (5'-TGA TGG GTG TGA ACC ACG AG-3' und 5'-TCA GTG TAG CCC AAG ATG CC-3') verwendet. Die erwartete Länge des PCR-Produktes lag für IL-15 bei 337 und entsprechend für mG3PDH bei 496 Basenpaaren.

### **2.3.2 Mikroarray Transkriptom-Analyse**

Für die Extraktion der RNA wurden die entnommenen Lungen in 1 ml TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem Ultraturrax T8 Homogenisator (IKA, Staufen) homogenisiert. Die Homogenate aus drei Lungen einer Gruppe wurden zusammengeführt, in Fraktionen von je 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei minus 80° C gelagert. Die gesamte RNA wurde nach dem Auftauen des 1 ml Aliquots mit dem RNEasy-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt, mit dem 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Böblingen) quantifiziert und die Integrität überprüft. 4 µg der gesamten RNA wurden mit dem Oligo-dT-T7-Promotor-Primer entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Agilent Technologies) revers zu cDNA transkribiert. Gleichzeitig wurde bei dieser linearen fluoreszenten Vervielfältigungsreaktion die cRNA mit Cyanidin 3-CTP oder Cyanidin 5-CTP (NEB Life Science Products, Invitrogen) markiert. Zur Vermeidung von farbspezifischen Artefakten sowie zur Verbesserung der Datenanalyse wurde ein „Color Swap“ durchgeführt. Dafür wurde jeweils eine Hälfte der vorbereiteten RNA eines Ansatzes mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Nach der Vorbereitung, Reinigung und Quantifizierung wurden 1,25 µg der jeweils markierten cRNA gemischt, fragmentiert und auf einem „8.4 Custom in situ Mouse Array“ entsprechend den Angaben des Herstellers (Agilent Technologies) hybridisiert. Zum Auslesen des Chips wurde ein DNA Mikroarray Laser Scanner (Agilent Technologies) mit einer Auflösung von 5 µm mit dem Bildanalyseprogramm des gleichen Herstellers (Version A4.045) in den Standardeinstellungen benutzt. Die Datenanalyse erfolgte mit einer Rosetta Inpharmatics Plattform (Resolver Built 3.0.0.3.22). Die Transkriptom-Analyse wurde mit drei Replikationen von unabhängigen Proben einer Gruppe durchgeführt. Die Präparation der RNA und die Hybridisierung wurden dreimal für jede Gruppe vorgenommen, die durch „Color Swap“ zu sechs unabhängigen Messungen führte.

## 2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Beurteilung der Ergebnisse wurde der Kruskal-Wallis Test für nicht parametrische Daten angewendet. Für den Vergleich der einzelnen Gruppen mit der Normgruppe wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert  $< 0,05$  akzeptiert.

Die Angabe von Mittelwerten erfolgte  $\pm$  SD (Standardabweichung). Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

**Tab. 2.4** – Auflistung der verwendeten Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid 40 %	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Amphotericin B	Boehringer, Ingelheim am Rhein
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Clarion	Biomeda, Foster City, CA, USA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Becton Dickinson, Heidelberg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Apotheke der Charité, Berlin
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma-Aldrich, München
Giemsa's Färbelösung	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefe	Becton Dickinson, Heidelberg
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaliumdihydrogenphosphat	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaninchen-Serum-Serum	Sigma-Aldrich, München
Ketamin	Merck, Darmstadt
Levamisol	Vector Laboratories, Peterborough, UK
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
May-Grünwalds Färbelösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylgrün	Sigma-Aldrich, München
Minimal Essential Medium Eagle	Biochrom, Berlin
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	R&D Systems, Wiesbaden
Natriumchlorid	Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS)	Serva, Heidelberg
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
OCT Tissue Tek	Plano, Wetzlar
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphate buffered saline (PBS) -/- (ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom, Berlin

---

Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roticlear	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich, München
Saccharose	Sigma-Aldrich, München
Todd-Hewlett-Bouillion	Becton Dickinson, Heidelberg
Tris HCl	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Boehringer, Ingelheim am Rhein
Trizma Base	Sigma-Aldrich, München
Trypsin EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Xylazin	Bayer Animal Health, Leverkusen
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich, München

---



## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Verlauf der murinen bakteriellen Pneumonie

#### 3.1.1 Klinischer Verlauf der pulmonalen Infektion

Die Infektionsdosis für *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) wurde entsprechend des beobachteten Krankheitsverlaufes für die unterschiedlichen Dosen ermittelt (Abb. 3.1). Die Letale Dosis 50 (LD<sub>50</sub>) lag zwischen  $7,5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Kolonie-Bildende-Einheiten (KBE). Entsprechend des beobachteten Krankheitsverlaufes für die unterschiedlichen Dosen wurde für das murine Pneumokokken-Modell die Dosis auf  $5 \times 10^6$  KBE festgelegt.

Die mit *S. pneumoniae* infizierten Mäuse zeigten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer klinische Zeichen einer Pneumonie: Erschwerte Atmung, verminderte Aktivität, struppiges Fell mit Spuren von eitrigem Sputum. Ein Gewichtsverlust von ca. 10 - 20 % konnte zwischen 48 - 60 h *p.i.* festgestellt werden (Abb. 3.2).

Dagegen fanden sich keine sichtbaren Veränderungen bei den Tieren die mit *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) infiziert wurden sowie den Kontrollgruppen (Daten nicht gezeigt).

#### 3.1.2 Histopathologische Veränderungen des Lungengewebes

Leukozyteninfiltrate als Zeichen von entzündlichen Veränderungen im Lungengewebe ließen sich 24 h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* nachweisen. Der überwiegende Anteil der infiltrierenden Leukozyten bestand aus neutrophilen Granulozyten. Diese waren sowohl im alveolären Kompartiment als auch in perivaskulären und peribronchialen Lungenanteilen vorhanden. In den perivaskulären und peribronchialen Infiltrationen war darüber hinaus eine deutliche Anzahl von Lymphozyten nachweisbar. Ausgeprägte alveoläre Destruktion von Teilen des Lungenparenchyms sowie eine weitere Zunahme der Leukozyteninfiltration zeigten sich 48 h *p.i.* (Abb. 3.3).

Diese Veränderungen waren nicht nachweisbar in den Präparaten:

- 6 und 12 h nach transnasaler Infektion mit *S. pneumoniae*,
- bei der unbehandelten Kontrollgruppe,
- bei Mäusen nach transnasaler Applikation von sterilem PBS (6 und 48 h).

Die Lungen der mit *C. pneumoniae* infizierten Tiere zeigten histopathologisch Veränderungen ausschließlich in Form von mononukleären peribronchialen Infiltraten (HE-Färbung nicht gezeigt, siehe immunhistologische Abb. 3.11 b, d).

## 3.2 Nachweis von IL-15

### 3.2.1 Konstitutive Expression und Lokalisation von IL-15

Das IL-15-Protein konnte in pulmonalem Gewebe durch Westernblot (WB) nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Ebenfalls ließ sich die mRNA von IL-15 in der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (Abb. 3.5 a) sowie der Mikroarray Transkriptom Analyse (MTA) (Abb. 3.5 c) darstellen.

Durch indirekte immunhistologische Färbungen ließ sich IL-15-Protein zelltypspezifisch in mehreren pulmonalen Strukturen nachweisen. Eine intrazelluläre Expression zeigte sich deutlich in Bronchialepithelzellen (BEZ) der proximalen und distalen Atemwege (Abb. 3.6 a). Eine positive Färbung konnte in einzelnen Zellen der Alveolarsepten beobachtet werden, welche morphologisch Alveolarepithelzellen (AEZ) Typ I entsprachen (Abb. 3.6 b). In Alveolarmakrophagen (AM) stellte sich ebenfalls das Zytokin dar (Abb. 3.6 c). Zellen der glatten Gefäßmuskulatur der Pulmonalarterien und -venen im Bereich der Hili sowie der Bronchialarterien zeigten eine geringe Expression von intrazellulärem IL-15 (Abb. 3.6 a).

Vergleichend mit dem IL-15 AK von Santra Cruz wurden exemplarisch Immunfärbungen mit dem monoklonalen AK von R&D Systems durchgeführt. Hierfür wurde der AK mit einem roten Fluorochrom markiert. Das Signal entspricht dem des polyklonalen AK (Abb. 3.6 e, f)

Extrazellulär wurde IL-15 ebenfalls deutlich auf AM und BEZ nachgewiesen (Abb. 3.9), jedoch konstitutiv nur auf der apikalen Seite der BEZ (Abb. 3.9 a). Eine schwache extrazelluläre Expression ließ sich auch auf der Muskulatur von Bronchien und Bronchialarterien darstellen. Keine Expression fand sich auf der Oberfläche von AEZ (Abb. 3.9 c).

### 3.2.2 *Streptococcus pneumoniae* induzierte Regulation von IL-15

Nach der Infektion mit *S. pneumoniae* zeigte sich ein Anstieg von IL-15-Protein im WB (Abb. 3.4 a). Durch Densitometrie der WB-Proteinbanden ließ sich eine Zunahme der Expression von IL-15 in den Proteinlysaten des Lungengewebes 24 h *p.i.* nachweisen, die bis 48 h *p.i.* zunahm. Bei 60 h *p.i.* nahm jedoch die Konzentration im Vergleich zum vorherigen Wert etwas ab (Abb. 3.4 b).

Auf der Ebene der mRNA konnte mit der RT-PCR bzw. deren Densitometrie für alle untersuchten Zeitpunkte (12, 24, 48 h *p.i.*) eine Hochregulation gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 3.5 a, b). Die MTA zeigte ebenfalls eine Hochregulation der mRNA des Zytokins, darüber hinaus ließ sich auch eine Zunahme der hochaffinen Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  darstellen (Abb. 3.5 c).

Entsprechend der im WB dargestellten Expressionssteigerung von IL-15-Protein wurden die murinen Lungen einer zelltypspezifischen Analyse mittels Immunhistologie unterzogen. Zunächst wurde untersucht, ob es zu einer *de novo* Expression in weiteren Zelltypen im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. An residenten Lungenzellen konnte dies nicht nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch eine schwach positive Färbung von PNMs in den alveolären, perivaskulären und peribronchialen Infiltraten, die im Verlauf der Pneumonie konstant blieb. Weitergehend wurden alle Lungenstrukturen entsprechend der Immunfärbung semiquantitativ mit einer Skala von 0 bis 5 [keine (0), sehr schwach (1), schwach (2), deutlich (3), stark (4), sehr stark (5)] bewertet (Tab. 3.1). IL-15 wurde im Infektionsverlauf intrazellulär verstärkt in den BEZ der proximalen und distalen Atemwege sowie in den AM nachgewiesen. In den AEZ war ausschließlich in Gebieten mit leukozytären alveolären, perivaskulären und peribronchialen Infiltrationen ein allerdings nur mäßiger Anstieg der Expression von IL-15 feststellbar, die Expression in nicht infiltrierten Gebieten blieb dagegen unverändert. Eine unveränderte Expression konnte in Zellen der glatten Muskulatur gezeigt werden (Tab. 3.1).

Neben dem intrazellulären Nachweis von IL-15 gelang der Nachweis einer extrazellulären Expression auf BEZ und AM, die nach der Infektion mit *S. pneumoniae* ebenfalls deutlich zunahm (Abb. 3.9; Tab. 3.2). Bemerkenswert ist, dass die BEZ nicht nur einen Anstieg von IL-15 auf der apikalen Seite im Vergleich zur

konstitutiven Expression zeigten, sondern auch eine *de novo* Expression auf der basolateralen Seite (Abb. 3.9 b). Infiltrierende Leukozyten wiesen eine schwache extrazelluläre Expression von IL-15 auf, deren Intensität in den betroffenen Arealen im Verlauf der Infektion unverändert blieb.

Im Gegensatz zu den infizierten Mäusen konnten weder bei den unbehandelten Kontrolltieren noch bei den Mäusen mit intranasaler PBS-Gabe (6 bzw. 48 h nach Applikation) Veränderungen in der Expression von IL-15 nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Immunfärbungen, die eine deutliche Zunahme von intrazellulärem IL-15 nach der Infektion mit *S. pneumoniae* zeigten, wurden durch ein beobachterunabhängiges Verfahren überprüft. Hierfür ist die etablierte Technik der semiquantitativen densitometrischen Bildanalyse angewendet worden (99). Von den zu untersuchenden Strukturen wurden digitale Graustufenbilder erstellt. Die entsprechenden Strukturen wurden einzeln umrandet, anschließend erfolgte die Messung der mittleren Grauwerte der jeweiligen Struktur mit einem speziellen Bildanalyseprogramm. Die gewonnenen Daten wurden statistisch ausgewertet. Die digitale Bildanalyse für die intrazelluläre Regulation von IL-15 bestätigte die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung. Weiterhin konnte die zuvor beobachtete Zunahme der Färbung in BEZ und AM statistisch signifikant gesichert werden. Die Hochregulation der IL-15-Expression in BEZ und AM ließ sich bereits innerhalb von 6 h nach der transnasalen Infektion mit *S. pneumoniae* beobachten.

Im proximalen und distalen Bronchialepithel stellte sich eine zunehmende Expression von IL-15-Protein dar, welche bis zum gewählten Endpunkt von 60 h nach der Applikation der Pneumokokken anstieg (Abb. 3.7 a, b). Zu den Zeitpunkten 48 und 60 h *p.i.* war der statistische Anstieg bezogen auf die Kontrollgruppe hoch signifikant (Abb. 3.8 a, b). Besonders ausgeprägt war die Hochregulation in den BEZ in den Gebieten, in denen leukozytäre Infiltrate flächig den Bronchus beziehungsweise die Bronchialarterien erfassten.

Für die AEZ konnte ebenfalls eine deutliche Hochregulation des Zytokins nachgewiesen werden, die ein Maximum 48 h *p.i.* erreichte (Abb. 3.7 c, d), jedoch nur in Regionen mit leukozytären Infiltraten. Eine statistische Signifikanz ließ sich nicht nachweisen (Abb. 3.8 c, d). AM zeigten einen statistisch hoch signifikanten Anstieg von IL-15-Protein (Abb. 3.7 e, f), das Maximum bestand hier bereits zwischen den Zeitpunkten 6 und 12 h *p.i.* im

weiteren Verlauf nahm die IL-15-Expression wieder ab und erreichte nach 60 h wieder das Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 3.8 e, f). In Gebieten mit leukozytären Infiltraten nahm die IL-15-Expression von AM langsamer ab und blieb bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt erhöht.

### 3.2.3 Nachweis der Spezifität des Signals in der Immunhistologie

Parallel zu den immunhistologischen Nachweisen von IL-15 wurden Kontrollfärbungen ohne primären AK bzw. ohne primären und sekundären AK durchgeführt, die kein Signal ergaben. Für die polyklonalen AK (Tab. 2.1) stellt der Hersteller (Santa Cruz) ein spezifisches BP zur Verfügung, eine Signalunterdrückung konnte für den gegen IL-15 gerichteten polyklonalen AK (sc-1296) erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 3.6 d). Weiterhin wurden exemplarisch mit einem monoklonalen AK von R&D die Immunfärbungen wiederholt. Der AK wurde zuvor mit einem roten Alexa-Fluorochrom markiert. Durch die Überlagerung mit der Autofluoreszenz des Gewebes (Grün) stellt sich das IL-15-Protein Orange dar, mit einer analogen Verteilung im Vergleich zum AK von Santa Cruz (Abb. 3.6 e, f).

Mit dem jeweiligen spezifischen BP wurden ebenfalls die drei weiteren polyklonalen AK (anti IL-15R $\alpha$ , anti IL-15R $\beta$ , anti  $\gamma^c$ ) überprüft, hier wurde ebenfalls eine Signalunterdrückung bewirkt, welche auf die Spezifität der AK hinweist (Abb. 3.10 c, f, i).

## 3.3 Nachweis des IL-15-Rezeptorkomplexes

### 3.3.1 Pulmonale Lokalisation der Rezeptoruntereinheiten

Der IL-15-Rezeptor besteht ähnlich wie der IL-2-Rezeptor aus einem heterotrimeren Proteinkomplex. An die Rezeptoruntereinheiten IL-2/IL-15R $\beta$  und die common gamma-chain ( $\gamma^c$ ) binden sowohl IL-2 als auch IL-15. Spezifisch für IL-15 ist die Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$ , die IL-15 mit sehr hoher Affinität bindet. Ergänzend zur Bestimmung des Zytokins wurde deshalb auch die Expression und Regulation der drei Rezeptoruntereinheiten untersucht.

Im Lungengewebe der nicht infizierten Mäuse wurde die IL-15R $\alpha$ -Untereinheit auf den BEZ, AEZ, Gefäßmuskelzellen und AM nachgewiesen. An der Oberfläche von BEZ konnte es in den Kontrolllungen nur auf der apikalen Oberfläche nachgewiesen werden, ähnlich dem Interleukin (Abb. 3.10 a, Tab. 3.3).

Die IL-15R-Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma^c$  wurden in der Kontrollgruppe auf den BEZ, den Zellen der glatten Muskulatur, den AEZ sowie den AM nachgewiesen (Abb. 3.10 d, Tab. 3.4 bzw. Abb. 3.10 g, Tab. 3.5).

### 3.3.2 *Streptococcus pneumoniae* induzierte Regulation der Rezeptoruntereinheiten

Während der Infektion mit *S. pneumoniae* erfolgte eine deutliche Hochregulation von IL-15R $\alpha$  auf den BEZ. Im stimulierten Lungengewebe konnte nach 24 h analog zum Zytokin eine zusätzliche *de novo* Expression an der basolateralen Seite der BEZ nachgewiesen werden, die jedoch im weiteren zeitlichen Verlauf konstant blieb (Abb. 3.10 a, b, Tab. 3.3). AEZ zeigten in der späten Phase der Infektion eine geringe Zunahme der Expression von IL-15R $\alpha$ . Eine veränderte IL-15R $\alpha$ -Expression konnte nicht auf den Zellen der glatten Muskulatur oder den AM nachgewiesen werden. Die auf den infiltrierenden Leukozyten darstellbare Oberflächenexpression von IL-15R $\alpha$  blieb während der Pneumokokken-Pneumonie ebenfalls konstant.

Die pulmonale Expression von IL-15R $\beta$  bleibt dagegen während der Pneumokokken-Pneumonie unverändert, auch die auf den infiltrierenden Leukozyten vorhandene Oberflächenexpression von IL-15R $\beta$  zeigte während der Pneumonie mit *S. pneumoniae* keine Änderung (Abb. 3.10 d, e; Tab. 3.4).

Die Expression von  $\gamma^c$  blieb ebenfalls im Verlauf der Pneumonie auf den BEZ, den AEZ, den Zellen der glatten Muskulatur und auf den AM unverändert (Abb. 3.10 g, h; Tab.3.5).

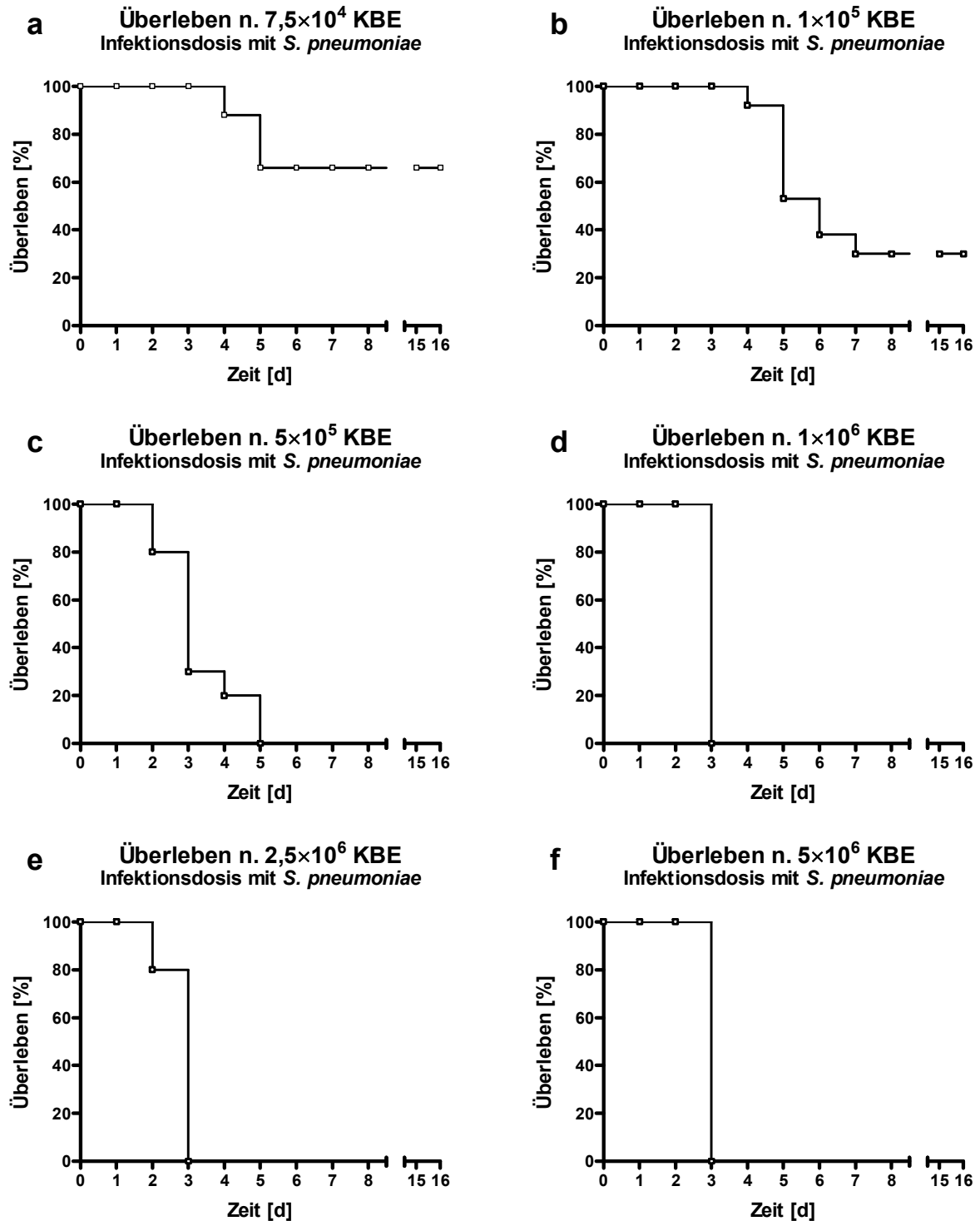
Die Untersuchung der mRNA von IL-15R $\alpha$  mittels MTA zeigte eine Hochregulation auf der Ebene der Transkription 12 h nach der Infektion mit *S. pneumoniae*, die 24 h bzw. 48 h *p.i.* weiter erhöht war (Abb. 3.5 c).

### **3.4 Histologische Veränderungen und immunhistologische Regulation des Zytokins im Verlauf einer pulmonalen Infektion mit *Chlamydophila pneumoniae***

Nach der pulmonalen Infektion mit *C. pneumoniae* ließen sich histologisch peribronchiale Infiltrationen von mononukleären Zellen nachweisen, die ein Maximum nach 9 bis 12 Tagen *p.i.* erreichten. Im Unterschied zu den mit *S. pneumoniae* infizierten Lungen fand sich kein Einstrom von PMN in Form perivaskulärer oder perialveolärer Infiltrate.

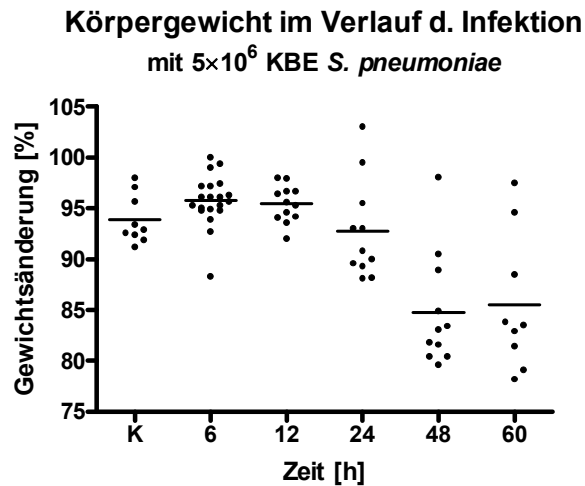
Immunhistologisch blieb die pulmonale Verteilung von IL-15 in den BEZ, der Muskulatur von Bronchien und Gefäßen ebenso wie in den AEZ und AM während der gesamten Versuchsdauer von 9 d *p.i.* im Vergleich zu der Kontrollgruppe unverändert. Die mononukleären Infiltrationen zeigten keine IL-15 Expression (Abb. 3.11).

### 3.5 Abbildungen zu den Ergebnissen

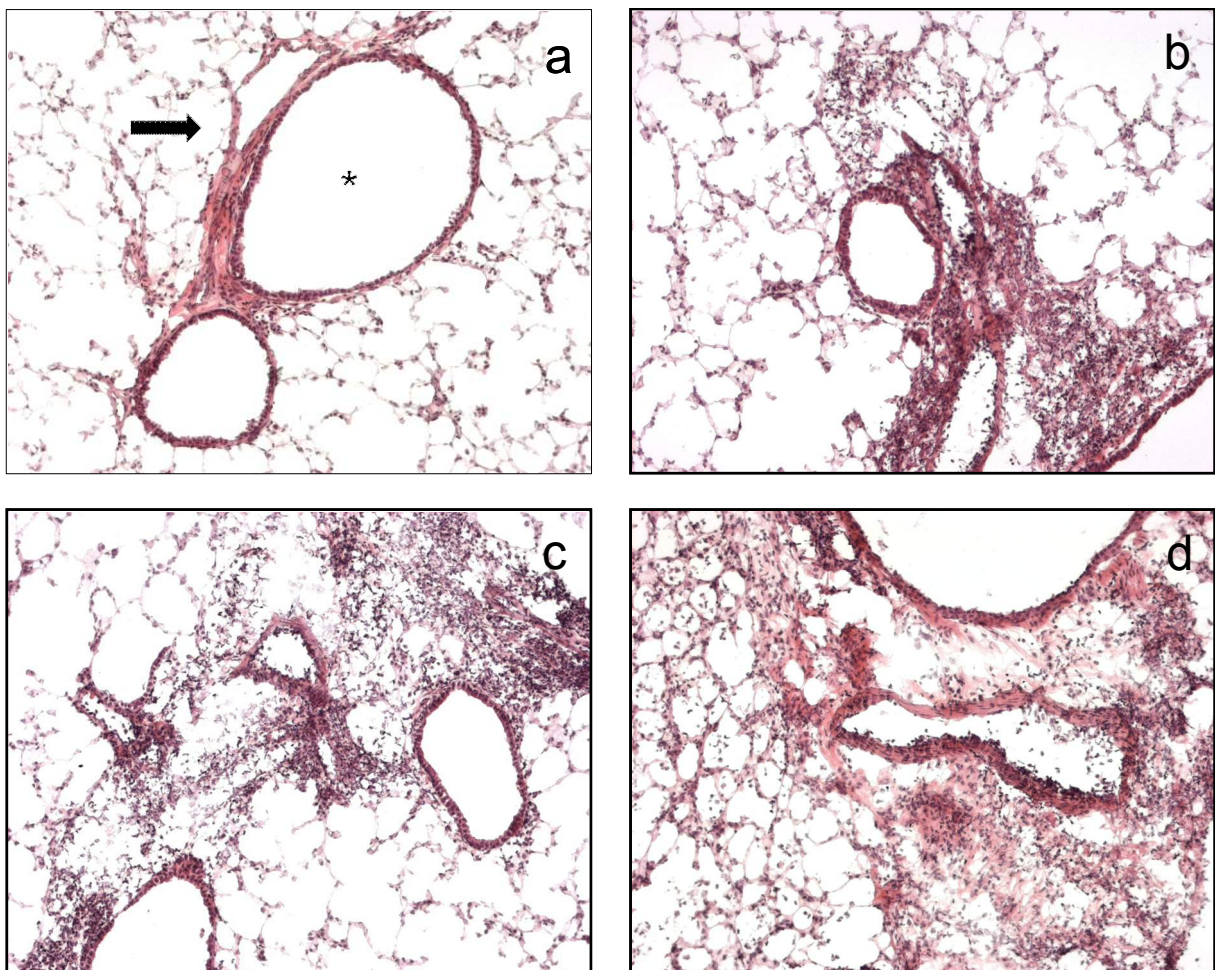


**Abb. 3.1** – Überlebenszeit nach Infektion mit *S. pneumoniae* in unterschiedlichen Dosen. Die  $LD_{50}$  liegt zwischen  $7,5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  KBE. Entsprechend den beobachteten Krankheitsverläufen für die unterschiedlichen Dosen wurde für das murine Pneumokokken-Modell diese auf  $5 \times 10^6$  KBE festgelegt, um die Induktion einer schweren Pneumonie sicherzustellen.



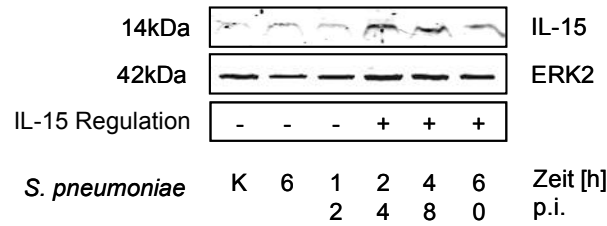


**Abb. 3.2** – Änderung des Körpergewichts (Median) im Verlauf der Infektion mit *S. pneumoniae*, Angaben in Prozent bezogen auf das Ausgangsgewicht. Jedes Versuchstier wurde bis zum Erreichen der festgelegten Versuchsdauer an den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48, 60 h *p.i.* gewogen. Bereits 12 h *p.i.* war eine Gewichtsabnahme zu beobachten, die im Verlauf der Infektion weiter fortschritt. Bei dem letzten Untersuchungszeitpunkt, 60 h *p.i.* hatten die Tiere 15% des Gewichts verloren, weitere 12 h *p.i.* ließ sich ein Gewichtsverlust um nochmalige 5 % beobachten (nicht abgebildet).

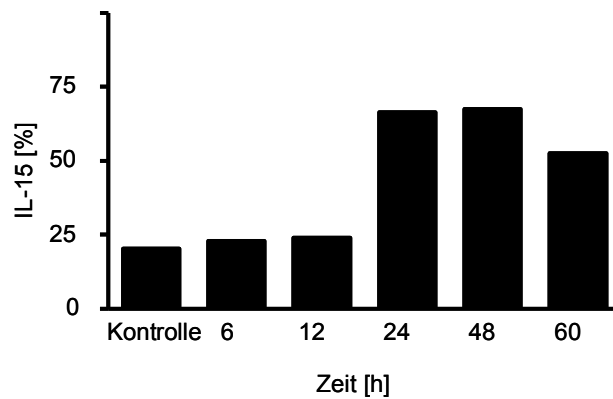


**Abb. 3.3** – Histologische Lungenpräparate in HE-Färbung. **(a)** Präparat aus der Gruppe unbehandelter Tiere, Bronchus (Stern) mit begleitender Arterie (Pfeil). **(b, c, d)** Präparate aus Lungen, die 48h *p.i.* mit  $5 \times 10^6$  KBE *S. pneumoniae* entnommen wurden. Neben starker alveolärer Destruktion, Zunahme von Alveolarmakrophagen und leukozytären Infiltraten zu beobachten. Originalvergrößerung x400.

### a Westernblot

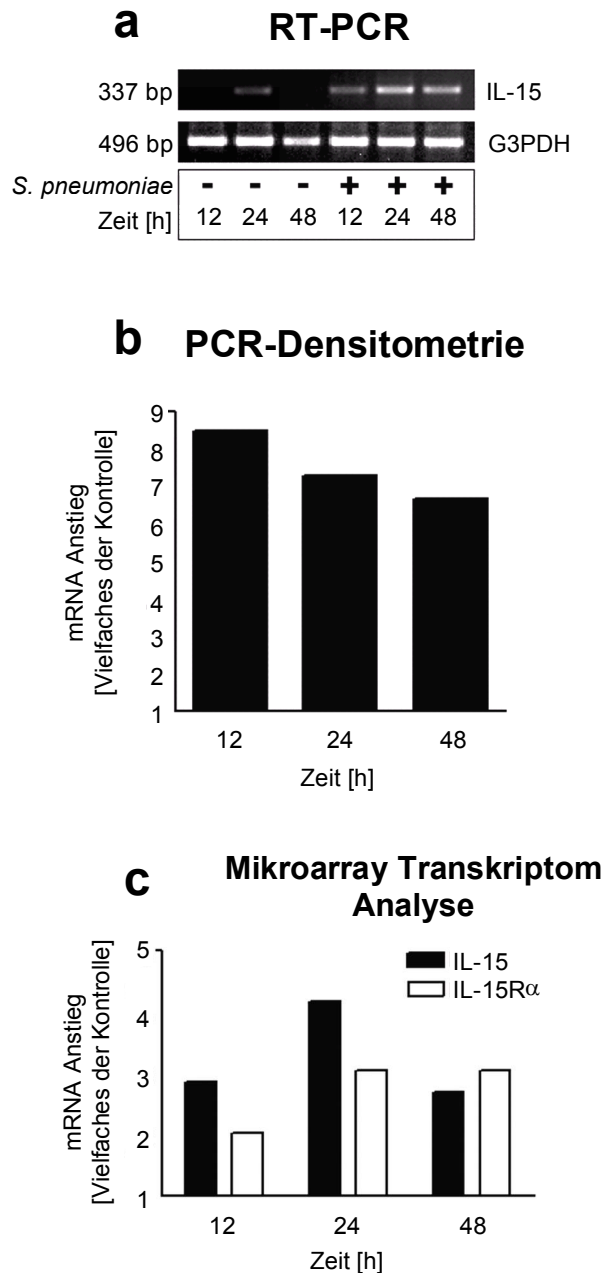


### b WB-Densitometrie



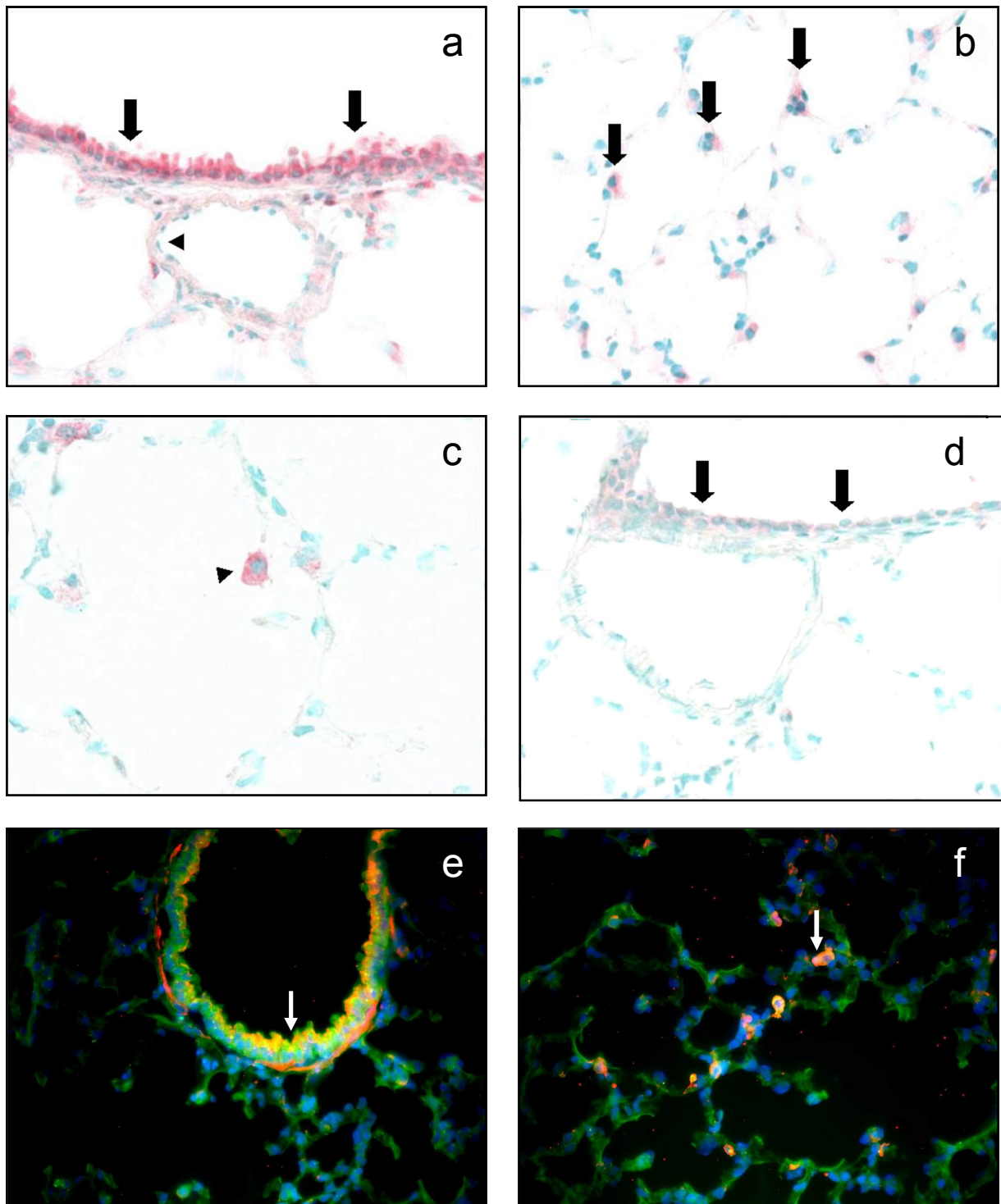
**Abb. 3.4** – Nachweis der pulmonalen Expression von IL-15 und dessen Anstieg im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie mittels Westernblot und semiquantitativer Densitometrie.

- (a) Die IL-15 entsprechenden Banden zeigen eine deutliche Verbreiterung in den Proben aus Lungen 24, 48 und 60 h *p.i.* im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe. Der ERK2-Standard bleibt unverändert.
- (b) In der semiquantitativen Densitometrie des IL-15-Signals im Verhältnis zur ERK2- Kontrolle zeigt sich 24 und 48 h *p.i.* eine starke Zunahme von IL-15, die im weiteren Verlauf wieder abnimmt.

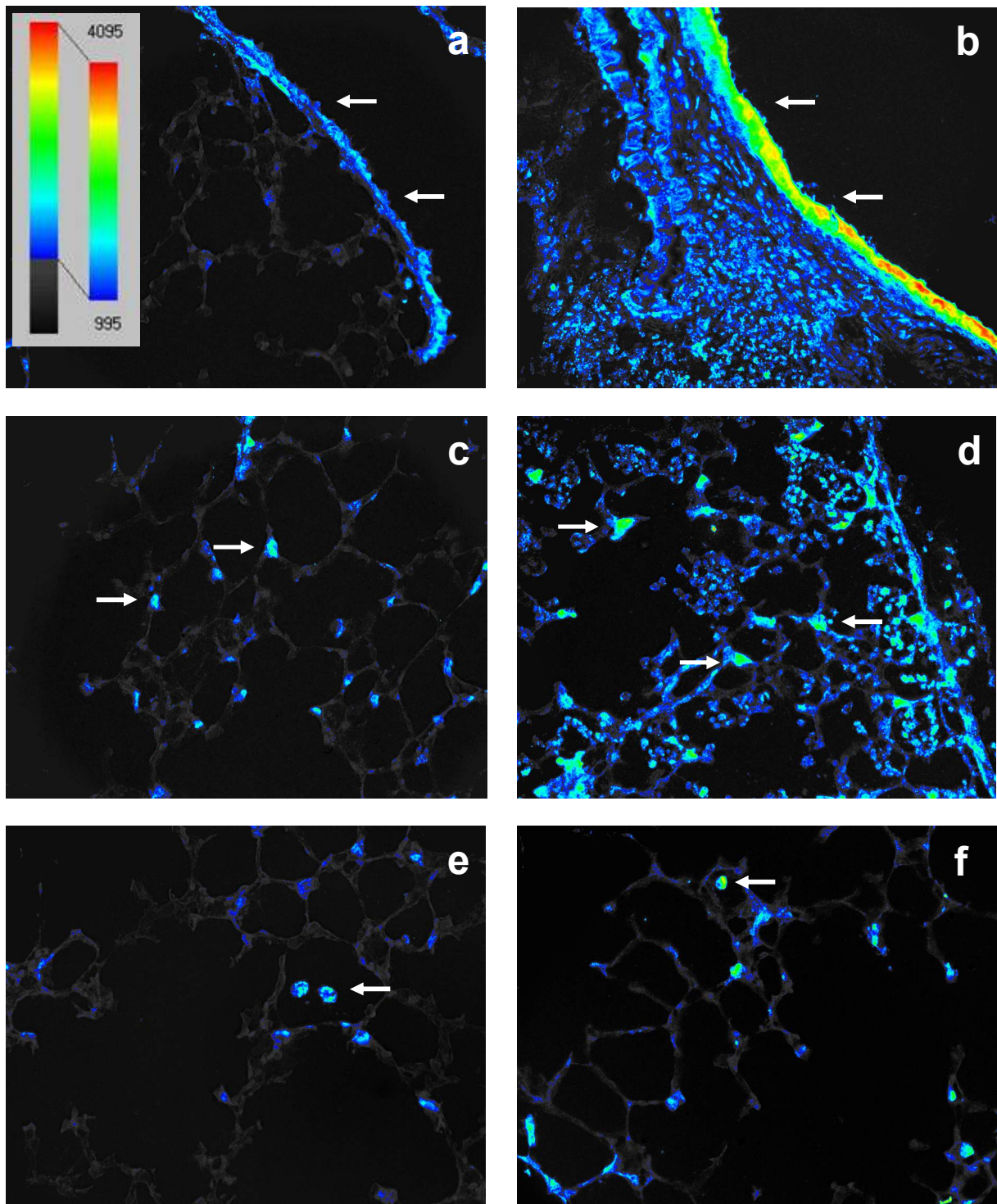


**Abb. 3.5** – Transkriptionale Hochregulation von pulmonalem IL-15 im Verlauf einer Pneumokokken-Pneumonie. Nach transnasaler Infektion mit  $5 \times 10^6$  KBE *S. pneumoniae* wurde bei Erreichen der vorgegebenen Versuchsdauer (12, 24, 48 h *p.i.*) in den entnommenen Lungen die RNA isoliert. Die Daten basieren aus jeweils fünf unabhängigen identischen Versuchen.

- (a) Nachweis der Hochregulation von IL-15mRNA mittels RT-PCR, sowie semiquantitativer Messung durch Bezug auf G3PDH-Referenz.
- (b) Densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR, deutlicher Anstieg der IL-15mRNA in murinem Lungengewebe nach Infektion mit *S. pneumoniae*.
- (c) In der Mikroarray Transkriptomanalyse von IL-15 und IL-15R $\alpha$  zeigt sich jeweils eine statistisch signifikante Hochregulation ( $p < 0.001$ ) von IL-15 und IL-15R $\alpha$  im Vergleich zur Kontrollgruppe (Definiert als 1).



**Abb. 3.6** – Intrazelluläre Expression von IL-15 in murinem Lungengewebe. **(a)** Deutliche Färbung von Bronchialepithelzellen (Pfeil) und leichte Färbung der glatten Muskulatur von Bronchialarterien (Pfeilspitze), sowie **(b)** von Alveolarepithelzellen (Pfeil) und **(c)** Alveolarmakrophagen (Pfeilspitze). **(d)** Durch Vorinkubation des IL-15-AK mit dem entsprechenden BP wurde die Spezifität des Signals überprüft, die Intensität der Färbung war deutlich reduziert. **(e, f)** Repräsentativ, zur Kontrolle des Signals des IL-15-AK von Santa Cruz wurden Färbungen mit dem monoklonalen AK von R&D wiederholt. Hierfür wurde der AK mit dem „Zenon™ One Alexa Labeling Kit A680“ zuvor mit einem roten Fluorochrom entsprechend dem Protokoll des Herstellers markiert. Die Bilder sind jeweils eine digitale Kombination aus dem Signal des AK (Rot), der Gegenfärbung mit DAPI (blaue Zellkerne) und der grünen Autofluoreszenz der Zellen. Durch Überlagerung mit der Autofluoreszenz stellt sich das Signal Orange dar, es entspricht dem des polyklonalen AK. **(e)** Deutliches Signal im Bronchialepithel (Pfeil) und **(f)** in Alveolarepithelzellen (Pfeil). Originalvergrößerung x400 (a, b, d, e, f), x630 (c).

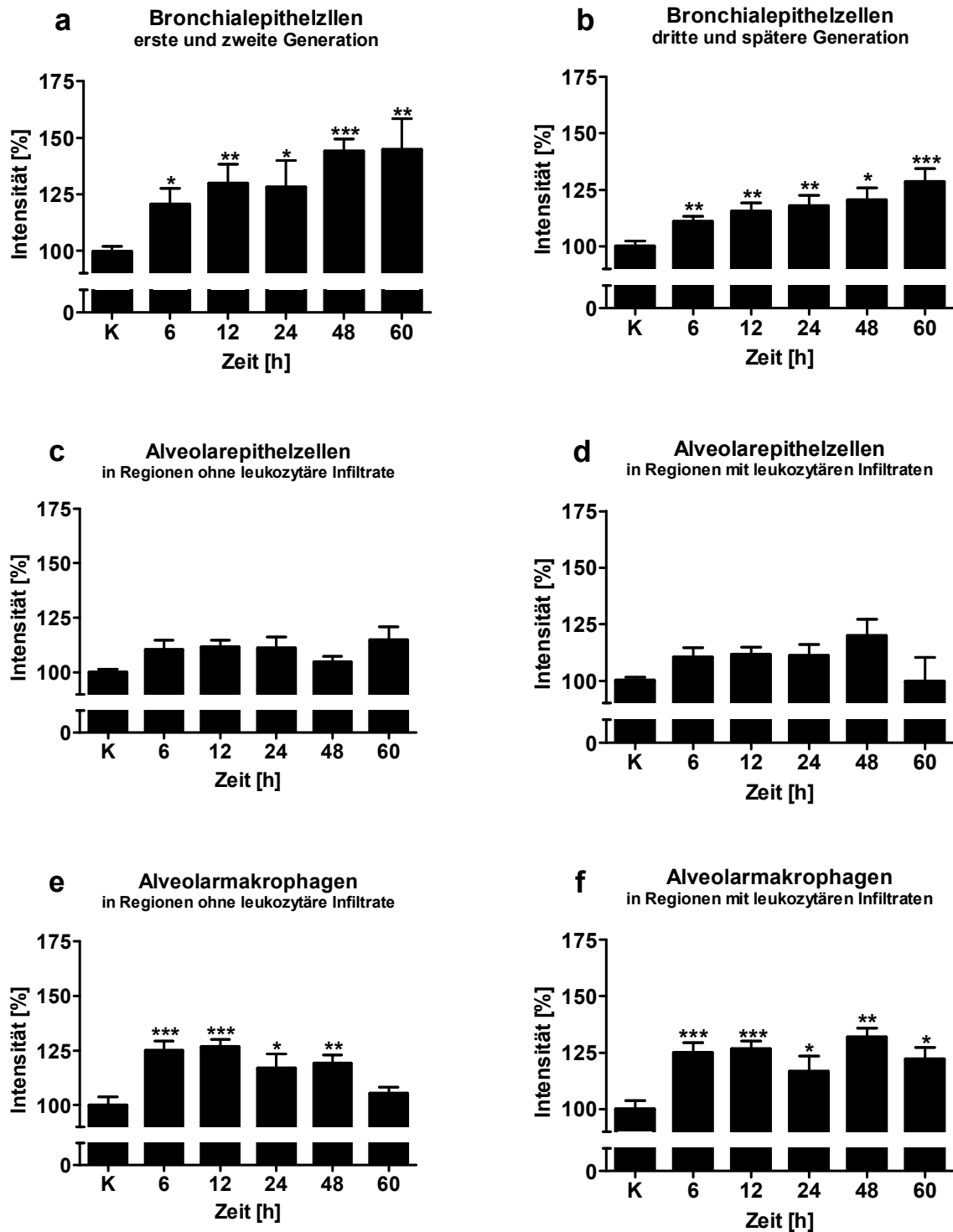


**Abb. 3.7** – Ergebnisse der digitalen Bildanalyse als Falschfarbendarstellung zur intrazellulären Expression von IL-15 in Lungenschnitten aus der Kontrollgruppe (a, c, e) und 48 h nach transnasaler Infektion mit *S. pneumoniae* (b, d, f). Repräsentative Auswahl von jeweils fünf unabhängigen Versuchen. Originalvergrößerung x400.

**(a, b)** IL-15-Expression war stark erhöht in Bronchialepithelzellen (Pfeile), während in glatter Muskulatur von Bronchialarterien keine Veränderung beobachtet wurde. Infiltrierende Leukozyten zeigten ein geringes Signal.

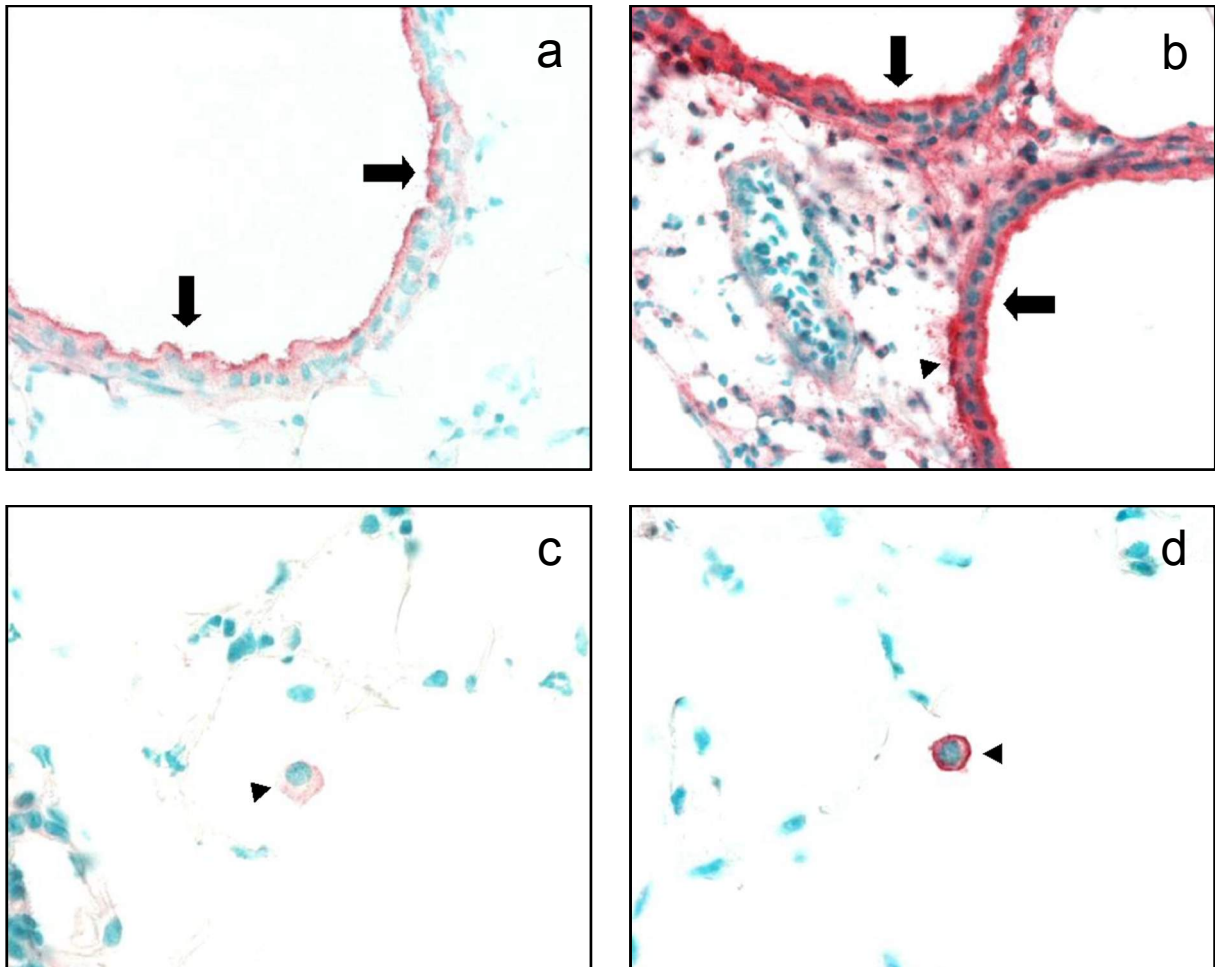
**(c, d)** Deutliche Hochregulation von IL-15 im Verlauf der Infektion an Alveolarepithelzellen (Pfeile).

**(e, f)** Alveolarmakrophagen (Pfeile) zeigen ebenfalls einen Anstieg von IL-15.



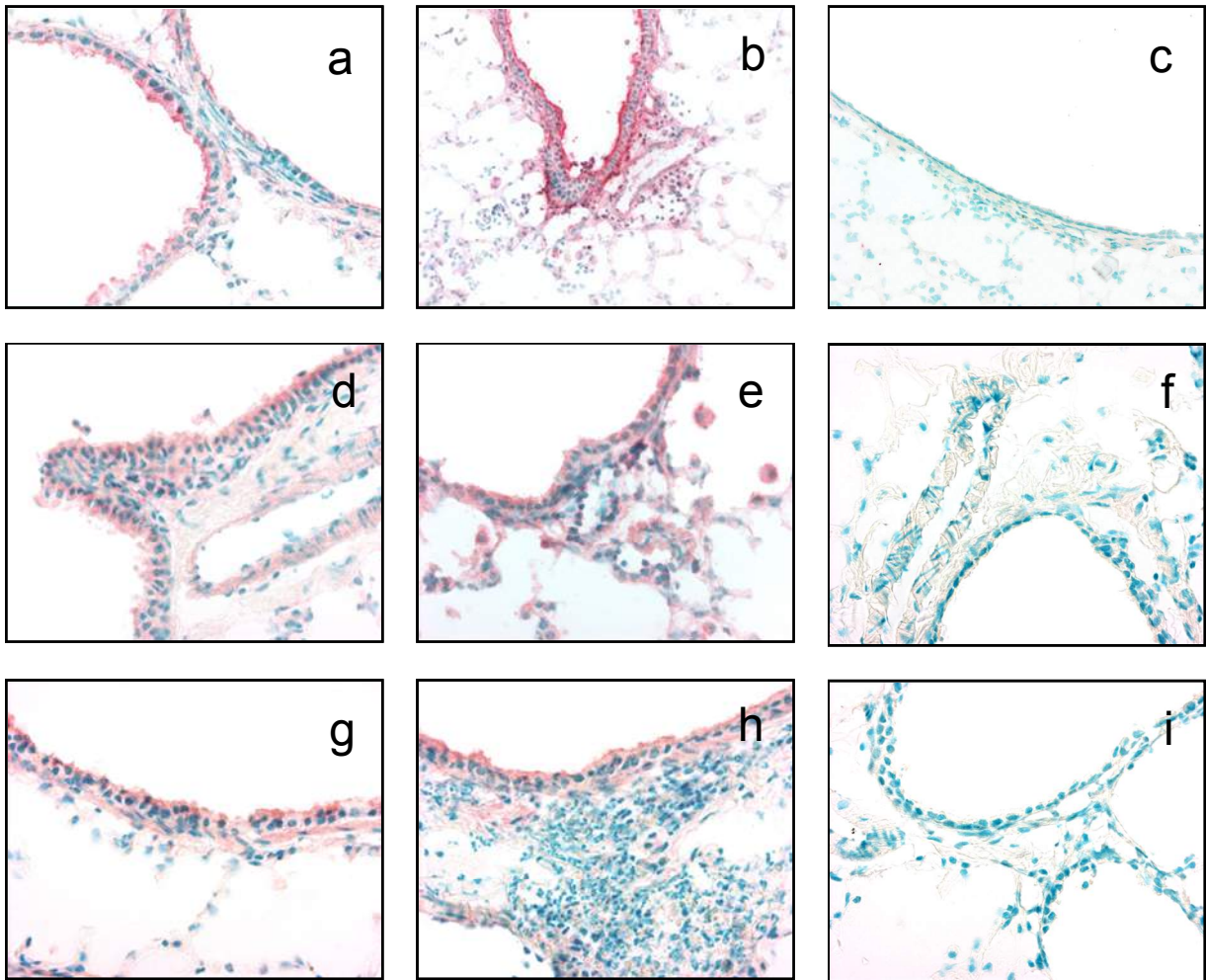
**Abb. 3.8** – Ergebnisse der digitalen Bildanalyse zur intrazellulären Expression von IL-15 in Bronchialepithel-, Alveolarepithelzellen und in Alveolarmakrophagen im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie. Die Expression ist angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus fünf unabhängigen Versuchen in Prozent der Graustufenskala bezogen auf die Messungen der Kontrollgruppe (entspr. 100%). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

(a) Bronchialepithel der proximalen Atemwege, (b) Bronchialepithel der distalen Atemwege, (c) Alveolarepithelzellen in Regionen ohne leukozytäre Infiltrate, (d) in Regionen mit leukozytären Infiltraten, (e) Alveolarmakrophagen in Regionen ohne leukozytäre Infiltrate, (f) in Regionen mit leukozytären Infiltraten.



**Abb. 3.9** – Extrazelluläre Expression von IL-15 im murinem Lungengewebe unbehandelter Tiere (a, c), und 48 h nach transnasaler Infektion mit *S. pneumoniae* (b, d). Die Abb. sind eine repräsentative Auswahl aus jeweils fünf voneinander unabhängigen Versuchen. Originalvergrößerung x400 (a, b), x630 (c, d).

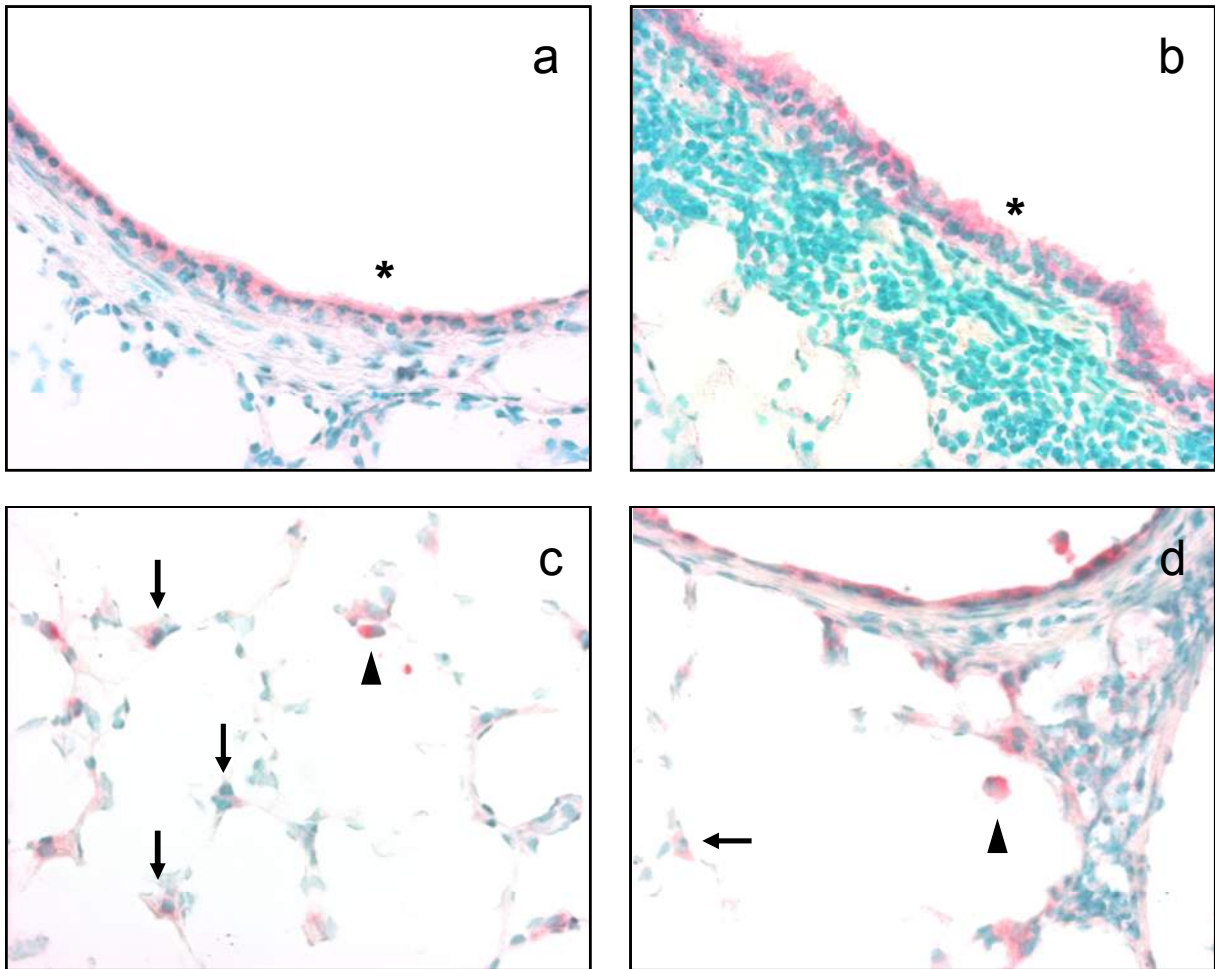
- (a, b) In unbehandeltem murinen Lungengewebe wurde IL-15 an der apikalen Seite von Bronchialepithelzellen exprimiert (a), im Verlauf der Infektion zeigte sich neben einem deutlichen Anstieg auf der apikalen Seite auch eine starke *de novo* Expression an der basalen Seite (b).
- (c, d) Nachweis von IL-15 an der Oberfläche von Alveolarmakrophagen (Pfeil) im Lungengewebe der Kontrolltiere (c), deutliche Zunahme der IL-15-Expression 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* (d).



**Abb. 3.10** – Immunhistologischer Nachweis des extrazellulären IL-15-Rezeptorkomplexes im Lungengewebe unbehandelter Tiere (a, d, g) und 48 h nach transnasaler Infektion mit *S. pneumoniae* (b, e, h). Die Abb. sind eine repräsentative Auswahl aus jeweils fünf (a, b, d, e, g, h) bzw. drei (c, f, i) voneinander unabhängigen Versuchen. Originalvergrößerung x400 der Abb. a, b, d, e, g, h, bzw. x200 für die Abb. c, f, i.

- (a, b)** Bronchialepithelzellen in den Kontrolllungen exprimierten **IL-15R $\alpha$**  an der apikalen Oberfläche. Während der Pneumokokken-Pneumonie fand sowohl eine deutliche Hochregulation, als auch eine *de novo* Expression an der basolateralen Seite statt. In der glatten Gefäßmuskulatur sowie in Alveolarmakrophagen zeigte sich ebenfalls eine deutliche IL-15R $\alpha$  Expression, jedoch keine Veränderung im Verlauf der Infektion. In den infizierten Lungen fanden sich leukozytäre Infiltrate, an deren Oberfläche sich IL-15R $\alpha$  nachweisen ließ. (c) Durch Vorinkubation des AK mit dem entsprechenden BP wurde die IL-15R $\alpha$ -Immunfärbung unterdrückt.
- (d, e)** IL-2 R $\beta$  / **IL-15R $\beta$**  wurde im Lungengewebe der Kontrollgruppe jeweils an der Oberfläche von Bronchialepithelzellen, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und Alveolarmakrophagen nachgewiesen. Die Expression blieb im Verlauf der Infektion mit *S. pneumoniae* unverändert, jedoch konnte es auf den infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden. (f) Durch die Vorinkubation des AK mit dem entsprechenden BP wurde die IL-15R $\beta$ -Immunfärbung unterdrückt.
- (g, h)**  $\gamma^c$  / IL-15R $\gamma$  war konstitutiv an der Oberfläche von Bronchialepithelzellen und Zellen der glatten Gefäßmuskulatur vorhanden. Durch die Infektion blieb die Expression unbeeinflusst. (i) Durch Vorinkubation des AK mit dem entsprechenden BP wurde die IL-15R $\gamma$ -Immunfärbung unterdrückt.





**Abb. 3.11** – Immunhistologischer Nachweis von IL-15 im Verlauf nach transnasaler Infektion mit *C. pneumoniae*, 9 Tage *p.i.* im Vergleich zur mit HEP-2-Zellen behandelten Kontrollgruppe. Originalvergrößerung x400.

- (a, c) In der mit HEP-2-Zellen behandelten Kontrollgruppe stellte sich die Expression von IL-15 im Vergleich zu unbehandelten Lungengeweben identisch dar. Nachweis von IL-15 auf Bronchialepithelzellen (Stern), Alveolarepithelzellen (Pfeil) und Alveolarmakrophagen (Pfeilspitze).
- (b, d) Nach der Infektion mit *C. pneumoniae* manifestierten sich deutlich peribronchiale Infiltrate, jedoch fand sich anders als bei *S. pneumoniae* keine Änderung der Expression von IL-15. Unveränderte IL-15-Expression auf Bronchialepithelzellen (Stern), Alveolarepithelzellen (Pfeil) und Alveolarmakrophagen (Pfeilspitze).

### 3.6 Ergebnistabellen der semiquantitativen Bildanalyse

**Tab. 3.1-3.5** – Expression von intra- und extrazellulärem IL-15 sowie seines Rezeptorkomplexes mittels semiquantitativer Bildanalyse mit Bewertung auf einer Skala von 0-5 (0 Minimum, 5 Maximum). Normales murines Lungengewebe (NML) entspricht Ergebnissen der Lungen unbehandelter Tiere. Die beiden anderen Kontrollgruppen erhielten sterile PBS, über einen Zeitraum von 6 bzw. 60h.

**SD:** Standardabweichung; **BEZprox:** Bronchialepithelzelle, proximal; **BEZdist:** Bronchialepithelzelle, distal; **BM:** Bronchialmuskulatur; **gA:** grosse Arterien, Gefäßmuskulatur; **BA:** Bronchialarterie, Gefäßmuskulatur; **gV:** grosse Venen, Gefäßmuskulatur; **tmG:** teilmuskularisierte Gefäße, Gefäßmuskulatur; **pvl:** perivaskuläre Infiltrate, Gefäßmuskulatur; **AM:** Alveolarmakrophagen; **AEZ:** Alveolarepithelzelle; **AS:** Alveolarsepten;

**Tab. 3.1** – Expression von intrazellulärem IL-15-Protein

	Kontrolle			Infektion				
	NML	6 h	60 h	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	60 h p.i.
BEZprox	3,2	3,4	2,6	3,2	3,3	3,6	4,1	4,5
SD	± 0,71	± 0,55	± 0,63	± 0,68	± 0,57	± 0,65	± 0,20	± 0,45
BEZdist	3,3	3,8	3,2	3,6	3,6	3,9	4,3	4,0
SD	± 0,44	± 0,45	± 0,45	± 0,38	± 0,49	± 0,38	± 0,42	± 0,32
BM	1,6	2,0	1,3	1,7	1,5	1,7	1,7	1,7
SD	± 0,39	± 0,00	± 0,27	± 0,41	± 0,45	± 0,41	± 0,41	± 0,52
gA	0,8	1,1	1,0	0,7	0,8	0,3	1,0	0,8
SD	± 0,35	± 0,55	± 0,35	± 0,68	± 0,84	± 0,26	± 0,63	± 0,26
bA	1,9	2,0	1,7	1,8	1,7	1,9	2,0	1,8
SD	± 0,42	± 0,00	± 0,45	± 0,26	± 0,41	± 0,20	± 0,00	± 0,41
gV	1,7	1,8	1,5	1,3	1,3	1,8	1,9	1,6
SD	± 0,43	± 0,27	± 0,50	± 0,41	± 0,61	± 0,42	± 0,20	± 0,38
tmG	1,6	1,6	1,2	1,1	1,1	1,5	1,7	1,5
SD	± 0,46	± 0,42	± 0,27	± 0,20	± 0,38	± 0,45	± 0,41	± 0,32
pvl	1,5	1,4	2,0	1,7	1,9	1,9	2,2	2,3
SD	± 0,50	± 0,48	± 0,00	± 0,67	± 0,38	± 0,42	± 0,26	± 0,41
AM	2,9	2,9	2,9	3,1	3,3	3,3	3,2	3,2
SD	± 0,81	± 0,22	± 0,65	± 0,58	± 0,42	± 0,42	± 0,52	± 0,52
AEZ	2,3	2,5	2,3	2,3	2,7	2,9	2,9	2,7
SD	± 0,83	± 0,50	± 0,97	± 0,42	± 0,88	± 0,38	± 0,38	± 0,41
AS	0,9	0,9	0,7	0,8	0,8	0,9	1,1	1,1
SD	± 0,49	± 0,74	± 0,45	± 0,41	± 0,52	± 0,20	± 0,20	± 0,58

Tab. 3.2 – Expression von extrazellulärem IL-15-Protein

	Kontrolle			Infektion				
	NML	6 h	60 h	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	60 h p.i.
BEZprox	2,0	2,5	1,5	2,3	2,3	2,7	3,4	3,3
SD	± 0,80	± 0,71	± 0,58	± 0,67	± 0,97	± 0,57	± 0,38	± 0,42
BEZdist	3,2	3,4	2,4	3,0	2,9	3,2	4,0	4,2
SD	± 0,52	± 0,42	± 0,48	± 0,32	± 0,66	± 0,52	± 0,52	± 0,41
BM	1,9	1,7	1,6	1,6	1,5	1,7	2,2	2,3
SD	± 0,23	± 0,27	± 0,48	± 0,42	± 0,45	± 0,41	± 0,52	± 0,45
gA	0,8	0,7	0,5	0,5	0,7	0,5	1,0	0,5
SD	± 0,37	± 0,45	± 0,41	± 0,55	± 0,67	± 0,35	± 0,63	± 0,45
bA	1,9	2,0	1,8	1,7	1,7	1,8	2,1	2,0
SD	± 0,35	± 0,35	± 0,29	± 0,41	± 0,52	± 0,52	± 0,20	± 0,00
gV	1,5	1,4	1,3	1,1	1,3	1,2	1,6	1,2
SD	± 0,38	± 0,42	± 0,50	± 0,49	± 0,69	± 0,41	± 0,29	± 0,41
tmG	1,1	1,0	0,9	0,7	0,8	0,8	1,3	1,0
SD	± 0,26	± 0,35	± 0,25	± 0,41	± 0,52	± 0,42	± 0,69	± 0,55
pvl	1,5	1,5	1,0	0,8	2,3	1,6	1,8	2,0
SD	± 0,71	± 0,50	± 0,00	± 0,50	± 1,26	± 0,86	± 0,34	± 0,00
AM	3,5	3,1	3,3	3,2	3,5	3,3	3,2	3,3
SD	± 0,46	± 0,55	± 0,50	± 0,52	± 0,45	± 0,41	± 0,40	± 0,52
AEZ	1,3	0,9	0,9	0,7	1,3	0,8	1,3	1,5
SD	± 0,81	± 0,22	± 0,25	± 0,27	± 0,42	± 0,61	± 0,45	± 0,63
AS	0,3	0,4	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9
SD	± 0,53	± 0,42	± 0,00	± 0,42	± 0,42	± 0,27	± 0,29	± 0,38

Tab. 3.3 – Expression von extrazellulärem IL-15R $\alpha$ -Protein

	Kontrolle			Infektion				
	NML	6 h	60 h	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	60 h p.i.
BEZprox	2,7	2,7	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
SD	± 0,82	± 0,58	± 1,15	± 0,00	± 0,82	± 0,71	± 0,00	± 1,00
BEZdist	2,9	3,5	3,0	3,2	3,5	3,2	3,8	3,6
SD	± 0,69	± 0,58	± 0,82	± 0,45	± 1,00	± 0,45	± 0,50	± 0,55
BM	1,7	2,0	1,3	1,6	1,8	1,8	1,8	1,6
SD	± 0,76	± 0,00	± 0,50	± 0,55	± 0,50	± 0,45	± 0,50	± 0,55
gA	0,2	1,0	0,3	0,0	0,3	0,8	0,0	0,0
SD	± 0,41	± 1,73	± 0,50	± 0,00	± 0,58	± 0,84	± 0,00	± 0,00
bA	2,0	2,5	1,8	2,2	2,0	2,4	2,5	1,8
SD	± 0,82	± 0,58	± 0,50	± 0,45	± 0,82	± 0,55	± 0,58	± 0,45
gV	1,6	2,0	1,0	1,6	1,8	2,0	1,8	1,2
SD	± 0,53	± 0,82	± 0,00	± 0,55	± 0,96	± 0,71	± 0,50	± 0,45
tmG	1,3	1,5	1,0	1,4	1,8	2,0	1,5	1,0
SD	± 0,49	± 0,58	± 0,00	± 0,55	± 0,96	± 0,71	± 0,58	± 0,00
pvl	0,0	0,0	1,0	1,0	1,3	1,6	1,5	1,2
SD	± 0,00	± 0,00	± 0,00	± 0,82	± 0,50	± 0,55	± 0,58	± 0,45
AM	2,7	2,8	3,3	3,4	3,5	3,8	3,0	3,0
SD	± 0,95	± 0,50	± 0,50	± 0,55	± 0,58	± 0,45	± 0,00	± 0,00
AEZ	1,6	2,0	1,8	1,6	1,8	2,2	1,8	1,8
SD	± 0,79	± 0,00	± 0,50	± 0,55	± 0,50	± 0,84	± 0,96	± 0,45
AS	0,6	1,3	1,0	0,8	0,8	1,4	1,0	1,0
SD	± 0,79	± 0,50	± 0,00	± 0,45	± 0,50	± 0,55	± 0,82	± 0,00

Tab. 3.4 – Expression von extrazellulärem IL-15R $\beta$ -Protein

	Kontrolle			Infektion				
	NML	6 h	60 h	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	60 h p.i.
BEZprox	1,6	2,5	1,7	1,2	2,0	1,0	2,5	1,6
SD	± 0,53	± 0,71	± 1,15	± 0,84	± 0,82	± 0,00	± 0,58	± 0,55
BEZdist	2,1	2,5	2,7	1,7	2,5	2,3	2,5	2,0
SD	± 0,57	± 0,58	± 0,58	± 0,82	± 0,58	± 0,96	± 0,58	± 0,71
BM	1,7	2,0	2,0	1,5	2,3	1,5	2,3	1,6
SD	± 0,48	± 0,00	± 0,00	± 0,55	± 0,50	± 0,58	± 0,50	± 0,55
gA	0,9	1,5	1,3	1,2	1,3	1,8	2,0	1,6
SD	± 0,78	± 0,71	± 1,15	± 0,84	± 0,96	± 0,96	± 1,15	± 0,55
bA	2,6	2,3	2,7	1,8	2,3	2,5	3,0	2,6
SD	± 0,84	± 0,50	± 0,58	± 0,98	± 0,50	± 0,58	± 0,00	± 0,55
gV	2,6	2,5	2,7	1,8	2,0	2,5	2,8	2,6
SD	± 0,88	± 0,58	± 0,58	± 0,98	± 0,82	± 0,58	± 0,50	± 0,55
tmG	2,4	2,3	2,7	1,5	2,0	2,3	2,8	2,2
SD	± 0,73	± 0,50	± 0,58	± 0,84	± 0,82	± 0,58	± 0,50	± 0,84
pvl	2,3	0,0	4,0	2,3	2,3	2,3	3,0	2,8
SD	± 0,50	± 0,00	± 0,00	± 0,50	± 0,58	± 0,96	± 0,82	± 1,10
AM	3,6	3,8	3,7	3,5	3,8	3,5	4,0	3,6
SD	± 0,52	± 0,50	± 0,58	± 0,55	± 0,50	± 0,58	± 0,00	± 0,55
AEZ	2,4	2,5	2,5	2,0	2,3	2,8	2,8	2,4
SD	± 0,52	± 0,58	± 0,71	± 0,63	± 0,50	± 0,50	± 0,50	± 0,89
AS	1,5	1,8	1,7	1,2	1,3	1,8	2,0	1,8
SD	± 0,71	± 0,96	± 1,15	± 0,41	± 0,50	± 0,50	± 0,82	± 0,84

Tab. 3.5 – Expression von extrazellulärem  $\gamma^c$ -Protein mittels semiquantitativer Bildanalyse

	Kontrolle			Infektion				
	NML	6 h	60 h	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	60 h p.i.
BEZprox	1,1	0,5	1,7	1,7	1,3	1,0	1,5	1,8
SD	± 0,69	± 0,58	± 0,58	± 1,03	± 0,58	± 0,00	± 1,29	± 1,10
BEZdist	1,8	2,0	2,0	1,8	1,8	1,8	1,8	2,2
SD	± 0,71	± 1,00	± 0,00	± 0,75	± 0,45	± 0,84	± 0,75	± 0,84
BM	1,4	1,6	1,8	1,3	1,6	1,2	1,3	1,6
SD	± 0,52	± 0,55	± 0,50	± 0,52	± 0,55	± 0,84	± 0,52	± 0,55
gA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
SD	± 0,00	± 0,00	± 0,00	± 0,00	± 0,55	± 0,00	± 0,00	± 0,00
bA	1,4	1,8	1,5	1,5	1,2	1,2	1,3	1,4
SD	± 0,52	± 0,45	± 0,58	± 0,55	± 0,45	± 0,45	± 0,52	± 0,55
gV	1,1	1,0	1,3	0,8	1,0	1,0	1,2	1,2
SD	± 0,64	± 0,00	± 0,50	± 0,41	± 0,00	± 0,00	± 0,41	± 0,45
tmG	1,3	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	1,0	0,8
SD	± 0,71	± 0,00	± 0,00	± 0,41	± 0,00	± 0,00	± 0,00	± 0,45
pvl	0,5	0,5	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,4
SD	± 0,71	± 0,71	± 0,00	± 0,00	± 0,00	± 1,00	± 0,00	± 0,55
AM	2,3	1,8	1,8	2,0	2,0	2,2	1,8	2,0
SD	± 0,71	± 0,84	± 0,96	± 0,63	± 0,71	± 0,84	± 0,75	± 1,00
AEZ	1,5	1,2	1,0	1,3	1,0	1,4	0,8	1,2
SD	± 0,53	± 0,45	± 0,82	± 0,52	± 0,00	± 1,14	± 0,75	± 0,45
AS	0,1	0,0	0,5	0,0	0,0	0,8	0,2	0,2
SD	± 0,35	± 0,00	± 0,58	± 0,00	± 0,00	± 0,84	± 0,41	± 0,45

## 4 DISKUSSION

Das Zytokin Interleukin-15 (IL-15) spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der angeborenen Immunität, insbesondere auf den Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (73;89;90;92). In der vorliegenden Arbeit konnten weitere wichtige Hinweise für die Rolle von IL-15 und dessen Rezeptorkomplex in der Regulation des pulmonalen Immunsystems aufgezeigt werden. So wurde *in vivo* im murinen Lungengewebe eine konstitutive Expression des Zytokins nachgewiesen. Dieser Nachweis gelang im alveolären und bronchialen Kompartiment: Neben der intrazellulären Expression in Alveolarmakrophagen (AM), Alveolar- (AEZ) und Bronchialepithelzellen (BEZ) konnte das Zytokin auch extrazellulär auf AM und der apikalen Oberfläche von BEZ lokalisiert werden.

Nach Induktion einer Pneumonie durch die transnasale Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) kam es zu einem Anstieg auf der Gesamtproteinebene im pulmonalen Homogenat. In nachfolgenden Experimenten zeigte sich auf zellulärer Ebene eine hochsignifikante Zunahme von IL-15 in AM und bronchialen Epithelzellen. Überraschend war eine *de novo* Expression an der basolateralen Seite von BEZ. Zusätzlich wurde im Verlauf der Pneumonie eine Infiltration von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) beobachtet, die eine dezente Expression von IL-15 aufwiesen. Aktivierte Makrophagen zeigten ebenfalls eine geringe Expression des Proteins.

Vergleichend wurde in dieser Arbeit die Regulation des Zytokins während der pulmonalen Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) betrachtet. Es konnte keine Veränderung der IL-15-Expression während dieser Infektion nachgewiesen werden, so dass eine erregerspezifische Regulation des Zytokins in pulmonalen Zellen angenommen werden muss.

Darüber hinaus gelang der konstitutive Nachweis des heterotrimeren Rezeptorkomplexes IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma^c$  im murinen Lungengewebe *in vivo* auf den BEZ, AM, AEZ und Zellen der Gefäßmuskulatur. Eine Expressionsänderung nach der Infektion mit *S. pneumoniae* konnte nur für IL-15R $\alpha$  auf den BEZ, sowie gering auch den AEZ gezeigt werden. Analog zum Zytokin fand sich bei der hochaffinen Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  ebenfalls eine *de novo* Expression an der basolateralen Seite von BEZ.

Im Gegensatz zum Protein IL-15 wurde die IL-15mRNA, hauptsächlich die sezernierbare „Long Signal Peptide Isoform“ (LSP) bereits in vielen Zelltypen und Geweben, einschließlich Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Skelettmuskulatur, Herz, Niere und der Plazenta nachgewiesen (50;52;80). Diese wurde ebenfalls an pulmonalen Zellen (isolierte humane BEZ) von Ge *et al.* nachgewiesen (91).

In Übereinstimmung mit den bisherigen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit die IL-15mRNA auch im murinen Lungengewebe nachgewiesen werden, wobei durch den verwendeten Primer nicht unterschieden werden konnte, ob es sich um die lange bzw. kurze „Short Signal Peptide Isoform“ (SSP) handelte. Weiterhin gelang hier auch für IL-15mRNA der Nachweis einer gesteigerten pulmonalen Konzentration nach der Infektion mit *S. pneumoniae*.

Im pulmonalen Kompartiment besteht eine kontinuierliche Exposition gegenüber Bakterien und anderen Noxen, die sich auf eine große Oberfläche verteilen. Dies erfordert eine besonders schnelle und effiziente Immunreaktion. Die nachgewiesene konstitutive und induzierte Expression von IL-15 auf BEZ und AEZ weist diese als wichtige Quelle für IL-15 in der Lunge aus.

Die epitheliale Expression von IL-15 ist in mehreren Publikationen beschrieben worden, die vorliegende Arbeit fügt sich hier mit dem intra- und extrazellulärem Nachweis auf BEZ ein. Die Expression von pulmonalem IL-15 wurde von Muro *et al.* an Bronchialbiopsien gesunder Probanden sowie von Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen dargestellt (74). Ge *et al.* zeigten an isolierten BEZ eine Proteinexpression von IL-15, jedoch nicht konstitutiv, sondern erst nach Stimulation der Zellen mit Interferon-gamma (INF $\gamma$ ) (91).

Epithelien anderer Kompartimente exprimieren ebenfalls IL-15, insbesondere im Verlauf von inflammatorischen Prozessen. Dabei wurde für renales Epithel eine protektive Wirkung von IL-15 nachgewiesen (80), für Darmepithelien konnte eine wichtige Funktion des Zytokins bei der Aktivierung von Leukozyten im Rahmen der Infektabwehr nachgewiesen werden (90).

IL-15 nimmt eine wichtige Rolle in der Bildung und Erhaltung von NK-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und T-Zellen mit dem Oberflächenprotein CD8 (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) ein (50;51).

Die beobachtete Zunahme der Expression von IL-15 bzw. der Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  im Verlauf der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* wirkt im Zusammenhang mit den bekannten Regulationsmechanismen auf den Ebenen der Transkription, Translation, intrazellulären Verteilung und Sekretion (44;55-58) die Frage auf, welche Ebenen beeinflusst wurden.

Eine transkriptionale Aktivierung des IL-15-Gens konnte von Washizu *et al.* an Makrophagen nach der Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) (61), sowie von Azimi *et al.* an L929 Zellen nach viraler Infektion nachgewiesen werden (100). In der vorliegenden Studie zeigte sich ebenfalls nach der Infektion mit *S. pneumoniae* eine Steigerung der bereits konstitutiv vorhandenen mRNA im pulmonalen Kompartiment innerhalb von 12 Stunden. Die mRNA-Konzentration blieb im weiteren Verlauf deutlich erhöht. Dies deutet auf eine anhaltende Genaktivierung zur Aufrechterhaltung der IL-15-Proteinsynthese hin.

Die bereits konstitutiv vorhandene Konzentration von IL-15mRNA stützt das von Bamfort *et al.* beschriebene Konzept eines inaktiven mRNA „Pools“ (56). Nach einer Stimulation kann die Translation mit der vorhandenen IL-15mRNA sehr schnell erfolgen, so dass innerhalb kurzer Zeit ausreichend IL-15-Protein zur Verfügung steht. Durch die besonders schnelle Steigerung der Proteinexpression könnte eine entsprechende Aktivierung des Immunsystems ermöglicht werden.

Die in der vorliegenden Studie beobachtete schnelle Zunahme von IL-15-Protein nach der Infektion mit *S. pneumoniae* fügt sich hier ein. Die ebenfalls nachgewiesene Steigerung der mRNA scheint dieser Hypothese jedoch zu widersprechen, da zunächst durch die Transkription von mRNA ein Konzentrationsabfall zu vermuten wäre. Aufgrund der bereits beschriebenen schnellen Genaktivierung mit entsprechender Zunahme der mRNA könnte der mRNA „Pool“ im Sinne eines Nachschubs aufrecht erhalten werden.

Neben der gesteigerten IL-15-Proteinsynthese erfolgte die Zunahme an der Zelloberfläche von IL-15 und der Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  innerhalb von 12h *p.i.* vermutlich durch Transferierung von bereits vorhandenem intrazellulärem Protein nach extrazellulär. Der beobachtete weitere deutliche Anstieg (24 h *p.i.*) sowohl von intrazellulärem als auch von extrazellulärem IL-15 (sowie der hochaffinen

Rezeptoruntereinheit R $\alpha$ ) könnte durch die Genaktivierung und Proteinsynthese von IL-15 im Rahmen der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* begründet sein.

Die Regulation des in dieser Studie dargestellten Anstiegs von extrazellulärem IL-15 erfolgt vermutlich auch über die beiden Isoformen des unreifen Vorläuferproteins (55;57;58). Nishimura postuliert, dass die SSP-Isoform, die nur intrazellulär nachgewiesen werden konnte, durch intrazelluläre Kolokalisation mit IL-15R $\alpha$  eine negative Regulation auf die IL-15-LSP-Form ausübt, die sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen wurde (59).

In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde in der vorliegenden Studie IL-15 sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen mit vor allem gesteigerter intrazellulärer Expression im Verlauf der Pneumonie mit *S. pneumoniae*. Dabei entsprächen das intrazelluläre Zytokin der SSP- und der LSP-Isoform, dagegen das zellmembran-assoziierte der LSP-Isoform. In diesem Modell wäre analog zu Nishimura *et al.* (58) die gesteigerte Konzentration von IL-15 auf der Zelloberfläche (IL-15-LSP-Isoform) funktionell einer Unterstützung der Immunantwort zuzuordnen.

Die zunehmende intrazelluläre Expression könnte die LSP-Isoform darstellen, welche im Verlauf sezerniert wird. Die Beobachtung, dass sich auf der Oberfläche von BEZ in Lungenabschnitten mit peribronchialen Infiltrationen eine kontinuierliche Steigerung von IL-15 fand, während im übrigen Kompartiment diese auf einem niedrigen Niveau verblieb lässt vermuten, dass IL-15 auch pulmonal zur lokalen Aufrechterhaltung der Immunkompetenz beiträgt.

Zum anderen ließe sich das intrazellulär nachgewiesene Protein der SSP-Isoform zuordnen, als Ausdruck der von Nishimura *et al.* und Hiromatsu *et al.* postulierten Schutzmechanismen, um eine für den Organismus schädliche Überexpression zu minimieren (78).

So könnte man vermuten, dass intrazelluläres IL-15-LSP an intrazelluläre IL-15-Rezeptoren gebunden wird. Alternativ könnte die SSP-Isoform zu einer negativen Regulation im Sinne eines Feedbacks beitragen, um die Expression des extrazellulären IL-15 zu begrenzen. Dadurch wird die durch IL-15 induzierte Entzündungsreaktion begrenzt bzw. eine inadäquate starke Immunantwort vermieden. Die Hypothese von Hiromatsu *et al.* wird durch die gesteigerte Expression von IL-15 bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gestützt (50;73;74). Weiterhin konnten Villadsen *et*



*al.* bei der Psoriasis, einer chronischen inflammatorischen Erkrankung der Haut, einen Rückgang der Symptome durch Eliminierung des IL-15-Rezeptors im Maus-Modell herbeiführen (101).

Die hier beobachtete akzentuierte Expression von IL-15 in Regionen mit peribronchialen Infiltraten könnte neben einer gesteigerten Pro-Inflammation auch durch die protektiven Eigenschaften des Zytokins erklärt werden. In diesem Sinne würde IL-15 der durch *S. pneumoniae* induzierten Apoptose entgegenwirken, wie sie von Schmeck *et al.* (68) und Hocke *et al.* (79) *in vitro* an BEZ und AEZ beschrieben wurde. Weiterführende Ergebnisse von Hocke *et al.* zeigten an den alveolären- und tracheo-bronchialen Zelllinien A549 und BEAS-2B eine signifikante Abnahme der durch *S. pneumoniae* induzierten Apoptose nach Transfektion mit sezernierbarem Protein IL-15-LSP (79).

Die in dieser Studie beobachtete epitheliale Hochregulation sowie die basolaterale *de novo* Expression von IL-15 und IL-15R $\alpha$  während der Infektion mit *S. pneumoniae* könnte demzufolge der durch *S. pneumoniae* induzierten Apoptose, mit einer entsprechenden Verlängerung der Überlebensdauer dieser Zellen, entgegenwirken.

An humanen AEZ zeigten Schmeck und Hocke *et al.* *in vitro* eine ausgeprägte Apoptose im Verlauf einer Infektion mit *S. pneumoniae* (68;79). Die Auslösung des programmierten Zelltodes durch die Infektionen mit Pneumokokken ist darüber hinaus auch für pulmonale Endothelzellen (42), Monozyten/Makrophagen (102) und neutrophile Granulozyten (103) beschrieben. Hierdurch freigesetzte Mediatoren lösen über Entzündungsreaktionen, durch die Aktivierung des auf der Oberfläche der Pneumozyten exprimierten Fas-Proteins, ebenfalls Apoptose aus (104).

Im unbehandelten murinen Lungengewebe fand sich in der vorliegenden Studie auf Alveolarepithelzellen lediglich eine schwache Expression von IL-15. Im Verlauf der Infektion mit *S. pneumoniae* konnte 24 h *p.i.* neben einer zunehmenden Destruktion des Parenchyms auch eine gesteigerte Expression von IL-15 nachgewiesen werden, jedoch nur in Regionen mit granulozytären Infiltraten. Die für das Zytokin bekannten Eigenschaften einer Steigerung der epithelialen Zellproliferation (92) bzw. autokrine Hemmung der Apoptose (80) lassen in Zusammenhang mit dieser Beobachtung vermuten, dass die gesteigerte Expression Ausdruck einer protektiven Gegenregulation ist.

IL-15 induziert verschiedene anti-apoptotische Signalwege, unter anderem eine vermehrte Expression des Bcl-2 (75) und hemmt hierdurch den Fas vermittelten Zelltod (77). Schmeck *et al.* wiesen nach, dass über einen Caspasen-abhängigen Signalweg die durch *S. pneumoniae* induzierte Apoptose mit einer Reduktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 einhergeht, und zeigten darüber hinaus *in vitro* an pulmonalen Epithelzellen die lebensverlängernde Wirkung einer Überexpression von Bcl-2 (68). Analog publizierten Bouchard *et al.* eine IL-15-induzierte Steigerung von Bcl-2 sowie eine Abnahme der Apoptose an neutrophilen Granulozyten (105). An renalem Epithel wurde von Shinozaki *et al.* das Zytokin als autokriner Überlebensfaktor beschrieben (80). *In vitro* wies Hocke *et al.* die anti-apoptotische Wirkung einer IL-15 Überexpression nach (79).

Die akzentuierte Zunahme der Proteinexpression von IL-15 auf AEZ im Verlauf der Infektion mit *S. pneumoniae* legt Analogien zu der bereits erwähnten besonders starken Expression auf BEZ in Regionen mit granulozytären Infiltraten nahe. Entsprechend ist eine autokrine Hemmung der Apoptose sowie eine Steigerung der epithelialen Zellproliferation als Ausdruck eines protektiven Mechanismus der Epithelzellen anzunehmen, welche gegen die durch *S. pneumoniae* induzierte Parenchymschädigung gerichtet sein könnte. Jedoch sind erhöhte Konzentrationen des Zytokins auch im Rahmen von pathologischen Prozessen wie rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis beschrieben (50;73;74;101). Es bleibt zu diskutieren, ob die lokale Hochregulation Ausdruck einer gesteigerten protektiven Apoptosehemmung ist, oder sich ihr Korrelat in einer überschießenden Entzündungsreaktion findet. Letztlich kann vermutet werden, dass IL-15 sowohl zur Aufrechterhaltung der Entzündung im Rahmen der Immunabwehr gegen *S. pneumoniae* als auch gegen die durch *S. pneumoniae* induzierte Apoptose zum Erhalt des pulmonalen Gewebes beiträgt.

Die von Hocke *et al.* beschriebene Expression von IL-15 und IL-15R $\alpha$  an der humanen Alveolarepithelzelllinie A549 und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B blieb im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen während der Infektionsversuche mit *S. pneumoniae* unverändert (79). Allerdings konnte eine Steigerung der IL-15mRNA erreicht werden, indem die BEZ- und AEZ-Zelllinien zusätzlich mit INF $\gamma$ , Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ) und IL-1 $\beta$  stimuliert wurden. Nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* an BEZ *in vitro* konnten Schmeck *et al.* zudem andere pro-

inflammatorischer Zytokine wie GM-CSF, INF $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8 und IL-17 induziert bzw. die Expression gesteigert werden (106). Hieraus zeigt sich, dass die Infektion mit *S. pneumoniae* verschiedene pro-inflammatorische Zytokine induziert, wenn auch der Nachweis von IL-15 *in vitro* nicht gelang. Die *in vivo* beobachtete Steigerung von IL-15 bzw. der hochaffinen Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  auf BEZ und AEZ wird somit vermutlich nicht direkt durch die Pneumokokken-Infektion ausgelöst, sondern von den aktivierten Epithelzellen durch zytokinvermittelte Interaktionen mit anderen Zellkompartimenten bewirkt.

Auf humanen AM wurde das Protein von IL-15 in mehreren Veröffentlichungen beschrieben, insbesondere im Verlauf von inflammatorischen Prozessen, z.B. Sarkoidose, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, Tuberkulose und HIV-Infektion (74;93;94). In dieser Arbeit konnte eine deutliche konstitutive Expression von IL-15 und der drei Rezeptoruntereinheiten auf murinen AM *in vivo* gezeigt werden. Weiterhin stellte sich im Verlauf der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* eine gesteigerte Expression von IL-15 und IL-15R $\alpha$  dar. Vermutlich trägt das Zytokin im alveolären Kompartiment zur initialen Immunabwehr, Induktion von Entzündungsreaktionen und Erhaltung der Homöostase von intrapulmonalen Leukozyten bei. Entsprechend dieser Hypothese konnte von Ratthe *et al.* *in vitro* an PMN neben der Expression des Zytokins und der hochaffinen Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  eine Steigerung der Phagozytoseaktivität und Adhärenz durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen gezeigt werden (85).

Für IL-15 und seinen Rezeptorkomplex IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma^c$  werden bidirektionale, autokrine und juxtakrine Signalwege angenommen. Dubois *et al.* wiesen auf Monozyten IL-15 und isoliert die IL-15R $\alpha$ -Untereinheit nach, durch ihre sehr hohe Affinität bildeten das Zytokin und die Rezeptoruntereinheit einen Komplex (64). Durch diese Bindung kann das Zytokin Zellen, die einen IL-15R $\beta$ / $\gamma^c$ -Komplex ausbilden, präsentiert werden (Abb. 1.2) und zu deren Aktivierung beitragen, ohne dass hierfür die Untereinheit IL-15R $\alpha$  notwendig ist (54;64;71;72). Es wird postuliert, dass dieser Komplex sowohl eine autokrine Signalübertragung induziert als auch das Zytokin durch die Bindung an die IL-15R $\alpha$ -Untereinheit benachbarten immunkompetenten Zellen präsentiert wird (64;72). Somit kann das Interleukin effektiv Zellen stimulieren, welche entweder den IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma^c$  oder den IL-15R $\beta$ / $\gamma^c$  ausgebildet haben.

Die unter physiologischen Bedingungen nachgewiesene IL-15-Konzentration auf den Zellen liegt wahrscheinlich in membrangebundener Form vor, worauf der seltene Nachweis des freien Proteins schließen lässt (52). Die in dieser Studie nachgewiesene Expression von IL-15 und seines Rezeptorkomplexes an der Oberfläche von Leukozyten und Epithelzellen, dessen epitheliale Hochregulation sowie die basolaterale *de novo* Expression von IL-15 und IL-15R $\alpha$  während der Infektion mit *S. pneumoniae* fügen sich hier ein und legen die Induktion von bidirektionalen, autokrinen oder juxtakrinen Signalwegen zur Regulation einer schnellen und effektiven Immunantwort nahe. Hierdurch kann das Zytokin via „trans-presenting“ benachbarte Zellen stimulieren und pro-inflammatorische Prozesse vermitteln bzw. aufrecht erhalten (Abb. 1.2). Die nachgewiesene kontinuierliche Steigerung der Zytokinexpression in Regionen mit peribronchialen Infiltraten, während diese in den übrigen Abschnitten auf einem unveränderten Niveau verblieb (60 h *p.i.*), ist wahrscheinlich Ausdruck dieser autokrinen Signalübertragung bzw. der Präsentation von IL-15, gebunden an die IL-15R $\alpha$ -Untereinheit gegenüber benachbarten immunkompetenten Zellen.

Der zunehmende Einstrom von PMNs in das alveoläre Kompartiment 24 h nach pulmonaler Infektion mit *S. pneumoniae* könnte durch einen IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex der Epithelzellen *in vivo* gefördert worden sein. Bouchard *et al.* zeigten an isolierten humanen neutrophilen Granulozyten eine durch IL-15-induzierte verminderte Aktivität von Caspase-3 und Caspase-8, sowie eine Hemmung der Apoptose (105). In Verbindung mit den bekannten anti-apoptischen Eigenschaften von IL-15 an pulmonalen Epithelien (79) deutet dies auf einen protektiven Mechanismus hin. Dieser könnte zum einen der durch *S. pneumoniae* induzierten Apoptose *in vivo* entgegenwirken, als auch zur Homöostase von migrierenden Leukozyten und zur Lebensverlängerung dieser Zellen beitragen.

Weitere wichtige Schritte in der Entzündungsreaktion sind Chemotaxis und Zelladhäsion von Leukozyten. Besonders hohe IL-15-Konzentrationen ließen sich in Regionen mit granulozytären Infiltraten nachweisen. In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IL-15 an der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an pulmonalen Epithelzellen durch Modulation der Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle beteiligt ist (87). Nach der Behandlung von neutrophilen Granulozyten mit IL-15 erhöhte sich die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle CD11b und CD18 (87). Darüber hinaus induzierte es an der

humanen Alveolarepithelzelllinie die Expression des Adhäsionsmoleküls CD54, woraus eine gesteigerte Adhäsion von vorstimulierten neutrophilen Granulozyten an den A549-Zellen resultierte (87). Die ausgeprägte Expressionssteigerung von IL-15 auf den BEZ und AEZ während der Infektion mit *S. pneumoniae* sowie die nachgewiesene Oberflächenexpression von IL-15 und IL-15R $\alpha$  auf den infiltrierenden Leukozyten lässt vermuten, dass dieses Zytokin während der Infektion mit *S. pneumoniae* chemotaktisch auf Leukozyten wirkt und die Leukozytenadhäsion an pulmonalen Epithelzellen steigert. Jedoch zeigten weiterführende Experimente der eigenen Arbeitsgruppe, dass eine Neutralisierung von IL-15 durch sIL-15R $\alpha$  zwar zu einer erhöhten Mortalität der mit *S. pneumoniae* infizierten Tiere führte, allerdings keine reduzierte Leukozytenkonzentration während der Pneumokokken-Pneumonie festzustellen war [unveröffentlichte Daten]. Daraus kann man schließen, dass neben IL-15 weitere Faktoren die Leukozytenmigration während der Infektion mit *S. pneumoniae* fördern. Für die Rekrutierung von PMN in der Lunge während der frühen Phase der bakteriellen Infektion ist die Aktivierung von „Nuclear factor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) durch TNF $\alpha$  und IL-1 notwendig (107). Ferretti *et al.* wiesen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als wichtige Quelle für IL-17 nach, zeigten ein Zunahme des LPS-induzierten Einstroms von PMNs durch IL-17 in das pulmonale Kompartiment und postulieren eine positive Regulation von IL-17 durch IL-15 (108). Dieser Hypothese entsprechend nimmt IL-15 während der bakteriellen Pneumonie indirekt Einfluss auf die späte Phase der PMN-Infiltration im Sinne einer funktionellen Achse von IL-15/IL-17 für die Infiltration von PMN.

Neben der Migration wurden auch andere Funktionen von IL-15 auf die Leukozyten beschrieben. Es wird angenommen, dass auf den PMN eine autokrine Aktivierung zur Hemmung der Apoptose und Steigerung der Abwehrfunktion stattfindet (85;105). Die basale und durch *S. pneumoniae* induzierte Expression von IL-15 trägt zur Aktivierung von pulmonalen Leukozyten, insbesondere der Phagozytose bei (85). An i-IEL konnte nachgewiesen werden, dass IL-15 deren Proliferation erhöht, das potenteste Zytokin für die Aktivitätssteigerung von i-IEL darstellt und zu einer vermehrten INF $\gamma$ -Produktion und Zytotoxizität führt (86;92).

Die Stimulation des IL-15-Rezeptors, vermutlich über einen Syk-abhängigen Mechanismus, induziert eine Steigerung der Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten (85). Eine gehemmte Entwicklung von antigenspezifischen

CD8<sup>+</sup>-T-Gedächtniszellen konnte im Mausmodell nach der Infektion mit *Toxoplasma gondii* gezeigt werden, nachdem IL-15 neutralisiert wurde (109). In Speicheldrüsen ist IL-15 als wichtiger Faktor für die Differenzierung von B1-Zellen in IgA produzierenden Zellen nachgewiesen (82). Polyvalentes IgA ist einer der wichtigsten humoralen Faktoren der angeborenen Immunantwort im unteren Respirationstrakt. Die nachgewiesenen hohen Mengen von IL-15-Protein in BEZ lassen eine Mitwirkung dieser Zellen bei der Synthese von löslichem IgA vermuten, weitere Studien liegen hierzu noch nicht vor.

In der gastrointestinalen Mukosa aktiviert IL-15 die Proliferation der Lymphozyten. Untersuchungen an Mäusen mit IL-15- und IL-15R $\alpha$ -Mangel zeigten eine stark verminderte Konzentration von i-IEL gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe, sowie ein ausgeprägtes Defizit an NK-, NK-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Gedächtniszellen (110;111). Für die Bedeutung von IL-15 in der antimikrobiellen Abwehr der Schleimhäute spricht auch die Hochregulation und Stimulation von i-IELs durch IL-15 während einer akuten Entzündung mit *Listeria monocytogenes* (89). In diesem Sinne beeinflusst IL-15 wahrscheinlich nicht vorrangig die Migration und Proliferation von Leukozyten, sondern verstärkt vielmehr die Phagozytosekapazität und Zytotoxizität der Leukozyten sowie die Aktivierung antigenspezifischer Lymphozyten während der Infektion mit *S. pneumoniae*.

Die Expression des heterotrimeren Rezeptorkomplexes IL-15R $\alpha/\beta/\gamma^c$  auf der Zelloberfläche sowohl von AM als auch von BEZ und AEZ [analog zu Epithelzellen anderer Kompartimente] (80) wurde in dieser Arbeit in unbehandeltem murinen Lungengewebe nachgewiesen. Das Vorhandensein dieser für die Signaltransduktion notwendigen Rezeptoruntereinheiten impliziert einen Einfluss von extrinsischem IL-15 auf die Zellen selbst. Es ließen sich jedoch bisher kaum relevante Mengen von sezerniertem IL-15 im Alveolarsekret nachweisen (94). Daher ist davon auszugehen, dass membrangebundenes IL-15 anderer Zellen zur Stimulierung der AM sowie der Epithelzellen beiträgt. Entsprechend dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Studie an der Zelloberfläche von AM sowohl das Zytokin als auch die Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  nachgewiesen, beide sind obligat für das „trans-presenting“ (Abb. 1.2).

Weiterhin steht der Nachweis von IL-15 und IL-15R $\alpha$  an der Zelloberfläche in Einklang mit der Hypothese des „molecular sink“: Die Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  bewirkt ein Abfangen des sezernierten IL-15-Proteins, bedingt durch die sehr hohe Affinität (112),

um dessen Wirkung lokal zu begrenzen und ein Überschießen der durch das Zytokin induzierten Regulation zu verhindern (113). Im Zusammenhang mit dieser Hypothese der rezeptorvermittelten Endozytose sowie des „trans-endosomalen Recyclings“ von Dubois *et al.* kann darüber hinaus angenommen werden, dass nach der Sekretion ein Teil des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplexes von der Zelloberfläche wieder aufgenommen wird (64;71;72). Nach der Endozytose persistiert der Komplex im Zytoplasma und wird nach einem externen Stimulus an die Zelloberfläche transferiert (64), hierdurch kann das Zytokin schnell erneut benachbarten Zellen präsentiert werden (72). Der immunhistologische Nachweis einer Zunahme von membranständigen bzw. extrazellulärem IL-15 und IL-15R $\alpha$  an BEZ in der vorliegenden Studie bei unveränderter Expression der weiteren Rezeptoruntereinheiten IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  fügt sich in dieses Modell ein. Auch könnte epitheliales IL-15 durch eine bidirektionale Signalübertragung in Kolokalisation mit IL-15R $\alpha$  auf benachbarte Immunzellen wirken (Abb. 1.2). Sowohl die Hypothese der Endozytose, als auch des „trans-endosomalen Recyclings“ lassen sich im Sinne einer schnellen und ausreichenden Darstellung des Zytokins zur Initiierung der Immunantwort interpretieren, könnten aber auch zur Begrenzung von möglichen schädlichen Eigenschaften dienen.

Auf den Zellen der glatten Muskulatur der Bronchialgefäße konnten in dieser Studie IL-15 und IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  konstitutiv lokalisiert werden. Für die Skelettmuskulatur sind die Expression von IL-15 neben anderen Zytokinen, sowie anabole Effekte des Zytokins beschrieben. Weiterhin wird eine wichtige Rolle in der Regulierung des Stoffwechsels vermutet (114). IL-15 wurde auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta von Mäusen dargestellt (115). Zur Funktion des Zytokins in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur ist bisher nur wenig bekannt. Aufgrund der erhöhten Expression von IL-15 in arteriosklerotisch veränderten Läsionen wird vermutet, dass IL-15 dort zur Rekrutierung von T-Zellen und deren Aktivierung beiträgt (115). Kramer *et al.* wiesen in Prostata-Präparaten mit benigner Hypertrophie Infiltrate vorwiegend von CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten nach und spekulierten, dass die benigne Hypertrophie durch eine chronische Entzündung bedingt ist, unterhalten durch IL-15 und INF $\gamma$  aus der glatten Muskulatur (116). Aufgrund der nur geringen Expression und der fehlenden Expressionsänderung von IL-15 und seines Rezeptors scheint eine aktivierende und chemotaktische Funktion die für das Zytokin während der

Pneumokokken-Pneumonie vermutet wird, an der glatten Muskulatur keine wesentliche Bedeutung zu haben.

Durch die pulmonale Infektion mit *C. pneumoniae* ließ sich im Gegensatz zur Infektion mit *S. pneumoniae* keine Hochregulation von IL-15-Protein und IL-15R $\alpha$  induzieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Hochregulation von IL-15 und seines Rezeptor kein generelles Merkmal von bakteriellen Pneumonien ist. Wahrscheinlich sind der unterschiedliche Aufbau der beiden Bakterien sowie deren Entwicklung (insbesondere der biphasische, obligat intrazelluläre Vermehrungszyklus von *C. pneumoniae* und der damit verbundenen Abwehrmechanismen) für die hier festgestellte unterschiedliche Induktion von IL-15 nach der pulmonalen Infektion verantwortlich. *C. pneumoniae* ist ein obligat intrazelluläres Bakterium und damit besonders stark von den Umgebungsbedingungen des Wirtsorganismus abhängig. Es beeinflusst aktiv die Wirtszellen, nimmt Einfluss auf deren Apoptose und führt unter anderem zur Bildung von spezifischen Vakuolen, die zur Replikation notwendig sind (10;96). Es ließe sich spekulieren, dass die Kontrolle der Wirtszelle für *C. pneumoniae* bei einer hohen intrazellulären Konzentration von IL-15 nicht möglich ist und daher das Zytokin supprimiert wird. Gerard *et al.* wiesen nach, dass die IL-15-mRNA durch *C. trachomatis*, jedoch nicht durch *C. pneumoniae* im Infektionsmodell mit Synovialgewebe *in vitro* hochreguliert wurde (95). Eine Interaktion des Mikroorganismus mit pathogen-spezifischen Rezeptoren wurde für *Mycobacterium leprae* beschrieben (117).

Beide hier untersuchten Pathogene, *C. pneumoniae* und *S. pneumoniae* werden durch teilweise übereinstimmende Rezeptoren (z.B. TLRs, NODs) erkannt (11;32). Dagegen wurde eine pro-inflammatorische Wirkung für Zellwandbestandteile von *S. pneumoniae*, z.B. CD14 und Peptidoglykane, nachgewiesen (35;43). Daher ist zu vermuten, dass die gemeinsamen Rezeptoren nicht die Ursache für die Induktion einer IL-15-Expression nach der Infektion mit *S. pneumoniae* darstellen.

Des Weiteren unterscheidet sich der Infektionsverlauf der beiden Keime. Die pulmonale Infektion mit *C. pneumoniae* in dieser Studie führte zu einer pulmonalen Entzündung, die sich erst nach mehreren Tagen manifestierte, während die Infektion mit *S. pneumoniae* zu akuten, schweren Krankheitszeichen führte. Eine optimale Induktion von IL-15 erfordert vermutlich einen ausreichend effektiven Stimulus (51). Es lässt sich vermuten, dass dieser beim prolongierten Infektionsverlauf durch *C. pneumoniae* nicht gegeben ist.



Ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren beeinflusst die Abläufe der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae*. In diesem Sinne ist auch die Beobachtung zu werten, dass IL-15 und die hochaffine Rezeptoruntereinheit IL-15R $\alpha$  zwar *in vivo* nach der Infektion mit *S. pneumoniae* hochreguliert werden, *in vitro* sich hingegen keine wesentliche Expressionsänderung zeigte (79). Vermutlich führt erst eine durch den Erreger induzierte Immunantwort zu einer erhöhten Expression von IL-15 und seines Rezeptors. Es ist publiziert, dass die Vorstimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  zu einer Hochregulation von IL-15 in BEZ führt (79;91). In diesem Sinne erfolgt erst nach einer Aktivierung von Makrophagen *in vivo* eine Steigerung von IL-15-mRNA und IL-15-Protein (91).

*In vivo* lösen Bestandteile von *S. pneumoniae* wie z.B. Zellwandfragmente und Pneumolysin (PLY) eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit Aktivierung der Komplementkaskade sowie der Phagozytose durch Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten aus (35;43). Im Mausmodell konnten bereits in der Anfangsphase der Infektion die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 nachgewiesen werden, innerhalb von 12 h *p.i.* erreichten TNF $\alpha$  und IL-1 ein Maximum und fielen dann wieder ab. IL-6 dagegen bildete nach 12 h ein Plateau, welches über längere Zeit anhielt (43). Während der Infektion mit *S. pneumoniae* wurde auch ein Anstieg von IL-8 und INF $\gamma$  beschrieben (35). Der frühe Nachweis der pro-inflammatorischen Zytokine sowie die fehlende Expressionsänderung von IL-15 nach der Infektion mit *S. pneumoniae in vitro* lassen auch hier vermuten, dass die vermehrte IL-15-Expression nicht direkt durch *S. pneumoniae* induziert wird. Entsprechend wird eine adäquate Expressionsänderung von IL-15 und IL-15R $\alpha$  erst durch die Vorstimulation der Immunzellen erreicht. Offenbar reicht die Vorstimulation durch eine Infektion mit einem meist klinisch subaktuem Krankheitsverlauf mit *C. pneumoniae* nicht aus, um eine Expressionssteigerung von IL-15 zu erreichen.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Studie eine zellspezifische Expression und Regulation von IL-15 und IL-15R $\alpha$  im Verlauf einer durch *S. pneumoniae* induzierten Pneumonie. Dies legt eine wichtige Rolle des Zytokins für die homöostatische Regulation in der Lunge sowohl für die Immunzellen als auch für das Parenchym selbst nahe. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Annahme der funktionellen Relevanz des Zytokins IL-15 im Rahmen der Infektion mit *S. pneumoniae*. Die vielfach beschriebenen Wirkungen von IL-15 von lokalen bis hin zu systemischen Reaktionen

zeigen ein überaus komplexes Zusammenspiel von Zellen und Mediatoren im Rahmen von entzündlichen Veränderungen.

Die Synthese von IL-15 und IL-15R $\alpha$  im Respirationstrakt wird vermutlich nicht direkt durch *S. pneumoniae* induziert, sondern hängt von zusätzlichen Faktoren der bronchialen und alveolären Umgebung ab. IL-15 löst sowohl eine ausgeprägte proinflammatorische Reaktion als auch anti-apoptotische Mechanismen aus. Es wirkt nicht nur auf Zellen lymphatischen Ursprungs, sondern auch auf Zellen nicht lymphatischen Ursprungs und integriert diese in die Immunantwort (92).

## Zukunftsausblick

Es liegt nahe, die Ergebnisse dieser Studie auf humanes Lungengewebe zu übertragen - dies ist bereits Gegenstand aktueller Untersuchungen. Hocke *et al.* führten inzwischen an humanen Lungenepithelzelllinien Infektionen mit *S. pneumoniae* durch (79). Weiterführend werden entsprechende Untersuchungen an *ex vivo* Präparaten vorgenommen, um auch die Interaktionen verschiedener Zellpopulationen zu berücksichtigen. Hier sind insbesondere „Bioplex-Arrays“ zu erwähnen, die eine schnelle und sichere Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen ermöglichen und seit kurzem auch für IL-15 zur Verfügung stehen.

Regulation und Funktion des Zytokins IL-15 finden vermutlich ihren Platz in einem komplexen Zusammenspiel mit weiteren Zytokinen. Hocke *et al.* beobachteten im Gegensatz zu den *in vivo* Ergebnissen dieser Studie *in vitro* keine Hochregulation von IL-15 durch die Infektion mit *S. pneumoniae*, aber durch die Stimulation mit INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .

Die vorliegende Studie zeigte im pulmonalen Parenchym eine positive Regulation nach der Infektion mit den gram-positiven Streptokokken, jedoch nicht durch die gram-negativen Chlamydien. Hier wären ergänzende Untersuchungen mit weiteren Noxen zu erwägen, um Einflussgrößen auf die Regulation und Interaktion von IL-15 zu erforschen. Durch weitere Einblicke in das Zusammenspiel von IL-15 mit anderen Zytokinen ließen sich möglicherweise Einflussgrößen auf die durch *S. pneumoniae* induzierte Sepsis identifizieren und möglicherweise therapeutische Optionen durch deren Modulation ableiten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Interleukin-15 (IL-15) hat besonders im Bereich der Mukosa durch Aufrechterhaltung der Homöostase und Aktivierung von NK, NKT,  $\gamma\delta$ -T und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen entscheidenden Anteil an der antimikrobiellen Abwehr. Der Respirationstrakt besitzt eine große Schleimhautoberfläche und verfügt über große Reservoirs an Lymphozyten. Über das Muster der Expression von IL-15 in der Lunge und seine Rolle in der lokalen Immunabwehr ist jedoch wenig bekannt. In dieser Studie wurden die Expression von IL-15 und des IL-15-Rezeptorkomplexes in der Lunge der Maus untersucht und eine deutliche konstitutive Expression in Bronchial- und Alveolarepithelzellen, in Alveolarmakrophagen und der glatten Muskulatur der großen Gefäße der Lunge nachgewiesen. Dies impliziert bereits unter physiologischen Bedingungen die Beteiligung von IL-15 an der Homöostase der pulmonalen Immunzellen. Bei der Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* kam es anders als bei der Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* zu einem signifikanten Anstieg von IL-15 in Alveolarmakrophagen und Bronchialepithelzellen. Die Bronchialepithelzellen zeigten darüber hinaus eine *de novo* IL-15-Synthese an ihrer basolateralen Oberfläche.

Parallel hierzu zeigte sich für IL-15R $\alpha$  ebenfalls eine Zunahme der Expression, sowie eine *de novo* Synthese an der basolateralen Oberfläche der Bronchialepithelzellen.

Weiterhin konnte eine positive Regulation des Zytokins auf der Ebene der mRNA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf die funktionelle Bedeutung von IL-15 und seines Rezeptorkomplexes für die pulmonale Immunantwort auf die durch *Streptococcus pneumoniae* induzierte Pneumonie hin.

## 5. 1 Abstract

Interleukin-15 (IL-15) has a critical impact on the antimicrobial defences particularly at mucosal sites due homeostasis and activation of NK, NKT,  $\gamma\delta$ -T and CD8<sup>+</sup>-T-cells. The respiratory tract also comprises a large mucosal surface and harbors significant amounts of lymphocytes, but the expression pattern of IL-15 in the lung and its role in local immune responses are largely unknown. This study analyzed the differential expression of IL-15 and the IL-15 receptor (IL-15R) complex in the lungs of mice, and demonstrated substantial constitutive expression in bronchial and alveolar epithelial cells, alveolar macrophages, and vascular smooth muscle cells, implicating contribution to pulmonary immune cell homeostasis already under normal conditions. The induction of pneumonia due transnasal infection with *Streptococcus pneumoniae* contrast to *Chlamydophila pneumoniae* evoked a significant up-regulation of IL-15 on alveolar macrophages and bronchial epithelial cells, with the latter presenting *de novo* expression of IL-15 on their basolateral surface. IL-15R $\alpha$  showed a similar up-regulation including a *de novo* expression on the basolateral surface bronchial epithelial cells. Furthermore a positive regulation of IL-15mRNA indicated at least partial transcriptional regulation. Finally the results are suggesting a functional impact of IL-15 and the IL-15 receptor the on the pulmonary immune response in pneumococcal pneumonia.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Austrian R. Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev.Infect.Dis.* 1981 Mar;3(2):183-9.
2. Huntemann I, Lorenz J. Ambulant Erworbene Pneumonie (AEP). CAPNETZ Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie 2004.
3. Schnoor M, Klante T, Beckmann M, Robra BP, Welte T, Raspe H, Schafer T. Risk factors for community-acquired pneumonia in German adults: the impact of children in the household. *Epidemiol.Infect.* 2007 Nov;135(8):1389-97.
4. Scott JA, Brooks WA, Peiris JS, Holtzman D, Mulhollan EK. Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *J.Clin.Invest.* 2008 Apr;118(4):1291-300.
5. Catterall JR. Streptococcus pneumoniae. *Thorax.* 1999 Oct;54(10):929-37.
6. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T. CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia. *J.Intern.Med.* 2006 Jul;260(1):93-101.
7. Capelastegui A, Espana PP, Quintana JM, Areitio I, Gorordo I, Egurrola M, Bilbao A. Validation of a predictive rule for the management of community-acquired pneumonia. *Eur.Respir.J.* 2006 Jan;27(1):151-7.
8. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, Lewis SA, Macfarlane JT. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax.* 2003 May;58(5):377-82.
9. Influenza activity-United States and worldwide, 2007-08 season. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* 2008 Jun 27;57(25):692-7.
10. Hammerschlag MR. Chlamydia pneumoniae and the lung. *Eur.Respir.J.* 2000 Nov;16(5):1001-7.
11. Krull M, Maass M, Suttorp N, Rupp J. Chlamydomphila pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation. *Thromb.Haemost.* 2005 Aug;94(2):319-26.
12. Marre R, Baum Hv. Which pathogens occur in community acquired pneumonia? First results of CAPNETZ. *Die Medizinische Welt* 2004 Oct;2004 55 10: 319-321.
13. Krull M, Bockstaller P, Wuppermann FN, Klucken AC, Muhling J, Schmeck B, Seybold J, Walter C, Maass M, Rosseau S, et al. Mechanisms of Chlamydomphila pneumoniae-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2006 Mar;34(3):375-82.

14. Watson C, Alp NJ. Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Clin.Sci.(Lond)*. 2008 Apr;114(8):509-31.
15. Obaro SK, Monteil MA, Henderson DC. The pneumococcal problem. *BMJ*. 1996 Jun 15;312(7045):1521-5.
16. Kadioglu A, Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol*. 2004 Mar;25(3):143-9.
17. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect.Dis*. 2002 Jan;2(1):25-32.
18. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN, the Alexander Project Group. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J.Antimicrob.Chemother*. 2003 Aug 1;52(2):229-46.
19. Reinert RR, Al Lahham A, Lemperle M, Tenholte C, Briefs C, Haupts S, Gerards HH, Luttkick R. Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. *J.Antimicrob.Chemother*. 2002 Jan;49(1):61-8.
20. Jacobs MR, Good CE, Beall B, Bajaksouzian S, Windau AR, Whitney CG. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. *J.Clin.Microbiol*. 2008 Mar;46(3):982-90.
21. Cazzola M, Matera MG, Page CP. Novel approaches to the treatment of pneumonia. *Trends Pharmacol.Sci*. 2003 Jun;24(6):306-14.
22. Cazzola M, Page CP, Matera MG. Alternative and/or integrative therapies for pneumonia under development. *Curr.Opin.Pulm.Med*. 2004 May;10(3):204-10.
23. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol*. 2001 Jul;13(7):933-40.
24. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J.Infect.Dis*. 2002 Sep 15;186(6):798-806.
25. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):736-9.
26. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer AJ. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J.Biol.Chem*. 2006 Apr 7;281(14):9049-57.

27. Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahringer U, Hartung T, Gobel UB, Schumann RR. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J.Biol.Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22041-7.
28. Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect.Immun.* 2005 Oct;73(10):6479-87.
29. Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005 Mar 29;102(13):4848-53.
30. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 1995 Oct 5;377(6548):435-8.
31. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, Schumann RR, Suttorp N, Hippenstiel S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J.Biol.Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36426-32.
32. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir.Res.* 2006 Jul 8;7:97.:97.
33. Spellerberg B, Rosenow C, Sha W, Tuomanen EI. Pneumococcal cell wall activates NF-kappa B in human monocytes: aspects distinct from endotoxin. *Microb.Pathog.* 1996 May;20(5):309-17.
34. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1813-9.
35. McCullers JA, Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci.* 2001 Aug 1;6:D877-89.:D877-D889.
36. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, Kerr A, Mitchell TJ, Andrew PW. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect.Immun.* 2000 Feb;68(2):492-501.
37. Bruyn GA, Zegers BJ, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin.Infect.Dis.* 1992 Jan;14(1):251-62.
38. Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, Smith AN, Boulnois GJ. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol.Microbiol.* 1991 Aug;5(8):1883-8.
39. Mitchell TJ. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res.Microbiol.* 2000 Jul;151(6):413-9.

40. Wani JH, Gilbert JV, Plaut AG, Weiser JN. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 1996 Oct;64(10):3967-74.
41. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* 2000 Aug;29(3-4):323-33.
42. N'Guessan PD, Schmeck B, Ayim A, Hocke AC, Brell B, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thromb.Haemost.* 2005 Aug;94(2):295-303.
43. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect.Immun.* 1998 Mar;66(3):912-22.
44. Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, Hanover JA, Waldmann TA. The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *J.Biol.Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30653-9.
45. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 1999;17:189-220.:189-220.
46. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 1994;12:635-73.:635-73.
47. Tomasz A, Saukkonen K. The nature of cell wall-derived inflammatory components of pneumococci. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 1989 Dec;8(12):902-3.
48. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J.Infect.Dis.* 1985 May;151(5):859-68.
49. Lodolce J, Burkett P, Koka R, Boone D, Chien M, Chan F, Madonia M, Chai S, Ma A. Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol.Immunol.* 2002 Dec;39(9):537-44.
50. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu.Rev.Immunol.* 1999;17:19-49.
51. Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J.Immunol.* 1996 Jan 15;156(2):735-41.
52. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994 May 13;264(5161):965-8.
53. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared



- by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994 May 24;91(11):4940-4.
54. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):14-32.
  55. Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, Bamford RN, Waldmann TA. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997 Dec 23;94(26):14444-9.
  56. Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, Kurys G, Waldmann TA. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J.Immunol*. 1998 May 1;160(9):4418-26.
  57. Onu A, Pohl T, Krause H, Bulfone-Paus S. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J.Immunol*. 1997 Jan 1;158(1):255-62.
  58. Nishimura H, Fujimoto A, Tamura N, Yajima T, Wajjwalku W, Yoshikai Y. A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB J*. 2005 Jan;19(1):19-28.
  59. Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, Matsuguchi T, Suzuki M, Ohashi PS, Yoshikai Y. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J Exp.Med*. 2000 Jan 3;191(1):157-70.
  60. Yoshikai Y. The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol.Res*. 1999;20(3):219-35.
  61. Washizu J, Nishimura H, Nakamura N, Nimura Y, Yoshikai Y. The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene. *Immunogenetics*. 1998 Jun;48(1):1-7.
  62. Bamford RN, Battiata AP, Burton JD, Sharma H, Waldmann TA. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1996 Apr 2;93(7):2897-902.
  63. Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J.Exp.Med*. 2000 Mar 6;191(5):753-6.
  64. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*. 2002 Nov;17(5):537-47.
  65. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of

- the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 1994 Jun 15;13(12):2822-30.
66. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science.* 1994 Nov 11;266(5187):1045-7.
67. Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995 Sep 12;92(19):8705-9.
68. Schmeck B, Gross R, N'Guessan PD, Hocke AC, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infect.Immun.* 2004 Sep;72(9):4940-7.
69. Rosseau S, Schmeck B, Suttorp N. Pathogenese der Pneumonie. *Die Medizinische Welt* 2004;S. Rosseau, B. Schmeck, N. Suttorp(55 10):337-41.
70. Tagaya Y, Burton JD, Miyamoto Y, Waldmann TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J.* 1996 Sep 16;15(18):4928-39.
71. Schluns KS, Stoklasek T, Lefrancois L. The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2005 Aug;37(8):1567-71.
72. Rückert R, Brandt K, Bulanova E, Mirghomizadeh F, Paus R, Bulfone-Paus S. Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *Eur.J.Immunol.* 2003 Dec;33(12):3493-503.
73. Inagaki-Ohara K, Chinen T, Matsuzaki G, Sasaki A, Sakamoto Y, Hiromatsu K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Yoshimura A. Mucosal T cells bearing TCRgammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J.Immunol.* 2004 Jul 15;173(2):1390-8.
74. Muro S, Taha R, Tsicopoulos A, Olivenstein R, Tonnel AB, Christodoulopoulos P, Wallaert B, Hamid Q. Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2001 Dec;108(6):970-5.
75. Ranson T, Vosshenrich CA, Corcuff E, Richard O, Muller W, Di Santo JP. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 2003 Jun 15;101(12):4887-93.
76. Masuda A, Matsuguchi T, Yamaki K, Hayakawa T, Yoshikai Y. Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J.Biol.Chem.* 2001 Jul 13;276(28):26107-13.

77. Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Ruckert R, Krause H, Kundendorf U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat.Med.* 1997 Oct;3(10):1124-8.
78. Hiromatsu T, Yajima T, Matsuguchi T, Nishimura H, Wajjwalku W, Arai T, Nimura Y, Yoshikai Y. Overexpression of interleukin-15 protects against Escherichia coli-induced shock accompanied by inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *J.Infect.Dis.* 2003 May 1;187(9):1442-51.
79. Hocke AC, Hartmann IK, Eitel J, Optiz B, Scharf S, Suttorp N, Hippenstiel S. Subcellular expression pattern and role of IL-15 in pneumococci induced lung epithelial apoptosis. *Histochem.Cell Biol.* 2008 Jul;130(1):165-76.
80. Shinozaki M, Hirahashi J, Lebedeva T, Liew FY, Salant DJ, Maron R, Kelley VR. IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J.Clin.Invest* 2002 Apr;109(7):951-60.
81. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J.Immunol.* 1995 Jan 15;154(2):483-90.
82. Hiroi T, Yanagita M, Ohta N, Sakaue G, Kiyono H. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. *J.Immunol.* 2000 Oct 15;165(8):4329-37.
83. Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J.Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):2606-12.
84. Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ, Beller DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J.Immunol.* 1997 Sep 15;159(6):2941-51.
85. Ratthe C, Girard D. Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain. *J.Leukoc.Biol.* 2004 Jul;76(1):162-8.
86. Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology.* 1998 Dec;115(6):1439-45.
87. Pelletier M, Girard D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin.Exp.Immunol.* 2005 Aug;141(2):315-25.
88. Takano M, Nishimura H, Kimura Y, Mokuno Y, Washizu J, Itohara S, Nimura Y, Yoshikai Y. Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in Escherichia coli infection in mice. *Infect.Immun.* 1998 Jul;66(7):3270-8.
89. Hirose K, Suzuki H, Nishimura H, Mitani A, Washizu J, Matsuguchi T, Yoshikai Y. Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial

- lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Infect.Immun.* 1998 Dec;66(12):5677-83.
90. Nishimura H, Hiromatsu K, Kobayashi N, Grabstein KH, Paxton R, Sugamura K, Bluestone JA, Yoshikai Y. IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by *Salmonella* infection. *J.Immunol.* 1996 Jan 15;156(2):663-9.
  91. Ge N, Nishioka Y, Nakamura Y, Okano Y, Yoneda K, Ogawa H, Sugita A, Yanagawa H, Sone S. Synthesis and secretion of interleukin-15 by freshly isolated human bronchial epithelial cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 2004 Nov;135(3):235-42.
  92. Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology.* 1996 Dec;111(6):1706-13.
  93. Agostini C, Trentin L, Sancetta R, Facco M, Tassinari C, Cerutti A, Bortolin M, Milani A, Siviero M, Zambello R, et al. Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1997 Aug 1;90(3):1115-23.
  94. Zissel G, Baumer I, Schlaak M, Muller-Quernheim J. In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases. *Eur.Cytokine Netw.* 2000 Mar;11(1):105-12.
  95. Gerard HC, Wang Z, Whittum-Hudson JA, El Gabalawy H, Goldbach-Mansky R, Bardin T, Schumacher HR, Hudson AP. Cytokine and chemokine mRNA produced in synovial tissue chronically infected with *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae*. *J Rheumatol.* 2002 Sep;29(9):1827-35.
  96. Byrne GI, Ojcius DM. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat.Rev.Microbiol.* 2004 Oct;2(10):802-8.
  97. Romeis B. *Mikroskopische Technik.* 17 ed. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1989.
  98. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
  99. Ermert L, Hocke AC, Duncker HR, Seeger W, Ermert M. Comparison of different detection methods in quantitative microdensitometry. *Am.J.Pathol.* 2001 Feb;158(2):407-17.
  100. Azimi N, Shiramizu KM, Tagaya Y, Mariner J, Waldmann TA. Viral activation of interleukin-15 (IL-15): characterization of a virus-inducible element in the IL-15 promoter region. *J.Virol.* 2000 Aug;74(16):7338-48.
  101. Villadsen LS, Schuurman J, Beurskens F, Dam TN, Dagnaes-Hansen F, Skov L, Rygaard J, Voorhorst-Ogink MM, Gerritsen AF, van Dijk MA, et al. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J.Clin.Invest.* 2003 Nov;112(10):1571-80.

102. Ali F, Lee ME, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Read RC, Dockrell DH. Streptococcus pneumoniae-associated human macrophage apoptosis after bacterial internalization via complement and Fc $\gamma$  receptors correlates with intracellular bacterial load. *J.Infect.Dis.* 2003 Oct 15;188(8):1119-31.
103. Zysk G, Bejo L, Schneider-Wald BK, Nau R, Heinz H. Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by Streptococcus pneumoniae. *Clin.Exp.Immunol.* 2000 Oct;122(1):61-6.
104. Matute-Bello G, Frevert CW, Liles WC, Nakamura M, Ruzinski JT, Ballman K, Wong VA, Vathanaprida C, Martin TR. Fas/Fas ligand system mediates epithelial injury, but not pulmonary host defenses, in response to inhaled bacteria. *Infect.Immun.* 2001 Sep;69(9):5768-76.
105. Bouchard A, Ratthe C, Girard D. Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J.Leukoc.Biol.* 2004 May;75(5):893-900.
106. Schmeck B, Moog K, Zahlten J, van L, V, N'Guessan PD, Opitz B, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir.Res.* 2006 Jul 12;7:98.:98.
107. Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2005 Dec 1;175(11):7530-5.
108. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J.Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):2106-12.
109. Khan IA, Moretto M, Wei XQ, Williams M, Schwartzman JD, Liew FY. Treatment with soluble interleukin-15 exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8<sup>+</sup> T cell response. *J.Exp.Med.* 2002 Jun 3;195(11):1463-70.
110. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J.Exp.Med.* 2000 Mar 6;191(5):771-80.
111. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 1998 Nov;9(5):669-76.
112. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J.Biol.Chem.* 1995 Dec 15;270(50):29862-9.

113. Gaggero A, Azzarone B, Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, Rubartelli A, Ferrini S. Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur.J.Immunol.* 1999 Apr;29(4):1265-74.
114. Nielsen AR, Pedersen BK. The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15. *Appl.Physiol Nutr.Metab.* 2007 Oct;32(5):833-9.
115. Wuttge DM, Eriksson P, Sirsjo A, Hansson GK, Stemme S. Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions. *Am.J.Pathol.* 2001 Aug;159(2):417-23.
116. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur.Urol.* 2007 May;51(5):1202-16.
117. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat.Med.* 2005 Jun;11(6):653-60.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	i-IEL	intraepitheliale intestinale Lymphozyten
AEZ	Alveolarepithelzellen	ifu	inclusion forming untis
AK	Antikörper	Ig	Immunglobulin
AM	Alveolarmakrophagen	IL	Interleukin
AP	Alkalische Phosphatase	INF $\gamma$	Interferon gamma
APS	Ammoniumpersulfat	IRF	Interferon regulatory factor
AS	Alveolarsepten		
BA	Bronchialarterie	JAK	Janus Kinasen
Bcl-2	B-cell-leukemia (protein) 2	KBE	Kolonie-Bildende Einheiten (Colony Forming Untis)
BEZdist	Bronchialepithel, distal		
BEZprox	Bronchialepithel, proximal	LD	letale Dosis
BM	Bronchialmuskulatur	LPS	Lipopolysaccharid
BP	Blocking Peptide	LSP	Long Signal Peptide (IL-15)
BSA	Bovines Serum Albumin	m	Milli
CAP	community acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)	M	Mol
CD	Cluster of Differentiation	MCP-1	Monocyte-Chemotactic-Protein-1
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	CD4-positive T-Lymphozyten	min	Minute
CD8 <sup>+</sup> -CTL	CD8-positive zytotoxische-T-Lymphozyten	NF- $\kappa$ B	„Nulcear factor kappa B“
<i>C.pneumophila</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
		NLR	Nucleotide binding oligomerization domain like receptors
DMSO	Dimethylsulfoxid	NML	Normales murines Lungengewebe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster
F <sub>c</sub>	Fragment crystalline	PBS	Phosphate buffered saline
FCS	Fetales Kälberserum	PFA	Paraformaldehyd
G	Gramm	<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
gA	große (Lungen-) Arterien	PLY	Pneumolysin
GMCSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
gV	große (Lungen-) Venen	pvl	perivaskuläre Infiltrate
h	Stunde	R	Rezeptor
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung	RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

---

<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SC	Santa Curz™ Biotechnologies
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSP	Short Signal Peptide (IL-15)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-receptors
tmG	teilmuskularisierte Gefäße
V	Volt
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
WB	Westernblot



## 7.2 Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Matthias Paul Lampe, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Pulmonale Expression und Regulation von IL-15 und den Rezeptoruntereinheiten IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  und  $\gamma^c$  in der durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten Mausepneumonie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

23. September 2010

Matthias Paul Lampe

## **7.3 Lebenslauf**

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

Matthias Paul Lampe

## 7.4 Veröffentlichungen

- Hocke, A. C., **Lampe M. P.**, Witzenrath M., Mollenkopf H., Zerrahn J., Schmeck B., Kessler U., Krull M., Hammerschmidt S., Hippenstiel S., Schutte H., Suttorp N., Rosseau S. 2007. Cell-specific interleukin-15 and interleukin-15 receptor subunit expression and regulation in pneumococcal pneumonia-comparison to chlamydial lung infection. *Cytokine*. 38:61-73.

## 7.5 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Norbert Suttrop, Frau Dr. med. Simone Rosseau und Herrn Dr. med. Andreas Hocke für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, sowie der Abteilung für Immunologie des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bedanken: Insbesondere bei Herrn Dr. med. Bernd Schmeck für die Hilfe bei den Westernblot-Untersuchungen und bei Frau Stephanie Preising für die Hilfe bei den PCR-Untersuchungen sowie Herrn Dr. med. Hans Mollenkopf vom MPI für Infektionsbiologie für Microarray Transskriptom Analyse.

Bei dem Institut für Biometrie der Charité möchte ich mich für die Beratung und Unterstützung zur statistischen Auswertung bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die Anregungen und aufmunternden Worte bei meiner Frau Kerstin, meinen Eltern Dagmar und Harald Lampe sowie Katrin Wricke.