

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

DISSERTATION

Die Rolle von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vincent van Laak  
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>1. Abstrakt.....</b>	<b>1</b>
1.1. Abstract .....	2
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1. Pneumonie .....	3
2.1.1. Ätiologie .....	3
2.1.2. Symptomatik und Diagnostik .....	3
2.1.3. Therapie .....	4
2.1.4. Besonderheiten der Pneumokokkenpneumonie .....	5
2.2. Die Pneumokokke .....	5
2.2.1. Pathogenitätsfaktoren .....	5
2.3. Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie .....	6
2.4. Das Immunsystem .....	7
2.4.1. Das angeborene Immunsystem.....	8
2.4.2. Mustererkennende Rezeptoren (PRRs) .....	8
2.4.2.1. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) .....	8
Tabelle 1: Einige in der Literatur bisher beschriebene TLR-Liganden und Adaptermoleküle .....	9
2.4.2.2. Die Nod-like Rezeptoren (NLRs).....	10
2.4.3. Die erworbene Immunabwehr .....	10
2.4.3.1. Die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen.....	11
2.5. Dendritische Zellen .....	12
2.6. Die IL-12 Zytokinfamilie .....	14
2.6.1. IL-23 .....	15
2.6.2. IL-27 und IL-35 .....	17
2.7. Th17 Zellen .....	17
2.7.1. Weitere IL-17 produzierende Zellen .....	18
2.7.2. IL-17 und IL-22.....	18
2.8. Hypothese und Fragestellung .....	19

<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1.	Zellkultur .....	21
3.1.1.	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) und Kultur .....	21
3.1.1.1.	Magnetische Aufreinigung von Monozyten .....	22
3.1.1.2.	Differenzierung zu Makrophagen und Kultur .....	22
3.1.1.3.	Differenzierung zu dendritischen Zellen und Kultur .....	22
3.1.1.4.	Isolation von naiven CD4 <sup>+</sup> CD45ra <sup>+</sup> CD45ro <sup>-</sup> T-Zellen und Kultur .....	23
3.1.1.5.	Kokulturmodell zur Aktivierung der naiven T Zellen durch aktivierte dendritische Zellen .....	23
3.1.2.	Isolation von primären murinen Knochenmarksstammzellen .....	23
3.1.2.1.	Differenzierung zu Makrophagen und Kultur .....	24
3.1.2.2.	Differenzierung zu dendritischen Zellen und Kultur .....	24
3.1.3.	Isolation von murinen naiven Milz T Zellen und Kultur .....	24
3.1.4.	Kokulturmodell zur Aktivierung der naiven murinen T Zellen durch aktivierte murine dendritische Zellen .....	25
3.1.5.	M-CSF produzierende L929-Zellen .....	25
3.1.6.	GM-CSF produzierende B-Zell Hybridomalinie .....	25
3.2.	Durchflusszytometrie .....	25
3.2.1.	Messung von Oberflächenmarkern .....	26
3.2.2.	Messung von intrazellulären Zytokinkonzentrationen .....	26
3.3.	Mikrobiologische Methoden .....	27
3.3.1.	Verwendete <i>S. pneumoniae</i> Stämme .....	27
3.3.2.	Bakterienkultur .....	28
3.3.3.	Infektionsversuche .....	29
3.4.	Nukleinsäureassays .....	29
3.4.1.	RNA Aufreinigung .....	29
3.4.2.	Reverse Transkription .....	29
3.4.3.	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	29
3.5.	Enzyme linked immunosorbent assay – Elisa .....	30
3.6.	<i>In vivo</i> Versuche – Mauspneumoniemodell .....	30
3.6.1.	Tierhaltung .....	30

3.6.2.	Versuchstiere .....	30
3.6.3.	Anzucht der Bakterien zur Infektion der Maus .....	31
3.6.4.	Infektion der Tiere .....	32
3.6.5.	Präparation der Tiere und Probenentnahme .....	32
3.6.6.	Durchführung der Blutentnahme .....	33
3.6.7.	Durchführung der Bronchoalveolären Lavage (BAL) .....	33
3.6.8.	Entnahme der Lunge .....	33
3.6.9.	Differenzierung der Leukozyten in BAL und Blut .....	33
3.6.10.	Quantifizierung der Zytokine in der BAL .....	35
3.6.11.	Isolierung der RNA aus Mauslungen .....	35
3.6.12.	Untersuchung des klinischen Verlaufs der Pneumokokkenpneumonie .....	36
3.6.13.	Bestimmung der Bakterienlast in Blut und Lunge .....	37
3.6.14.	Bestimmung der Lymphozytenpopulationen aus Lunge und BAL .....	37
3.7.	Statistik .....	38
3.8.	Materialien, Reagenzien, Geräte .....	38
3.8.1.	Plastikwaren, Zellkulturschalen .....	38
3.8.2.	Medien .....	38
3.8.3.	Magnetische Zellseparation .....	40
3.8.4.	Antikörper .....	40
3.8.5.	Nukleinsäureassays .....	41
3.8.6.	Elisa .....	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> induziert die Expression von IL-23 in humanen dendritischen Zellen .....	42
4.2.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> induziert die Expression von IL23A in humanen Makrophagen und dendritischen Zellen .....	42
4.3.	Die Expression von IL23A ist abhängig von bakteriellen Pathogenitätsfaktoren.....	43
4.4.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> induziert die Expression von IL23A in murinen Makrophagen in Abhängigkeit von MyD88 .....	44
4.5.	Die Expression von IL-23 ist abhängig von TLR-2 und TLR-4 .....	45
4.6.	Mit <i>S. pneumoniae</i> infizierte dendritische Zellen induzieren Th17-Zellen.....	46

4.7.	Die Bildung von IL-17 und IL-22 in murinen T-Zellen scheint abhängig zu sein von IL-23 nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> .....	47
4.8.	IL-23 ist wichtig für das Überleben einer Pneumokokkenpneumonie.....	48
4.9.	IL-23-defiziente Mäuse und Wildtypmäuse haben einen ähnlichen Krankheitsverlauf .....	49
4.10.	IL-23 hat keinen Einfluss auf die Bakterienlast während der Pneumokokkenpneumonie der Maus .....	50
4.11.	Die Pneumokokkenpneumonie induziert eine Neutrophilie und relative Lymphopenie .....	51
4.12.	Die Pneumokokkenpneumonie löst ein entzündliches Infiltrat in der Lunge aus.....	52
4.13.	Die Pneumokokkenpneumonie löst eine IL-23 abhängige Th17- Antwort in der Lunge aus .....	53
4.14.	Zytokinsekretion in Blut und BAL im Rahmen der Pneumokokkenpneumonie .....	54
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
5.1.	Antigenpräsentierende Zellen als Zielzellen von <i>S. pneumoniae</i> .....	56
5.2.	Die Expression von IL23A ist abhängig von Pneumolysin und den Kapselpolysacchariden von <i>S. pneumoniae</i> .....	58
5.3.	Die Expression von IL-23 ist abhängig von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort .....	60
5.4.	Pneumokokken infizierte dendritische Zellen induzieren eine Th17-Antwort .....	62
5.5.	IL-23 ist wichtig für das Überleben einer Pneumokokkenpneumonie.....	65
5.5.1.	Mögliche Ursachen für die erhöhte Mortalität von IL-23p19-defizienten Tieren gegenüber Wildtyptieren in der Pneumokokkenpneumonie .....	66
5.6.	Zusammenfassung .....	71
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>86</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>88</b>

## 1. Abstrakt

*S. pneumoniae* ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie und stellt aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität der Pneumonie eine große sozioökonomische Last für die Industrienationen dar. Aufgrund zunehmender Resistenzen gegen antimikrobielle Chemotherapeutika und dem damit verbundenen Verlust der zentralen Therapie wird das Verständnis der zugrundeliegenden immunologischen und pathophysiologischen Mechanismen zunehmend wichtiger für die Behandlung der Pneumokokkenpneumonie. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von IL-23, einem proinflammatorischen Zytokin der IL-12 Familie mit Einfluss auf die angeborene und erworbene Immunantwort, in der Pneumokokkenpneumonie untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* die Expression von IL-23 in humanen und murinen dendritischen Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit von Toll-like Rezeptor TLR-2, TLR-4 sowie deren Adaptermolekül MyD88 induziert. Im Kokulturmodell waren infizierte dendritischen Zellen in der Lage, in Abhängigkeit von IL-23 eine Th17-Antwort zu stimulieren. Nach intranasaler Infektion mit *S. pneumoniae in vivo* zeigte sich, dass IL-23 einen protektiven Einfluss auf das Überleben der Tiere hatte. Ein Einfluss von IL-23 auf die Bakterienlast, die zelluläre oder humorale Entzündungsreaktion konnte jedoch zu den untersuchten Zeitpunkten nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend konnten mit der TLR-abhängigen IL-23-Produktion und dem Einfluss von IL-23 auf die Aktivierung von Lymphozyten wichtige Abwehrsysteme des Wirtes gegen *S. pneumoniae* näher charakterisiert werden.

## 1.1. Abstract

*S. pneumoniae* is the most common cause for a community acquired pneumonia which is due to its high morbidity and mortality a big socioeconomic burden for the industrialized countries. The steady raise of resistance mechanisms against antimicrobial substances and thus the loss of the major therapeutic tool in the treatment of pneumococcal pneumonia cause a further need for a deep understanding of the immunological and pathophysiological mechanisms underlying this disease. The presented thesis was designed to further the understanding of the role of IL-23, a proinflammatory cytokine of the IL-12 family with effects on the innate and the adaptive immune system, in pneumococcal pneumonia.

The presented experiments demonstrated that an infection with *S. pneumoniae* leads to a TLR-2, TLR-4 and MyD88-dependent induction of IL-23 in primary human and murine macrophages and dendritic cells. In a co-culture model *S. pneumoniae* infected dendritic cells were able to induce the differentiation of naïve T-cells into Th17-cells dependent upon IL-23. The intranasal infection of wild type and IL-23-deficient mice in an *in vivo* pneumococcal pneumonia model showed a protective effect for IL-23 for the survival of the animals. An influence of IL-23 on the bacterial burden, cellular and humeral inflammatory reaction could not be observed at the chosen time points in this thesis.

Finally, with the demonstration of the TLR-dependent IL-23 production and the influence of IL-23 on the activation of selected lymphocytes an important defense system of the host against *S. pneumoniae* could be further characterized.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Pneumonie**

Eine Pneumonie ist definiert als eine Erkrankung, die einhergeht mit einer Entzündung des Lungenparenchyms und einer damit verbundenen Einschränkung des Gasaustauschs. Auslöser können insbesondere Infektionen sein aber auch chemische Substanzen und energiereiche Strahlung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Begriff Pneumonie als Synonym für eine bakterielle Infektion des Lungenparenchyms verwandt. Aufgrund der Konsequenzen für das diagnostische und therapeutische Vorgehen unterscheidet man eine ambulant erworbene Pneumonie („community acquired pneumonia“ – CAP) von einer nosokomialen Pneumonie („hospital acquired pneumonia“ – HAP), die frühestens 48 Stunden nach Aufnahme in das Krankenhaus oder bis zu 4 Wochen nach Beendigung des Krankenhausaufenthalts auftritt [1]. Betroffen von der ambulant erworbenen Pneumonie sind insbesondere Kinder bis 10 Jahre und Erwachsene ab 60 Jahren.

#### **2.1.1. Ätiologie**

Als häufigster Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie gilt *Streptococcus pneumoniae* der in ca. 40-50% aller in Deutschland behandelten Pneumonien nachgewiesen wird [1]. Weiterhin findet man in 5-10% der ambulant erworbenen Pneumonien *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Enterobacteriaceae* und respiratorische Viren, insbesondere das Respiratory Syncytial Virus (RSV), Adenoviren und Influenzaviren [1]. Nur bei unter 5% aller Patienten konnte *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* sowie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* in mikrobiologischen Studien nachgewiesen werden. In ca. 20-25% aller Patienten gelingt ein Erregernachweis jedoch gar nicht, so dass weiterhin eine große Zahl der Patienten rein empirisch behandelt werden, ohne dass eine Anpassung der antimikrobiellen Therapie möglich ist [1, 2].

#### **2.1.2. Symptomatik und Diagnostik**

Die klinischen Symptome einer Pneumonie kann man in zwei Gruppen einordnen. Die Allgemeinsymptome umfassen Fieber, Schüttelfrost, Abgeschlagenheit und Appetitlosigkeit. Zu den respiratorischen Symptomen zählen Husten mit purulentem Auswurf, Tachypnoe mit

Dyspnoe, thorakale Schmerzen, Hämoptysen und Tachykardie. Weiterhin kann man unter Umständen eine Veränderung des mentalen Zustandes des Patienten mit Verwirrtheit und Desorientierung beobachten [1].

Bei der klinischen Untersuchung eines Patienten mit einer Pneumonie kann man meist mittel- bis feinblasige Rasselgeräusche über dem betroffenen Areal auskultieren. Insbesondere bei schweren Pneumonien kann es zu einem begleitenden Pleuraerguß kommen, der in der Perkussion des Thorax durch eine Dämpfung des Klopfgeräuschs auffällt [1].

Als definitive Diagnose gilt ein frisches Infiltrat im Röntgenbild des Thorax. Hierbei handelt es sich um das radiologische Korrelat eines alveolären Ergusses. Dieser besteht zu einem großen Teil aus Zellen der Immunabwehr, hauptsächlich neutrophilen Granulozyten sowie Antikörpern und weiteren Plasmabestandteilen. Weiterhin erfolgt immer der Versuch einer Isolation und die nachfolgende mikrobiologischen Anzucht und Bestimmung des Resistenzmusters gegen antimikrobielle Chemotherapeutika des auslösenden Pathogens z. B. aus dem Sputum, dem Tracheobronchialsekret, der bronchoalveolären Lavage oder dem Blut des Patienten [1].

### **2.1.3. Therapie**

Die Therapie einer bakteriellen Pneumonie erfolgt immer mit antimikrobiellen Chemotherapeutika. Die Auswahl des Medikaments sollte immer in Kenntnis der möglichen Resistenzen erfolgen. Eine in Deutschland durchgeführte Therapie der CAP sollte sich an der S3 Leitlinie „Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie“ der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und der Paul Ehrlich Gesellschaft orientieren [1].

Die Rolle der antimikrobiellen Chemotherapie zur Behandlung einer Pneumonie wurde bereits 1939 erkannt und in einer Studie mit Patienten verglichen, die ausschließlich nach den damaligen supportiven Standards behandelt wurden [3]. Hier zeigte sich, dass die Therapie mit 2-(p-Aminobenzenesulphonamido-) Pyridine die Mortalität einer Pneumonie von 27% auf 8% senken konnte. Aktuelle Zahlen zeigen eine Mortalität von ca. 10%. Es konnte also seit 1938 kein signifikanter Abfall der Mortalität in der Behandlung der Pneumonie erreicht werden. Daraus und aus der steigenden Zahl der erworbenen Resistenzen gegen antimikrobielle

Chemotherapeutika ergibt sich die zwingende Notwendigkeit zur Erforschung weiterer therapeutischer Möglichkeiten.

#### **2.1.4. Besonderheiten der Pneumokokkenpneumonie**

Im Rahmen von CAPNETZ, einem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanzierten Netzwerk zur Untersuchung der ambulant erworbenen Pneumonie, wurde *S. pneumoniae* als der bei weitem häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland identifiziert [1]. Ähnliche Untersuchungen in anderen europäischen Ländern und den USA ergaben den gleichen Befund [4].

Pneumokokken besitzen die Fähigkeit den Nasopharynx zu besiedeln. Bei 5-10% der gesunden adulten Bevölkerung und bei 20-40% der gesunden Kinder kann ein Nachweis der Pneumokokken in den oberen Atemwegen erfolgen [1]. Es konnte gezeigt werden, dass sich Pneumokokken dort mehrere Monate vermehren können, ohne eine Erkrankung auszulösen. Verschiedene prädisponierende Faktoren können dann jedoch zu einer pneumokokken-assoziierten Erkrankung einschließlich einer Pneumonie führen. Hierbei ist besonders auffällig, dass schwere Pneumokokkeninfektionen insbesondere in den ersten beiden Lebensjahren und im fortgeschrittenen Alter ab 55 Lebensjahren vorkommen [5]. Weiterhin findet sich eine erhöhte Inzidenz und häufiger schwere Verlaufsformen bei alkoholabhängigen, immunsupprimierten und splenektomierten Patienten [4].

### **2.2. Die Pneumokokke**

Im Jahre 1884 beschrieb von Klein ein ca. 1µm großes aerophiles gram-positives Bakterium als Hauptursache der Pneumonie. Seitdem ist *S. pneumoniae* genauer charakterisiert worden. Klinische Isolate besitzen eine Polysaccharidkapsel und kommen in der Regel als charakteristische Diplokokken oder in Kettenform vor [6]. Man unterteilt auf Grund der isolierten Kapselantigene ca. 90 Serovare [7]. *S. pneumoniae* ist katalase-negativ, kann Glukose, Laktose und Trehalose verstoffwechseln und verursacht auf Blutagarplatten eine α-Hämolyse [8].

#### **2.2.1. Pathogenitätsfaktoren**

Pneumokokken besitzen zahlreiche Pathogenitätsfaktoren, die für Adhärenz, Kolonisierung und Invasion wichtig sind und dadurch das Entzündungsgeschehen beeinflussen. Zu diesen

Pathogenitätsfaktoren zählen z. B. die Polysaccharidkapsel sowie zahlreiche Zellwandbestandteile (Peptidoglykan, Teichon- und Lipoteichonsäuren, Phosphorylcholin, „choline-binding-protein“ (Cbp); „pneumococcal surface protein A“ (PspA)), Toxine (Pneumolysin, Autolysin), Enzyme (Neuraminidase, Metalloproteinasen, Hyaluronatlyase) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [9, 10]. Die in dieser Arbeit untersuchten Virulenzfaktoren werden im Weiteren genauer besprochen.

*S. pneumoniae* trägt eine Polysaccharidkapsel, die einer Interaktion des Komplementfaktors C3b mit der Pneumokokke entgegenwirkt und dadurch die Opsonierung und nachfolgende Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen verhindern kann [9]. Weitere Zellwandkomponenten, insbesondere Lipoteichonsäure, Peptidoglykan und Lipopeptide, interagieren mit Rezeptoren der angeborenen Immunität und beeinflussen dadurch die Inflammation [9]. Sie stellen hochkonservierte molekulare Muster dar, welche von Rezeptoren der angeborenen Immunität erkannt werden (siehe Kapitel 1.4.2). Es konnte gezeigt werden, dass durch engen Kontakt der Pneumokokken mit den Wirtszellen ein Phasenwechsel vollzogen wird, wobei sich das Verhältnis von Kapseldicke zu Peptidoglykananteil und Phosphorylcholin verschiebt [11-13].

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *S. pneumoniae* ist das intrazelluläre Hämotoxin Pneumolysin [14]. Nach Autolyse der Pneumokokken wird Pneumolysin freigesetzt und führt konzentrationsabhängig zur Inhibition der ziliaren Aktivität der Bronchialepithelzellen, zu zytotoxischen Effekten durch eine Porenbildung in der Zellmembran der Wirtszellen, zum Aufbrechen der interzellulären Verbindungen (Tight-Junctions), zur Komplementaktivierung sowie zu einer inflammatorischen Aktivierung der Wirtszellen [15-17].

### **2.3. Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie**

Zur Untersuchung der Pathogenese einer Infektionskrankheit und der verschiedenen, an der immunologischen Reaktion beteiligten Faktoren, hat sich das Mausmodell vielfach bewährt. Es ermöglicht durch den Einsatz von genetisch veränderten Tieren die Untersuchung einzelner an der Wirtsantwort beteiligter Moleküle und weist trotz einiger Unterschiede des murinen Immunsystems eine große Gemeinsamkeit mit dem humanen Immunsystem auf. So können im Bewusstsein der Einschränkungen eines Tiermodells Erkrankungen mit humanen Pathogenen zum Teil nachgeahmt und untersucht werden.

Die hohe Virulenz von *S. pneumoniae* in der Maus erschwert jedoch die Untersuchung der Pneumokokkenpneumonie. Daher wurden in einer breit angelegten Untersuchung verschiedene Inzuchtmauslinien (BALB/c; C3H/he; C57BL/6; CBA/Ca; DBA/2; DBA/2; FVB/n; NIH; SJL) intranasal mit *S. pneumoniae* D39 Serotyp 2 infiziert und das entstehende Krankheitsbild auf die Ausbildung einer invasiven Pneumonie, der Bakterienlast im Blut sowie die Mortalität untersucht. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der Mortalität sowie der Höhe der Bakteriämie nach 24 Stunden zwischen den verschiedenen Inzuchtlinien [18]. So zeigten BALB/c Mäuse eine gewisse Resistenz gegenüber einer Pneumokokkeninfektion, da sich nach 24 Stunden keine Pneumokokken mehr im Blut nachweisen ließen und ihre mittlere Überlebenszeit nach Infektion 168 Stunden betrug. C57BL/6 Mäuse hingegen hatten eine mittlere Überlebenszeit von 74 Stunden und eine deutliche Bakteriämie nach 24 Stunden mit  $10^3$  cfu/ ml Blut [18]. In einer weiteren Studie konnte in BALB/c Mäusen eine unterschiedliche Organspezifität verschiedener *S. pneumoniae* Serotypen gezeigt werden. Mit D39 (Serotyp 2) intranasal infizierte Mäuse bildeten nach 48 Stunden das klinische Bild einer Sepsis aus. Eine Infektion mit dem Stamm A66 (Serotyp 2) führte zu einer schweren Pneumonie und der Stamm TIGR4 (Serotyp 4) verursachte eine Meningitis bei den Mäusen. Die Ausbildung der Erkrankung war dabei abhängig von der Infektionsdosis, diese differierte aber zwischen den einzelnen Stämmen [19]. Als Konsequenz zeigt sich, dass es unbedingt notwendig ist, die richtige Kombination aus *S. pneumoniae* Serotyp und der entsprechenden Inzuchtmauslinie zu wählen, um eine Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen.

## **2.4. Das Immunsystem**

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, Infektionserreger, fremdes Material oder endogene bei der Gewebeschädigung freigesetzte Gefahrenstoffe im Organismus zu identifizieren, ein Gefährdungspotential einzuschätzen und wenn nötig eine Immunantwort auszulösen, welche die Infektionserreger und Fremdstoffe entfernt, bzw. zur Heilung der Gewebsschädigung beiträgt. Das Immunsystem schützt dadurch den Organismus z.B. vor Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten, da eine verzögerte oder inadäquate Immunantwort zu einem lebensbedrohlichen systemischen Ausbreiten der Infektion führen kann. Das Immunsystem besteht bei Vertebraten aus den humoralen und zellulären Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems [20-22].

### **2.4.1. Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch älteste Bestandteil der Immunabwehr [23] und besteht aus sekretierten Abwehrstoffen (antimikrobielle Peptide, C-reaktives Protein, Komplementsystem, Zytokine etc.), der Fähigkeit zur Phagozytose von als fremd erkannten Materialien und Organismen und der Erkennung von bestimmten molekularen Mustern durch Mustererkennende Rezeptoren („pattern recognition receptors“ – PRRs). Diese Rezeptoren sind ubiquitär exprimiert und finden sich u.a. auf Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen [24-27].

Weiterhin gibt es eine Gruppe von Zellen, die ursprünglich eher der erworbenen Immunität zugerechnet wurden, da sie eine große Ähnlichkeit oder sogar die gleichen Vorläufer wie T-Zellen haben. Die ILC (innate lymphoid cells), Gedächtnis-Th17-Zellen, die NKT-Zellen und die  $\gamma\delta$ T-Zellen sowie vermutlich weitere Subpopulationen der T-Zellen, können teilweise funktionell der angeborenen Immunität zugeordnet werden, da sie in den ersten Stunden nach Infektion aktiv auf den Erreger reagieren und so zu dessen Abwehr beitragen [28].

Im weiteren Verlauf sollen die für das Verständnis dieser Arbeit wichtigen Mechanismen der angeborenen Immunität, insbesondere die der mustererkennenden Rezeptoren, einiger Zytokine und der Th17-Zellen genauer erläutert werden.

### **2.4.2. Mustererkennende Rezeptoren (PRRs)**

Zu den mustererkennenden Rezeptoren gehören verschiedene Proteinfamilien mit jeweils vielen Mitgliedern. Man unterscheidet z.B. die Toll-like Rezeptoren (TLRs), die Nod-like Rezeptoren (NLRs), die C-Typ-Lektin Rezeptoren und die RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) sowie eine heterogene Gruppe von Rezeptoren, die in der Lage sind, fremde DNA im Zytosol der Wirtszelle zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen [29].

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung der TLRs.

#### **2.4.2.1. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs)**

Die Familie der Toll-like Rezeptoren umfasst beim Menschen 10 Mitglieder. TLRs bestehen aus einer extrazellulären, bzw. intravesikulären leucinreichen Domäne (leucine rich repeats, LRR) die für die Ligandenbindung zuständig ist, sowie einer intrazellulären Toll/ IL-1 Rezeptor homologe Domäne (Toll/ IL-1 receptor homology, TIR) für die Signalweiterleitung. TLRs sind

auf der Zellmembran (TLR-1, -2, -4-6, -10) oder auf lysosomalen, bzw. endosomalen Membranen (TLR-3, -7-9) lokalisiert und in der Lage, verschiedene streng konservierte molekulare Muster von Pathogenen, sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) zu erkennen [27, 30]. Bisher konnten eine Vielzahl von mikrobiellen und endogenen Aktivatoren/ Liganden für die TLRs identifiziert werden. Tabelle 1 listet einige der bisher bekannten Liganden der TLRs auf.

	<b>Liganden</b>	<b>Adaptermolekül</b>
TLR-1	Bakterielle Lipopeptide	MyD88
TLR-2	Bakterielle Lipopeptide, Lipoteichonsäure (LTA), oxidiertes Phospholipid, HMGB1	MyD88, MAL
TLR-3	dsRNA, mRNA	TRIF
TLR-4	Lipopolysaccharid (LPS), oxidierte Lipoproteine	MyD88, TRIF, MAL, TRAM
TLR-5	Flagellin	MyD88
TLR-6	Bakterielle Lipopeptide	MyD88
TLR-7	ssRNA	MyD88
TLR-8	ssRNA	MyD88
TLR-9	CPG-DNA	MyD88
TLR-10	unbekannt	unbekannt

**Tabelle 1: Einige in der Literatur bisher beschriebene TLR-Liganden und Adaptermoleküle**

Durch die Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst. Diese ist bei den TLRs von vier Adaptermolekülen mit einer TIR Domäne abhängig. Dabei handelt es sich um MyD88, MAL, TRIF und TRAM, deren genauere Funktion im Weiteren kurz skizziert wird. Das ebenfalls für den IL-1 Rezeptor wichtige Adaptermolekül MyD88 („myeloid differentiation factor“ 88) und der Adapter MAL („MyD88 adaptor like“) können NF- $\kappa$ B aktivieren, während TRIF („TIR domain containing adaptor inducing interferon  $\beta$ “) und TRAM („TRIF related adaptor molecule“) den IRF-3 Signalweg aktivieren können. Eine Ausnahme stellen dabei die plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDC) dar. Ein durch TLR-7 oder -9 ausgelöstes Signal über den MyD88 Signalweg kann hier ebenfalls zu einer Aktivierung von IRF-7 führen. Durch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges kommt es zur Transkription zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-8, GM-CSF, TNF $\alpha$ ), wohingegen die Aktivierung von IRF-3 und -7 zur Transkription der Typ 1 Interferone führt. Alle TLRs außer TLR-3 nutzen

MyD88 um NF- $\kappa$ B zu aktivieren, während TLR-3 und TLR-4 ein Signal auch über TRIF weiterleiten um die Transkriptionsfaktoren IRF3 und 7 zu aktivieren. [30-32].

#### **2.4.2.2. Die Nod-like Rezeptoren (NLRs)**

Die Familie der NOD-like Rezeptoren (NLRs) hat 23 bekannte Mitglieder im menschlichen Proteom von denen bisher nur wenige gut charakterisiert wurden [33]. NLRs sind im Zytosol lokalisiert und können in den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten, wie z. B. an der Mitochondrienmembran oder auch an der intrazellulären Seite der Zellmembran gefunden werden [33]. NLRs bestehen aus einer Nukleotidbindungsdomäne (NBD- oder NOD- bzw. NACHT-Domäne genannt). Weiterhin konnte bei vielen auch eine C-terminale LRR Domäne, wie bei den TLRs nachgewiesen werden, die vermutlich für die Ligandenerkennung verantwortlich ist. Am N-terminalen Ende der NLR-Proteine konnten verschiedene Domänen mit Effektorfunktion gefunden werden. Bei diesen Effektordomänen wurden u. a. CARD („caspase recruitment domain“), BIR Domänen („baculovirus inhibitor repeats“) und eine Pyrin Domäne (PID) beschrieben, die verschiedene Signalwege aktivieren können [33]. Zwei der am besten beschriebenen NLRs sind NOD1 und NOD2. Während NOD1 ubiquitär exprimiert ist, findet man NOD2 hauptsächlich in Leukozyten und den mukosalen Epithelzellen des Darms und der Lunge [33]. Dabei erkennen sowohl NOD1 als auch NOD2 Bestandteile von Peptidoglykanen in den Zellwänden von Bakterien. NOD1 ist dabei der intrazelluläre Sensor für die hauptsächlich in der Zellwand von gram-negativen Bakterien vorkommende meso-Diaminopimelinsäure enthaltende Peptidoglykanfragmente, während NOD2 ein konserviertes Muramyldipeptid aus der Zellwand von wahrscheinlich allen zellwandbildenden Bakterien erkennt [31, 32].

#### **2.4.3. Die erworbene Immunabwehr**

Im Laufe der Phylogenese entwickelte sich aus der angeborenen Immunabwehr die erworbene (=adaptive) Immunabwehr [34]. Im Vergleich zur angeborenen Immunantwort ist die adaptive Immunantwort zeitlich verzögert, verfügt dafür aber über Gedächtnisfunktionen. Durch ein somatisches Rearrangement der Antigenrezeptorgene ist sie in der Lage, Rezeptoren gegen nahezu alle unterschiedlichen Antigene auszubilden und diese zu erkennen. Man unterscheidet dabei zwischen einer humoralen Immunabwehr, vermittelt durch die von B-Zellen gebildeten

Antikörper und einer zellvermittelten Antwort durch T-Zellen [20-22]. Die Entwicklung vom antigenspezifischen Schutz umfasst die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen, die für die Beseitigung von extrazellulären Mikroorganismen verantwortlich sind, sowie die zellvermittelte Immunität der T-Zellen, die verschiedene Zytokine produzieren oder eine Zytolyse der infizierten Zellen auslösen, um diese zu eliminieren [20-22]. Im Rahmen einer Infektion kommt es zur Bildung von Plasmazellen. Das sind primär im Knochenmark lokalisierte, transformierte B-Zellen. Diese sind in der Lage große Mengen spezifischer Antikörper zur Abwehr gegen eine Infektion zu bilden. Durch diese Antikörper ist es möglich, eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger schneller abzuwehren, ohne dass es zu einer Erkrankung oder klinischen Symptomen einer Infektion kommen muss [35].

#### **2.4.3.1. Die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen**

Zu Beginn der erworbenen Immunantwort steht die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen. Diese Zellen sind in der Lage, Pathogene in ihre Peptidbausteine zu zerlegen und einzelne Peptide gebunden an MHC („Major Histocompatibility Complex“ - Haupthistokompatibilitätskomplex)-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Dendritische Zellen haben hierfür eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um Pathogene und Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Im Rahmen einer bakteriellen Infektion kommt es zu einer rezeptorabhängigen Phagozytose oder einer rezeptorunabhängigen Makropinozytose, was in Folge zu einer Präsentation von bakteriellen Peptiden auf MHC-II Molekülen führt [36]. Virale Infektionen führen in der Regel zu einer Viruspeptidpräsentation auf MHC-I Molekülen. Die Phagozytose oder Makropinozytose von Viren führt zur Kreuzpräsentation (Cross presentation) von viralem Antigen auf MHC-I Molekülen. Hierbei wird virales Antigen durch eine retrograde Translokation am endoplasmatischem Retikulum ins Zytoplasma transferiert und nach weiterer Prozessierung auf MHC-I Molekülen präsentiert [37, 38]. Kommt es zu einer direkten Infektion der dendritischen Zelle vermehren sich die Viren in der dendritischen Zelle mit Hilfe ihres Proteinsyntheseapparates wie in jeder Körperzelle. Dabei werden einige virale Proteine im Proteasome prozessiert und in Folge auf MHC-I Molekülen präsentiert. Weiterhin können

dendritische Zellen im Lymphknoten virale Antigene von anderen dendritischen Zellen aus der Peripherie übernehmen und präsentieren [36].

Hierbei spielt die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen durch die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen von einer TLR-Aktivierung abhängig ist und dass die Effektivität der Präsentation von MHC-II gebundenen Peptid ebenfalls TLR-abhängig ist. Weiterhin scheint es so, dass die Wanderung von dendritischen Zellen in die lymphatischen Organe in Abhängigkeit von TLR-Signalen stattfindet [39, 40].

Außerdem steuert das angeborene Immunsystem über die Produktion von unterschiedlichen Zytokinen die Art der T-Zell-Antwort [41]. Für die vorliegende Arbeit ist dabei die Induktion von Th17-Zellen besonders relevant. Es konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen durch eine Kombination von IL-1 und IL-6 [42] oder von IL-1 und TGF $\beta$  [43] zu Th17-Zellen programmiert werden und ihr weitere Aktivität durch IL-23 reguliert wird [42, 44-47]. Das richtige Zytokinumfeld und der direkte Kontakt mit Oberflächenrezeptoren von dendritischen Zellen führen dann zur Programmierung der naiven T-Zellen. Hierbei kommt es zu einer direkten Bindung des spezifischen T-Zellrezeptors an das MHC-gebundene Peptid sowie zur Bindung von kostimulatorischen Molekülen wie CD80/86 und CD28 [43, 48-50]. Die Präsentation von zytosolischen Antigenen erfolgt hierbei über das MHC-I-Molekül und führt zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen [36, 37]. Die Präsentation von im Phagolysosom prozessierten Antigenen erfolgt über die MHC-II-Moleküle und führt zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen [51]. Dadurch ist es möglich, dass antigenpräsentierende Zellen die nachfolgende Immunantwort regulieren und steuern. Die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt zu einer primär zytolytischen/zytotoxischen Immunantwort. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt unter anderem zur Ausbildung einer spezifischen Antikörperantwort durch die Regulation der B-Zell Antwort [52]. Antigenpräsentierende Zellen stehen also an der Schnittstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort [53].

## **2.5. Dendritische Zellen**

Die Erstbeschreibung der dendritischen Zellen erfolgte in einer Serie von Publikationen in der Mitte der 1970er Jahre durch Ralph M. Steinmann [54-58]. Für diese Arbeit erhielt er 2011 als erster Wissenschaftler posthum wenige Tage nach seinem Tod den Nobelpreis für Medizin.

In den letzten Jahren konnte die Funktion der dendritischen Zellen näher untersucht werden. Es zeigte sich, dass dendritische Zellen die zentralen antigenpräsentierenden Zellen bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort sind [59]. Zahlreiche, mit den dendritischen Zellen verwandte Zelltypen, wie die Langerhans Zellen in der Haut oder Kupferzellen in der Leber wurden identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen nach Aktivierung durch als fremd identifiziertes Material in den nächsten Lymphknoten wandern können. Dort erfolgen der direkte Kontakt zu T- und B-Zellen und gegebenenfalls die Induktion einer adaptiven Immunantwort durch die oben beschriebenen Mechanismen. Nachdem auf zahlreichen Zellen die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort nachgewiesen werden konnten, konnte gezeigt werden, dass naive dendritische Zellen durch die Stimulation der PRRs durch PAMPs aktiviert werden. TLR-Stimulation führt zu einer deutlich verstärkten Antigenprozessierung im endozytischen Weg nach Phagozytose oder Makropinozytose von Pathogenen [39]. Weiterhin führt eine TLR-Stimulation von dendritischen Zellen zu einer veränderten Expression von Zytokinrezeptoren [60]. Dies führt dazu, dass die aktivierten dendritischen Zellen durch eine verstärkte Expression von CCR7 („licensing“) und der damit verbundenen hohen Sensitivität für CCL21 in lymphatische Organe wandern und dort den direkten Kontakt zu den naiven T-Zellen suchen [61, 62]. Durch die Aktivierung der PRRs kommt es ebenfalls zu einer differenzierten Zytokinantwort. Die dendritischen Zellen sind also nicht nur in der Lage eine Gefahr zu erkennen, sondern können in der Folge auch eine gezielte, spezifische und langandauernde Immunreaktion auslösen [53, 63-66]. Nach Phagozytose oder Makropinozytose von Antigen ohne Aktivierung der dendritischen Zellen durch einen PRR-Liganden sind dendritischen Zellen nicht in der Lage, eine T-Zellantwort auszulösen. Dies verhindert eine Autoimmunreaktion durch die Präsentation von körpereigenem Antigen insbesondere auf MHC-I Molekülen [39].

Man unterscheidet aktuell zwischen zwei unterschiedlichen Subtypen von dendritischen Zellen. Die konventionellen dendritischen Zellen, die insbesondere mit dem Gewebe der Grenzflächen des Körpers wie Lunge und Haut sowie mit lymphatischem Gewebe assoziiert sind und die plasmazytoiden dendritischen Zellen, die im Blut zirkulieren und nach Virusinfektion große Mengen Typ 1 Interferone bilden können. Konventionelle dendritische Zellen im Menschen können weiter unterteilt werden in CD141+ und CD14+ dendritische Zellen. Die CD141+ dendritischen Zellen sind in die Bildung einer zytotoxischen T-Zellantwort involviert und können wahrscheinlich über Zytokine der IL-12 Familie auch einen Einfluss auf die Antikörperbildung

nehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell zur Untersuchung der Pneumokokkenpneumonie verwendet. Es ist daher notwendig die unterschiedlichen dendritischen Zellen in der Maus im Gegensatz zum Menschen zu betrachten. Hierbei soll der Fokus auf die relevanten dendritischen Zellen in der Lunge gelegt werden. In der Mauslunge sind bisher zwei unterschiedliche Gruppen von konventionellen dendritischen Zellen beschrieben worden, die nicht mit lymphatischem Gewebe assoziiert sind. Diese sind unterteilt nach der Expression von CD103. CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> cDC befinden sich im Bronchialsystem direkt unterhalb der Epithelialschicht und können mit ihren Ausläufern zwischen den Epithelzellen liegen und die endobronchiale Oberfläche nach Antigenen absuchen [67]. CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> cDC liegen in der Lamina propria und können inhalierte Antigene und apoptotische Zellen prozessieren. Weiterhin wird vermutet, dass die CD103<sup>+</sup> cDCs auf bisher nicht vollständig verstandenem Weg Antigene an die CD103<sup>-</sup> cDCs weitergeben [67]. Nach Stimulation mit einem inflammatorischen Agens kommt es zur Immigration einer weiteren CD11b Ly6C<sup>+</sup> Population von cDCs. Diese DCs werden ebenfalls in den drainierenden Lymphknoten gefunden, so dass ihnen besonders gute migratorische und T-zellaktivierende Eigenschaften zugeschrieben werden [68].

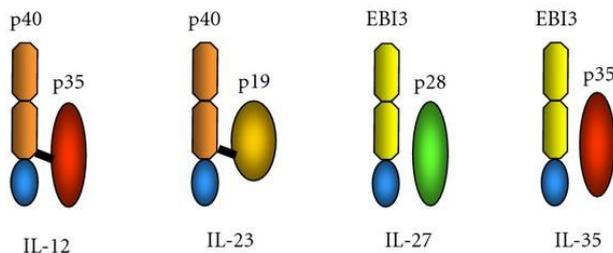
Im Gegensatz zu konventionellen dendritischen Zellen scheinen plasmazytoide dendritische Zellen keine große Rolle bei der Antigenpräsentation und der Induktion einer T-Zellantwort zu spielen [69, 70]. Sie sind jedoch besonders gut in der Lage eine virale Infektion in der Blutbahn zu detektieren und in Folge in Abhängigkeit von TLR-9 eine große Menge Typ I Interferon zu bilden [71, 72]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ausschließlich mit konventionellen CD14<sup>+</sup> dendritischen Zellen gearbeitet.

## **2.6. Die IL-12 Zytokinfamilie**

Zur Familie der IL-12 Zytokine zählt man aktuell IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35. All diesen Zytokinen ist gemein, dass sie heterodimere Proteine sind. Die strukturell eng verwandten Zytokine IL-12 und IL-23 verfügen beide über die IL12p40 Untereinheit, während IL-27 und IL-35 die gemeinsame Untereinheit EBI3 („Ebstein Barr Virus induced Gene 3“) teilen [73]. Die Zytokine IL-12 und IL-23 unterscheiden sich daher durch die zweite Untereinheit. Dies ist im Fall von IL-12 das Protein IL-12p35 und im Fall von IL-23 das Protein IL-23p19. IL-27 und IL-

35 unterscheiden sich durch die Bindung der p28 Untereinheit an EBI3 im Fall von IL-27 bzw. die mit IL-12 geteilte Untereinheit p35 im Fall von IL-35.

IL-12 bindet an den IL-12-Rezeptor bestehend aus den Untereinheiten IL-12R $\beta$ 1 und IL-12R $\beta$ 2, während der IL-23-Rezeptorkomplex aus den Untereinheiten IL-12R $\beta$ 1 und IL-23R $\alpha$  besteht. Das bedeutet, dass die beiden Zytokine aufgrund ihrer geteilten IL12p40-Untereinheit um die gleiche Rezeptoruntereinheit konkurrieren. Um ein Signal zu übermitteln muss jedoch eine Bindung an jeweils beide Rezeptoruntereinheiten erfolgen [74, 75].



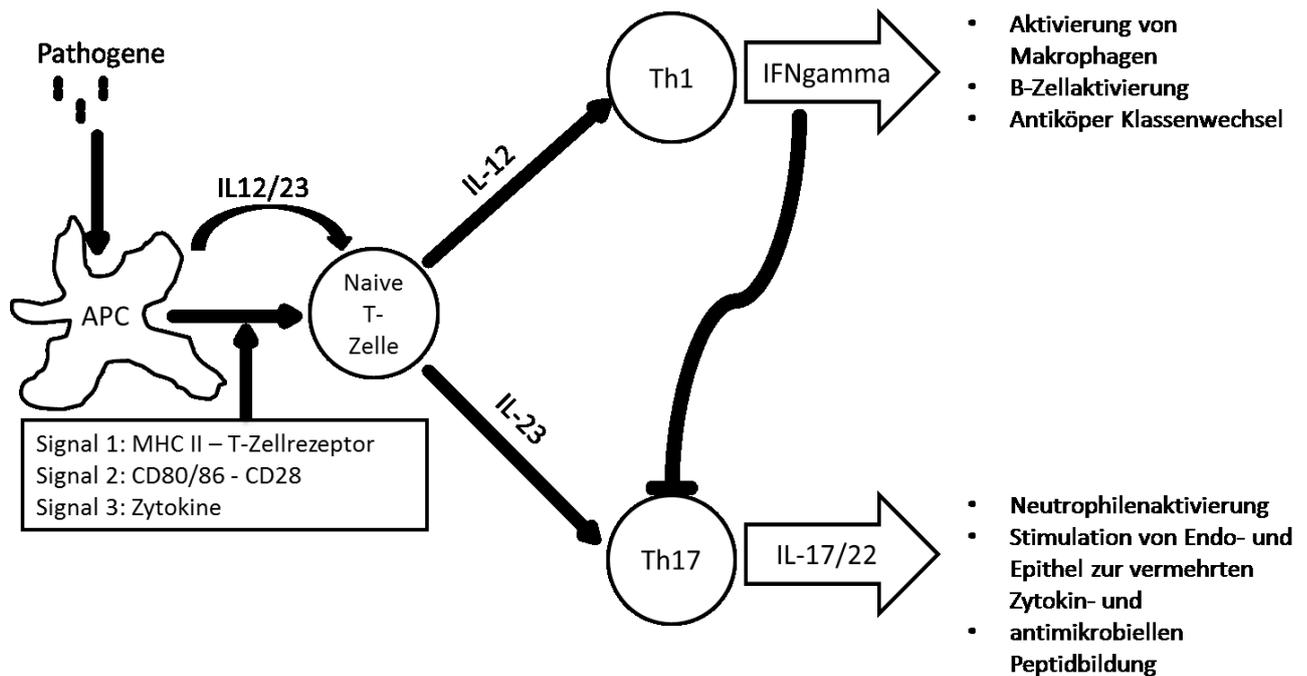
**Abbildung 1** Strukturmodelle der Zytokine der IL-12 Familie aus [73]

### 2.6.1. IL-23

Das Zytokin IL-23 gehört zur IL-12-Familie und besteht aus den beiden Untereinheiten IL12p40 und IL23p19 (IL23A) [75]. Es wird von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Th17-Antwort und der Sekretion von IL-22 [76, 77]. Der IL-23-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten. IL12R $\beta$ 1 ist ubiquitär auf T-Zellen sowie auf NK Zellen und B Zellen exprimiert. Durch die Bindung von IL-6 an den IL-6 Rezeptor auf T Zellen kommt es zur Expression von IL-21. Dies führt wiederum nach Bindung von IL-21 an seinen Rezeptor zur Aktivierung von STAT-6 und in der Folge zur Expression von IL-23R $\alpha$  [44]. Durch diesen, teilweise autokrinen Regulationsweg kommt es zur Expression eines funktionellen IL-23-Rezeptors. Nun ist IL-23 in der Lage, an die Th17-Zellen zu binden und durch einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus eine zuvor induzierte Th17-Antwort zu stabilisieren und somit eine Th17-abhängige Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten [45]. Es konnte beobachtet werden, dass bei einem Mangel an IL-23 die Th17-abhängige Entzündungsreaktion sowie die Proliferation der Th17-Zellen stark eingeschränkt ist [46]. Die Bindung von IL-23 an den IL-23-Rezeptor führt zur Aktivierung von JAK2 - Tyk2 und STAT3. Der aktivierte Transkriptionsfaktor STAT3 bindet direkt an den IL-17-Promoter und steigert ebenfalls die Expression von „Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma

T<sup>α</sup> (RORγT) [78]. Dieser Transkriptionsfaktor ist kritisch für die Expression von IL-17. Weiterhin führen die aktivierten Signalkaskaden zur Aktivierung von NF-κB und damit verbunden ebenfalls zur Aktivierung der IL17-Gentranskription. Durch IL-1 und IL-6 aktivierte Th17-Zellen sind weiterhin in der Lage IL-22 zu bilden [47]. Die Aktivierung der IL-22 Gentranskription ist zusätzlich abhängig vom Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AHR), dessen endogene Liganden durch die Aktivierung des Notch-Signalwegs vermehrt gebildet werden können [79].

Aufgrund dieser regulatorischen Funktion von IL-23, die zu einer Steigerung der inflammatorischen Antwort führt, wird IL-23 eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher autoinflammatorischer Erkrankungen, wie z. B. der autoimmunen Enzephalomyelitis, der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis zugeschrieben [80]. Weiterhin haben IL-23 und die Th17-Zellen wichtige Funktionen in verschiedenen mukosalen Infektionen, wie z.B. Infektionen mit *K. pneumoniae*, *T. gondii* und *M. pneumoniae* [76, 81, 82]. Dies wird mit der IL-17-vermittelten Neutrophilenrekrutierung, der Regulation von diversen Zytokinen und insbesondere der IL-23-abhängigen Expression von IL-22 sowie der daraus resultierenden Bildung von antimikrobiellen Peptiden in Verbindung gebracht (Siehe dazu die Kapitel 2.7 und folgende) [77, 83, 84]. Weiterhin scheint die proliferationsfördernde Wirkung von IL-22 auf verschiedene Zelltypen eine große Rolle zu spielen. Aktuell befinden sich IL-23 inhibierende Therapien, z. B. mit dem monoklonalen Antikörper Ustekinumab gegen IL12p40 in klinischen Studien und ersten Anwendungsbeobachtungen zur Behandlung der Psoriasis, chronisch inflammatorischer Darmerkrankungen sowie rheumatoider und psoriatischer Arthritis (clinicaltrials.gov) [80, 82, 85-87].



**Abbildung 2** Schematischer Ablauf des Einflusses von IL-23 auf die Aktivierung von naiven T-Zellen zu Effektor T-Zellen

Aktivierte dendritische Zellen aktivieren und stimulieren naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th1 und Th17 Zellen in Abhängigkeit u.a. von IL-12 bzw. IL-23.

### 2.6.2. IL-27 und IL-35

Weitere Mitglieder der IL-12-Familie sind die bisher nur wenig untersuchten Zytokine IL-27 und IL-35. Während IL-27 ebenfalls von antigenpräsentierenden Zellen produziert wird, scheint IL-35 ausschließlich von regulatorischen T-Zellen gebildet zu werden. IL-27 induziert synergistisch mit IL-12 die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen zu Th1 Zellen [88-90]. Jedoch ist auch eine negativ regulatorische Rolle für IL-27 auf Th1-, Th2- und Th17-Zellen sowie eine stimulatorische Rolle auf regulatorische T-Zellen beschrieben [91]. IL-35 wirkt regulatorisch und hemmend auf Th1- und Th17-Zellen und proliferationsfördernd auf regulatorische T-Zellen [92].

### 2.7. Th17 Zellen

Zu Beginn des Jahrtausends wurde eine neue Gruppe von T-Helferzellen entdeckt, die das Zytokin IL-17 bilden können [93]. Diese Zellen wurden aufgrund ihrer Herkunft aus CD4<sup>+</sup> Zellen als Th17-Zellen bezeichnet. Die Induktion der Th17-Zellen wurde in der vorliegenden

Arbeit bereits in Kapitel 2.6.1 behandelt. In den letzten Jahren konnte eine wichtige Rolle für diese Zellen in zahlreichen Autoimmunerkrankungen und Infektionen zugeordnet werden. So konnte eine zentrale Rolle der Th17-Zellen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis gezeigt werden. In Infektionsmodellen konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen beispielsweise eine wichtige Rolle in einer durch *Toxoplasma gondii* vermittelten experimentellen Kolitis [76], sowie in der Klebsiellen-Pneumonie spielen [83]. *In vitro* konnten zahlreiche Untergruppen der Th17-Zellen isoliert werden, deren Funktion und Vorkommen *in vivo* bisher nur sehr unzureichend untersucht wurden. Jedoch konnte im Verlauf beobachtet werden, dass Th17 Zellen nicht nur IL-17, sondern auch IL-22 bilden [84, 94, 95]. Im Rahmen eines Hyper-IgE Syndroms kommt es aufgrund von dominant negativen Mutationen im *STAT3* Gen, einem für die Bildung von Th17-Zellen essentiellen Transkriptionsfaktor, zu einem Th17 Mangel mit daraus resultierender Immundefizienz [96, 97].

### **2.7.1. Weitere IL-17 produzierende Zellen**

Nach Entdeckung der Th17 Zellen wurden weitere lymphozytäre Zelle identifiziert, die in der Lage sind, IL-17 und IL-22 zu bilden. Diese Zellen (mit Ausnahme der  $\gamma\delta$ T-Zellen) exprimieren keinen T-Zellrezeptor. Die  $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen und ILC (innate lymphoid cells) III bilden eine Gruppe von Lymphozyten, die bereits sehr früh im Rahmen einer Infektion IL-17 und IL-22 bilden können und damit die angeborene Immunantwort unterstützen [98-100]. Hierbei sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit insbesondere die erst in den letzten Jahren beschriebenen ILC III zu nennen, die alle IL-22 und unter besonderen Umständen auch IL-17A und F bilden. Diese Zellen sind an mukosalen Grenzflächen lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle in der Regeneration von Epithelzellschichten, der Protektion und Stimulation von epithelialen Stammzellen sowie eine bisher nur sehr ungenau beschriebene Rolle im Rahmen einer bakteriellen Infektion [101, 102].

### **2.7.2. IL-17 und IL-22**

Die von Th17-Zellen gebildeten Zytokine IL-17 und IL-22 gelten als proinflammatorische Zytokine. Insbesondere IL-17 induziert und steigert die Sekretion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  und Prostaglandine, wie

PGE2 in verschiedensten Zelltypen. IL-17 wirkt sowohl auf epitheliale Zellreihen, wie auch auf endotheliale und stromale Zelltypen [81, 83, 94, 103-109]. Weiterhin zeigte sich insbesondere in Untersuchungen zur rheumatoiden Arthritis [110] und zur Klebsiellen Pneumonie [83, 111], im Rahmen einer Infektion mit *L. monocytogenes* [110] und in weiteren Infektionsmodellen eine Th17-abhängige Neutrophilenrekrutierung, die einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der Infektion hat. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IL-17 ein inflammatorisches Geschehen verstärkt durch eine Steigerung der proinflammatorischen Zytokinantwort sowie die gesteigerte Neutrophilenrekrutierung und Steigerung der Granulozytopoese.

IL-22 wirkt insbesondere an mukosalen Oberflächen, auf epitheliale Zellen und auf Keratinozyten. Es induziert die Bildung von antimikrobiellen Peptiden (z. B.  $\beta$ -Defensinen, S100 Proteinen) [77, 112], steigert die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-6 und GM-CSF) [112] und induziert eine zelluläre Proliferation, die zur Heilung von Schäden der Barriere beiträgt und diese beschleunigt [83, 112]. Weiterhin werden zahlreiche oberflächenprotektive Proteine, wie z.B. die Mucine, in Abhängigkeit von IL-22 vermehrt gebildet. Diese Effekte bewirken bei einer Infektion eine Reduktion des bakteriellen Wachstums sowie eine Stabilisierung der mukosalen Barriere. Im pathologischen Kontext einer Psoriasis ist eine fehlregulierte Expression von IL-22 ursächlich verantwortlich für die Bildung von psoriatischen Plaques im Rahmen einer pathologischen Hyperproliferation. [77, 113-116].

## **2.8. Hypothese und Fragestellung**

Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts konnte *S. pneumoniae* als ein Erreger der Pneumonie identifiziert werden. Im Laufe der letzten Jahre wurde durch eine großangelegte deutschlandweite Studie, *Capnetz*, gezeigt, dass *S. pneumoniae* der wichtigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland ist.

Das erst kürzlich beschriebene Zytokin IL-23 konnte bereits mit mehreren immunologischen Mechanismen in Zusammenhang gebracht werden. IL-23 ist z. B. wichtig für die Regulation einer Th17-Antwort und im weiteren Verlauf für die Expression von IL-17 und IL-22. Es wurde beschrieben, dass IL-23 eine wichtige Funktion in der antibakteriellen Immunantwort auf verschiedene Infektionen spielt.

Die vorliegende Arbeit sollte die Frage beantworten, welche Funktion IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie der Maus innehat. Außerdem sollte in Zellkulturexperimenten *in vitro* untersucht werden, ob und wie IL-23 in der Pneumokokkeninfektion produziert wird.

### **3. Material und Methoden**

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen.

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Essays (z.B. ELISA; RNA Aufreinigung) werden hier nicht extra gelistet. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Bezugsquellen sind den entsprechenden Abschnitten in dem Kapitel Methoden zu entnehmen.

#### **3.1. Zellkultur**

Alle Zellkulturversuche wurden unter sterilen Bedingungen in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 und konform mit den Auflagen der Ethikkommission der Charité, Universitätsmedizin Berlin durchgeführt und an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen ausgeführt. Alle mit Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert.

Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

##### **3.1.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) und Kultur**

Die Isolation von PBMC erfolgte aus erythrozytendepletierten Blutkonserven des Deutschen Roten Kreuzes. Hierzu wurden die leukozytenreichen Blutkonserven mit EDTA Waschpuffer (RPMI + 5% FCS + 0,2 mM EDTA) im gleichen Volumenverhältnis gemischt und im Anschluss auf Ficoll aufgeschichtet. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation des Ficollgradienten bei 800g für 25 Minuten. Im Anschluss konnte der Leukozytenfilm (Buffy Coat) an der Grenzschicht mit einer Pipette abgenommen werden. Die gewonnenen Zellen wurden in den nächsten Schritten dreimal mit EDTA Waschpuffer gewaschen, d. h. in jeweils 30 ml EDTA Waschpuffer

resuspendiert und dann bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und in einer Neubauerkammer gezählt.

#### **3.1.1.1. Magnetische Aufreinigung von Monozyten**

Im Anschluss an die Isolation der PBMC über einen Ficollgradienten wurden die Zellen zur Erhöhung des Reinheitsgrades über eine magnetische Trennung nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec sortiert. Hierzu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD14 markiert und die CD14 positiven Zellen nach Herstellerangaben über ein MACS System isoliert. Dadurch konnte eine Reinheit von 97% CD14 positiver Monozyten erreicht werden.

#### **3.1.1.2. Differenzierung zu Makrophagen und Kultur**

Die CD14 positiven Monozyten wurden in PBS in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter aufgenommen, in Zellkulturschalen gegeben und für 2 Stunden im Zellkulturinkubator bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Im Anschluss wurden das PBS und die zu diesem Zeitpunkt nicht an der Zellkulturschale haftenden Zellen abgenommen. Die an der Zellkulturschale haftenden Zellen wurden mit Makrophagen-Medium (RPMI + 10% FCS + 4 mM L-Glutamin + 100µg/ml Penicillin Streptomycin) für 5 Tage kultiviert. In dieser Zeit entwickelten sich die Monozyten zu Makrophagen und konnten in den weiteren Versuchen verwendet werden.

#### **3.1.1.3. Differenzierung zu dendritischen Zellen und Kultur**

Die CD14 positiven Monozyten wurden in einer Konzentration von  $1,5-2 \times 10^6$  in DC-Medium (500ml RPMI, 10% FCS, 4 mM L-Glutamin, 100µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10mM HEPES) mit 750 U/ml GM-CSF und 200 U/ml IL-4 für 6 Tage kultiviert. In dieser Zeit wurde das Medium zweimal gewechselt. Zu Beginn der Kultur bedecken die Zellen den Boden der Zellkulturschale. Im weiteren Verlauf nach ca. 3 Tagen lösen sich die Zellen ab und treiben als Zellhaufen im Medium. Nach 6 Tagen liegt eine Zellkultur mit einer Reinheit von ca. 85% dendritischen Zellen vor. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass diese CD11c positiven Zellen nur geringe Mengen CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche tragen und daher unreifen dendritischen Zellen entsprechen.

#### **3.1.1.4. Isolation von naiven CD4<sup>+</sup> CD45ra<sup>+</sup> CD45ro<sup>-</sup> T-Zellen und Kultur**

Die Isolation von naiven T Zellen erfolgte mit dem *Naive T cell Isolation Kit* von Miltenyi Biotec. Dazu wurden PBMC zuerst mit magnetischen Antikörpern gegen CD4 positiv selektiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die negativ Selektion von CD45ro negativen Zellen indem CD4 positiven Zellen mit Antikörpern gegen CD45ro markiert wurden und nur die CD45ro negativen Zellen die nicht im Magneten hängen geblieben sind wurden verwendet. Auf diese Weise wurde eine Population von CD4<sup>+</sup> CD45ra<sup>+</sup> CD45ro<sup>-</sup> T Zellen isoliert, die in den weiteren Versuchen verwendet werden konnten.

#### **3.1.1.5. Kokulturmodell zur Aktivierung der naiven T Zellen durch aktivierte dendritische Zellen**

Die naiven T Zellen wurden direkt nach Isolation mit zuvor aktivierten dendritischen Zellen im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 (DC:TC) für 1 Woche in DC-Medium ohne Zytokine kultiviert. Auf diese Weise wurde die Situation im Lymphknoten simuliert, in dem die T-Zellen durch direkten Kontakt mit den dendritischen Zellen und durch die von den dendritischen Zellen sekretierten Zytokine geprägt werden und dadurch zu einem bestimmten T-Zell-Subtyp ausreifen.

#### **3.1.2. Isolation von primären murinen Knochenmarksstammzellen**

Murine Knochenmarksstammzellen wurden aus dem Knochenmark von nur zu diesem Zweck unter sterilen Bedingungen und unter Einhaltung der für Versuchstiere geltenden gesetzlichen Bestimmungen isoliert. Hierzu wurden Wildtyp- und Knockout-Mäuse durch Genickbruch getötet. Daraufhin wurden der Femur und der Humerus der Tiere isoliert und die Knochen in einem Mörser fein zerrieben. Das Zell- und Knochengemisch wurde dann in RPMI aufgenommen und durch ein 70µm Sieb gegeben, so dass die Knochenfragmente ausgesiebt wurden. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal in RPMI gewaschen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  pro Milliliter in FCS mit 10% DMSO in Flüssigstickstoff eingefroren bzw. direkt in Kultur genommen.

### **3.1.2.1. Differenzierung zu Makrophagen und Kultur**

Die isolierten Knochenmarksstammzellen wurden in Makrophagenwachstumsmedium (RPMI + 20% FCS + 30% L-Zell-Überstand + 1% Glutamin) in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 Millilitern aufgenommen und in 10 cm durchmessenden Optilux-Petrischalen aufgenommen. Nach 4 Tagen wurden dem Medium 10 Milliliter Makrophagenwachstumsmedium zugefügt. Nach einer Woche wurden die adhärennten Zellen mit zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit kaltem PBS von der Zellkulturplatte abgespült. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in der gewünschten Konzentration in Makrophagenstimulationsmedium (RPMI + 10% FCS + 15% L-Zell-Überstand) aufgenommen. Am nächsten Tag wurden die erneut adhärennten Zellen in den weiteren Versuchen verwendet.

### **3.1.2.2. Differenzierung zu dendritischen Zellen und Kultur**

Die isolierten Knochenmarksstammzellen wurden in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  in 10 ml DC-Wachstumsmedium (RPMI + L-Glutamine + 1 mM Natriumpyruvat + 0,05 mM 2-Mercaptoethanol + B-Zell Hybridoma Überstand auf 2% des Gesamtvolumen (ca. 5 ng/ml) ggbf. + Pen/Strep) aufgenommen und in 10 cm durchmessenden Optilux-Schalen ausgesetzt. An Tag 3 und 5 wurden jeweils 5 ml DC-Wachstumsmedium hinzugegeben. Nach 8 Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in DC-Stimulationsmedium (Wachstumsmedium ohne antimikrobielle Chemotherapeutika) aufgenommen und in der gewünschten Konzentration in Zellkulturschalen gegeben.

### **3.1.3. Isolation von murinen naiven Milz T Zellen und Kultur**

Die Isolation von murinen naiven T-Zellen erfolgte aus der Milz von Wildtypmäusen. Hierzu wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und die Milzen der Tiere präpariert. Im nächsten Schritt wurde die Milz mit dem Stempel einer 5ml Spritze durch ein 100  $\mu$ m Sieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde in RPMI gewaschen und erneut durch ein 70  $\mu$ m Sieb filtriert. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS wurden die Zellen mit einem FITC gekoppelten Antikörper gegen CD4 inkubiert und im Anschluss mit Hilfe des Anti-FITC Multisort-Kits nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec isoliert. Nach Entfernung der magnetischen Anti-FITC-Antikörper wurden die CD4+ Zellen mit magnetischen Antikörpern gegen CD62L inkubiert und erneut über eine magnetische Aufreinigung nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec isoliert. Dadurch

wurden naive CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Milz-T-Zellen aus der Maus gewonnen. Diese konnten im Anschluss direkt in den weiteren Experimenten verwendet werden.

#### **3.1.4. Kokulturmodell zur Aktivierung der naiven murinen T Zellen durch aktivierte murine dendritische Zellen**

Das Kokulturmodell mit murinen dendritischen Zellen und murinen T Zellen wurde analog zum Kokulturmodell mit humanen Zellen in zytokinfreiem Medium durchgeführt.

#### **3.1.5. M-CSF produzierende L929-Zellen**

Die Kultur von murinen Knochenmarksmakrophagen benötigt große Mengen von murinem M-CSF zur Ausdifferenzierung der Zellen. Wir verwendeten daher die Mausfibroblastenzelllinie L929 welche stabil M-CSF überexprimierten und in das Medium sekretierten. Diese Zellen wurden nach dem Auftauen in RPMI mit 10%FCS kultiviert und einmal passagiert. Wenn die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie für weitere 10 Tage kultiviert. Nach 10 Tagen wurde das Medium abgenommen und bei -80°C eingefroren um später als Zusatz für das Makrophagenmedium verwendet zu werden.

#### **3.1.6. GM-CSF produzierende B-Zell Hybridomalinie**

Die Kultur von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark benötigt große Mengen murinen GM-CSF zur Ausdifferenzierung der Zellen. Wir verwendeten daher eine B-Zelllinie die murines GM-CSF überexprimiert. Die Zelllinie erhielten wir von Prof. Dr. Carsten Kirschning (Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen).

Die Suspensionszellen wurden nach dem Auftauen in RPMI + L-Glutamin + 10% FCS + ggf. 1% Pen/Strep gezüchtet. Die Überstände wurden nach 4 Tagen abzentrifugiert und die Zellen erneut in Kultur genommen. Die GM-CSF haltigen Überstände wurden steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

### **3.2. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zur Messung intrazellulärer Zytokine und zur Messung der Oberflächenexpression von verschiedenen zelltypspezifischen Markern verwendet.

Die Messungen fanden auf einem FACScan bzw. einem FACS Canto der Firma BD Biosciences durchgeführt und mit Hilfe der Software FlowJo analysiert.

### **3.2.1. Messung von Oberflächenmarkern**

Die Präparation der Proben und das Färben der Oberflächenmolekülen wird in FACS-Puffer (PBS, 0.5% BSA) vorgenommen. Bei jedem Waschschrift werden die Zellen in einer Zentrifuge bei 200g zentrifugiert.

Eine Einzelzellsuspension wird zentrifugiert und das Pellet in FACS-Puffer aufgenommen. Der von vielen Zelltypen exprimierte Fc $\gamma$ -Rezeptor kann auch die konjugierten Antikörper binden und somit die Zellen unspezifisch anfärben. Um dies zu vermeiden werden die Zellen vor der eigentlichen Färbung mit ungekoppelten anti-Fc $\gamma$ -Rezeptor Antikörpern in 50  $\mu$ l FACS-Puffer für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Primärantikörper hinzugefügt. Die Antikörper werden in FACS-Puffer gemischt, wobei die Konzentration des eingesetzten Antikörpers zwischen 0,5 und 7,5  $\mu$ g/ml lag. Die Konzentration war abhängig von der Affinität und Färbeintensität des Antikörpers und wurde bei initialen Versuchen durch Konzentrationsreihen ausgetestet. Von dieser Mischung werden 10  $\mu$ l zu jeder Zellsuspension gegeben. Die Zellen werden wiederum bei 4°C für 15 min inkubiert und anschließend zwei Mal gewaschen. Das Pellet wird vor der eigentlichen durchflusszytometrischen Analyse in 500  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen.

### **3.2.2. Messung von intrazellulären Zytokinkonzentrationen**

Die durchflusszytometrische Messung von Zytokinen bietet den Vorteil, die zytokinproduzierende Zelle genau identifizieren zu können und aus einem Gesamtpool von Zellen messtechnisch zu isolieren.

Um intrazelluläre Zytokine zu färben, ist eine Hinzugabe der Antikörper zur Zellsuspensionen nicht ausreichend, da diese die Zellmembran nicht durchdringen könnten und somit die Zytokine nicht anfärben würden. Daher gehen der Färbung einige Schritte voraus.

Die Zytokinkonzentration in den einzelnen Zellen muss erhöht werden, um eine Messbarkeit zu erreichen. Dafür werden die Zellen stimuliert und der intrazelluläre Proteintransport wird gehemmt. Die Zellen werden nach Anfertigung einer Einzelzellsuspension in vitro mit dem polyklonal aktivierendem Phorbolster (PMA) und Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter suspendiert. PMA wurde in einer

Konzentration von 5 ng/ml, Ionomycin in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Die T-Zellen wurden mit diesen Substanzen bei 37 °C in einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 95% Luftfeuchtigkeit für 6 Stunden inkubiert. Um die intrazellulären Transportprozesse zu blockieren, wird nach 4 Stunden Brefeldin A in einer Konzentration von 5 µg/ml zugefügt. Nach dieser Zeit werden die Zellen geerntet, zentrifugiert und in PBS gewaschen. Anschließend folgt die Fixierung der Zellen. Die Zellen werden durch Zugabe von 2% Paraformaldehyd fixiert. Dafür werden die Zellen bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und im Anschluss zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen. Nach dieser Fixierung können die Zellen bei 4°C für Wochen gelagert werden, wurden in dieser Arbeit aber innerhalb der nächsten 48 Stunden analysiert. Alle Färbeschritte werden bei Raumtemperatur in Saponinpuffer (PBS, 0.5 % BSA, 0.5% Saponin) durchgeführt. Wie oben beschrieben werden die Fc-Rezeptoren durch Zugabe von anti-Fc-Rezeptor Antikörpern für 10 min blockiert. Danach werden die Zellen ohne Zentrifugation mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach 15 min werden die Zellen gewaschen. Nach diesem Schritt werden die Zellen zwei Mal in Saponin gewaschen und in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Jetzt kann eine durchflusszytometrische Analyse erfolgen.

### 3.3. Mikrobiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten. Alle mit Bakterien in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit Descosept (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert. Materialien, welche mit den Bakterien in Kontakt getreten waren und bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden im Anschluss autoklaviert.

*S. pneumoniae* Stämme wurden zur Anzucht in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % ohne Schütteln kultiviert.

#### 3.3.1. Verwendete *S. pneumoniae* Stämme

Bezeichnung		Mutation	Mögliche Bedeutung
<i>S. pneumoniae</i> D39 Serogruppe 2	Wildtyp		Bekapselt

<i>S. pneumoniae</i> D39 Serogruppe 2 (D39dCPS)	Deletionsmutante	Kapsel	Unbekapselt
<i>S. pneumoniae</i> D39 Serogruppe 2 (D39dPLY)	Deletionsmutante	PNEUMOLYSIN (PLY)	verbesserte Adhäsion, verminderte Zelltoxizität und inflammatorische Aktivierung
<i>S. pneumoniae</i> PN36 Serogruppe 3	Wildtyp		

### 3.3.2. Bakterienkultur

Alle Stimulationen der Zellen mit den verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämmen erfolgte aus einem jeweilig vorher angelegtem Bakterienstock.

Zur Gewinnung der Stöcke wurden die Pneumokokken auf Columbiaagar-Platten (supplementiert mit 5 % Schafblut), ausgestrichen (*D39dPLY* Columbiaagar mit 40 µl einer 1 mg/ml Erythromycinlösung zur Selektion versetzt) und bis zur Ausbildung deutlicher Kolonien inkubiert. Einzelstehende Kolonien wurden auf neue Columbiaagarplatten überführt und erneut inkubiert. Am folgenden Tag wurden alle gewachsenen Kolonien mit einem sterilen Watteträger in 1 ml Kryomedium enthaltende Kryoröhrchen eingebracht und bei -80 °C gelagert.

Einen Tag vor der Stimulation wurden die Pneumokokken auf Columbiaagarplatten, welche mit 5 % Schafblut versetzt sind, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Stimulationstag wurden einzeln stehende Kolonien in vorgewärmte Todd Hewitt-Boullion (mit 0,5 % Hefe supplementiert) überführt, so dass eine Pneumokokkenkonzentration zwischen 3 bis 6 x 10<sup>7</sup> cfu/ml als optimale Starterkonzentration eingestellt war. Die Konzentration wurde mittels eines Spektralphotometers bei einer optischen Dichte von 600 nm ermittelt (OD<sub>600</sub> 0,03 - 0,06 entspricht 3 - 6 x 10<sup>7</sup> cfu/ml). Die Pneumokokken wurden unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert, bis eine Konzentration von 2 - 4 x 10<sup>8</sup> cfu/ml (OD<sub>600</sub> 0,2 - 0,4) erreicht wurde. Bei dieser Konzentration befinden sich die Pneumokokken in einer mittleren logarithmischen Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen.

### 3.3.3. Infektionsversuche

Zur Stimulation der Zellen mit den Pneumokokken wurden diese in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1800 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet in dem der jeweiligen Zelllinie entsprechenden Stimulationsmedium so resuspendiert, dass eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  cfu/ml erreicht wurde. Die den Versuchen entsprechenden Konzentrationen wurden durch 1:10 Verdünnungsreihen im Stimulationsmedium eingestellt.

## 3.4. Nukleinsäureassays

### 3.4.1. RNA Aufreinigung

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und es erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Das Ablösen der Zellen wurde in Lysepuffer RLT (RNeasy®, Qiagen, Hilden) + 1%  $\beta$ - Mercaptoethanol mit einem Zellscraper durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte dann mit Hilfe des RNeasy®- Kits nach Angaben des Herstellers Qiagen. Die RNA wurde in 30-80 $\mu$ l Puffer eluiert und zur Konzentrationsbestimmung bei 260nm in einer Verdünnung von 1:100 im Spektralphotometer gemessen. Die entstandene Gesamt-RNA wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.2. Reverse Transkription

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellerprotokolls.

### 3.4.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Für die quantitative PCR wurde das 7300 Real Time PCR System genutzt. TaqMan® Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems für IL23A, IL17, IL22 und GAPDH wurden verwendet um die cDNA zu amplifizieren. Die mRNA-Expression jedes Gens wurde an die mRNA-Expression von GAPDH angeglichen. Jede Probe setzte sich folgendermaßen zusammen.

Reagenz	Menge der verwendeten Reagenzien pro Ansatz
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)	10 $\mu$ l

TaqMan® Gene Expression Assays-on-Demand (20 µM)	0,5µl
Nuklease-freies Wasser	4µl
cDNA (Probe)	5µl

### **3.5. Enzyme linked immunosorbent assay – Elisa**

Die Elisa wurden nach den Herstellerangaben der jeweiligen Kits durchgeführt. Der verwendete Zellüberstand wurde unverdünnt eingesetzt und für die Durchführung des Elisa aufgetaut.

### **3.6. *In vivo* Versuche – Mauspneumoniemodell**

Die Tierversuche wurden unter Aufsicht und mit Unterstützung durch Frau Dr. vet. med. Katrin Reppe aus der Medizinischen Klinik für Infektiologie und Pneumologie, AG Prof. M. Witzernath durchgeführt. Die Beschreibung der Methodik der Tierversuche erfolgte durch Frau Dr. vet. med. Katrin Reppe. Die Tierversuche wurden im Rahmen des Tierversuchsantrags Nr. G 0427/08 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) des Landes Berlin genehmigt und erfolgten in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorschriften zur Durchführung von Tierversuchen zum Zwecke der medizinischen Forschung und in Übereinstimmung mit den Vorschriften der Charité, Universitätsmedizin Berlin.

#### **3.6.1. Tierhaltung**

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden geschlossene Käfige mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) zur Tierhaltung verwendet, wobei den Tieren freier Zugang zu pelletiertem Futter und Wasser möglich war. Die tägliche Dauer der Beleuchtungsphase betrug 12 Stunden.

#### **3.6.2. Versuchstiere**

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens sind ausschließlich Mäuse aus Inzuchtstämmen verwendet worden. Es handelt sich dabei um C57Bl/6 WT und IL23p19-defiziente Mäuse, welche uns von Nico Ghilardi (Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990) zur Verfügung gestellt wurden [117]. Die weitere Zucht und Haltung der homozygoten

Tiere erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Universitätsmedizin Berlin.

Zur Durchführung der Versuche wurden weibliche Mäuse in einem Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht von 18-22 g verwendet.

### **3.6.3. Anzucht der Bakterien zur Infektion der Maus**

Der Arbeitsstock von *S. pneumoniae* wurde aus der  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Lagerung entnommen und durchgehend in einem gekühlten Transportgefäß belassen. Aus der weiterhin gefrorenen Bakteriensuspension wurden die Bakterien mit Hilfe einer Einweg-Plastiköse (1  $\mu\text{l}$ ) auf Columbia- Agarplatten mit 5 % Schafblut ausgestrichen und 9-10 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  bebrütet. Kurz vor Ende der Bebrütungszeit erfolgte die Herstellung des Anzuchtmediums aus 18 ml THY-Nährlösung und 2 ml steril filtriertem FCS. Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien unter Verwendung eines sterilen Wattestäbchens von den Agarplatten abgenommen und in 20 ml des angewärmten Anzuchtmediums bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,03-0,04 (bei einer Wellenlänge von 600 nm) suspendiert. Die Kokkensuspension wurde anschließend nochmals für etwa 2 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  bebrütet, bis eine OD von etwa 0,3 (Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *S. pneumoniae*) erreicht war. Nach Messung des Gesamtvolumens erfolgte die Zentrifugation der Suspension bei 3100 rpm für 10 min. Der überwiegende Teil des Überstandes wurde verworfen, das Zentrifugat resuspendiert und dessen Volumen bestimmt. Unter Berücksichtigung der nach 2 h Bebrütung gemessenen OD und dem Volumen des resuspendierten Zentrifugates wurde die Bakterienkonzentration der Suspension errechnet (eine OD von 0,1 entspricht hierbei einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^8$  CFU/ml). Anschließend wurde die Suspension zunächst bis zu einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^9$  CFU/ml (Stammlösung) und nachfolgend in mehreren Schritten bis zur gewünschten Infektionsdosis (Infektionslösung) mit PBS (phosphat buffered saline) verdünnt. Jede Maus erhielt 10  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Infektionslösung pro Nasenloch appliziert. Den Kontroll-infizierten Tieren wurden 10  $\mu\text{l}$  PBS pro Nasenloch verabreicht. Die Infektionslösung wurde zur Kontrolle der korrekten Verdünnung nochmals verdünnt und auf Columbia-Schafblutagar ausplattiert. Nach 24 h Bebrütung erfolgte die Auszählung der Kolonien.

### 3.6.4. Infektion der Tiere

Zur Infektion wurden die Tiere nach Bestimmung der Körpertemperatur und der Körpermasse mit einem Gemisch aus 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin i.p. narkotisiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung erhielten die Tiere Bepanthen Augen- und Nasensalbe in den Konjunktivalsack. Nach Kontrolle der korrekten Narkosetiefe wurden die Versuchstiere unter der Sterilbank in einer speziell angefertigten kastenartigen Haltevorrichtung an den oberen Schneidezähnen fixiert. Nun wurden jeder Maus 10 µl der Infektionslösung oder PBS pro Nasenloch intranasal mit einer 10µl-Pipette verabreicht. Im Anschluss wurden die Tiere zurück in den Käfig verbracht und während der Aufwachphase unter Rotlicht in einer ruhigen Umgebung regelmäßig überwacht.

### 3.6.5. Präparation der Tiere und Probenentnahme

Zum Zeitpunkt der Präparation wurde die Maus hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens beurteilt und sowohl Körpertemperatur als auch Körpermasse bestimmt. Anschließend wurden sie mit einem Gemisch aus 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin tief narkotisiert. Nach Kontrolle der Narkosetiefe erfolgte die Reinigung des Operationsfeldes mit Braunol®. Es erfolgte zervikal ein medianer Hautschnitt zur Darstellung der Trachea, welche kaudal des Larynx eröffnet wurde. Nachfolgend wurde die Trachealkanüle eingeführt und mittels einer Ligatur fixiert. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft bei Überdruck. Nach medianer Laparotomie bis zum Xyphoid und Anlegen von seitlichen Entlastungsschnitten wurde das Zwerchfell eröffnet und 50 µl Heparin (1:2 verdünnt mit NaCl 0,9 %) direkt in die rechte Herzkammer appliziert. Anschließend erfolgte, mit oder ohne vorheriger Blutentnahme durch Punktion der *Vena renalis sinister*, ein rasches Entbluten mit sofortigem Herz- / Kreislaufstillstand durch Eröffnen der *Vena cava caudalis*. Das Zwerchfell wurde vollständig von der Brustwand gelöst, der Brustkorb entlang des Brustbeines eröffnet und beide Thoraxhälften nach vorsichtiger Entfernung von Verklebungen und Verwachsungen der Pleura auf der Silikonunterlage seitlich fixiert. Nach Entfernung des Thymus wurde eine lockere Ligatur um die *Arteria pulmonalis* gelegt. Anschließend erfolgte die Eröffnung der linken Herzkammer durch Entfernen der Herzspitze und der rechten Herzkammer durch Inzision der Kammerwand. Die Pulmonalarterienkanüle wurde über die rechte Herzkammer in den *Truncus pulmonalis* vorgeschoben und mittels vorgelegter Ligatur fixiert. Blutreste im pulmonalen

Gefäßsystem wurden anschließend über die Pulmonalarterien mit sterilem auf 37 °C vorgewärmten NaCl 0,9 % aus der Lunge herausgespült.

### **3.6.6. Durchführung der Blutentnahme**

Die aseptische Blutentnahme erfolgte im Verlauf der beschriebenen Maus-Präparation durch Punktion der *Vena renalis sinister*.

### **3.6.7. Durchführung der Bronchoalveolären Lavage (BAL)**

Zur Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurde die Lunge nach Ende der Perfusion und Ventilation zweimal (BAL 1, BAL 2) mit 800 µl eiskaltem PBS, das Protease-Inhibitoren enthielt (1 Tablette Complete™ Mini gelöst in 10 ml PBS), vorsichtig und gleichmäßig gespült. Die gewonnene BAL-Flüssigkeit (BALF 1 und BALF 2) wurde nach Bestimmung des Gesamtvolumens in 5ml-Polypropylen Round-Bottom Tubes gegeben und unmittelbar weiterverarbeitet.

### **3.6.8. Entnahme der Lunge**

Die Entnahme der Lungen aus dem Thorax erfolgte grundsätzlich im Anschluss an die beschriebene Tierpräparation. Die Lunge wurde vorsichtig unter Schonung des Lungenparenchyms herauspräpariert, wobei der Lungenhilus mit den enthaltenen Lungenlymphknoten im Tier verblieb.

### **3.6.9. Differenzierung der Leukozyten in BAL und Blut**

Die Differenzierung der Leukozyten in der BALF und im Blut erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FACS Calibur der Firma Beckton Dickinson und BD CellQuest™ Pro (Version 4.0.2). Die BALF wurde direkt nach der Entnahme zentrifugiert (2200 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand der BALF 1 abpipettiert und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung (Zytokin-Assay) gelagert. Der Überstand der BALF 2 wurde verworfen. Die verbliebenen Zellpellets wurden anschließend gepoolt und in insgesamt 1 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl wurde die Neubauerzählkammer verwendet, welche mit 5 µl eines Gemisches aus 5 µl Zellsuspension und 5 µl Methylenblau befüllt wurde. Nach Auszählung von 4 Großquadraten zu je 16 Kleinquadraten erfolgte die Bestimmung der mittleren Leukozytenzahl pro Großquadrat nach der Formel: [Leukozytenzahl in 4 Großquadraten / 4].

Anschließend wurde die Gesamtleukozytenzahl der entnommenen BALF (Gesamtvolumen BALF1 + BALF 2) unter Verwendung der Berechnungsformel [(mittlere Leukozytenzahl pro Großquadrat) x 2 x 10 000] ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von ca. 4 ml aufgefüllt und bei 4 °C und einer Drehzahl von 1500 rpm über 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, die Probe aufgerüttelt und mit 2 µl Fc-Block (0,5 mg/ml, ausreichend für 1 x 10<sup>6</sup> Zellen) für 10 min bei 4 °C inkubiert, um die unspezifischen Immunglobulinrezeptoren zu blockieren. In ein Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml) wurden zunächst 3 µl (pro 300 000 Zellen) folgender fluoreszenzmarkierter Antikörper vorgelegt: CD 45 PerCP-konjugiert, GR-1 PE-konjugiert und F4-80 APC-konjugiert. Anschließend wurde die gesamte Probe auf die vorgelegten Antikörper pipettiert, gründlich aufgerüttelt und im Dunkeln bei 4 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden 500 µl FACS™ Lysing Solution (1X) zur Probe hinzugefügt und für 10 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert, um durch das enthaltene Formaldehyd die Bindung der Antikörper an die Zellen zu fixieren. Das Tube wurde im Anschluss mit „Cellwash“ auf ein Volumen von ca. 4 ml aufgefüllt und die Zellsuspension erneut bei 4 °C und einer Drehzahl von 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand verworfen, die Probe mit 1 ml „Cellwash“ aufgefüllt und gründlich geschüttelt. Die Analyse der Zellsuspension erfolgte mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur der Firma Becton Dickinson anhand der Daten zur Lichtstreuung/Lichtbrechung und des durch die verwendeten Antikörper entstandenen Färbemusters. Es wurden die Gesamtleukozytenzahl in der BALF und die Fraktion der Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN, polymorphonuclear neutrophils) und Lymphozyten bestimmt. Anhand der Gesamtleukozytenzahl, des Gesamtvolumens der entnommenen BALF und der prozentualen Anteile der drei Leukozytenpopulationen erfolgte die Bestimmung der absoluten Zahl der Leukozyten, sowie der Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bezogen auf 1 ml BALF.

Von der gewonnenen Vollblutprobe (bereits mit Heparin versetzt) wurden direkt nach Entnahme 60 µl in ein EDTA-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur belassen. Auf die Ecken des im BD TruCount™ Tubes enthaltenen Siebes wurden 5 µl folgender Antikörper vorgelegt: CD45 PerCP und GR-1 PE. Anschließend wurden 50 µl des antikoagulierten Vollblutes hinzugefügt und die Probe gründlich gerüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 450 µl FACS™ Lysing Solution (1X) hinzugefügt und nochmals 10 min bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der Lyse-Puffer bewirkte hierbei die Lyse der Erythrozyten und diente zur Fixierung der Antikörperbindung an die Zellen. Anschließend wurde die Probe gründlich gerüttelt und in ein Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml) überführt. Die Analyse der Zellsuspension erfolgte mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur der Firma Becton Dickinson anhand der Daten zur Lichtstreuung/Lichtbrechung und des durch die verwendeten Antikörper entstandenen Färbemusters. Es wurden die Gesamtleukozytenzahl sowie die Fraktionen von Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Lymphozyten bezogen auf 1  $\mu$ l Vollblut ermittelt.

### **3.6.10. Quantifizierung der Zytokine in der BAL**

Die Quantifizierung der Zytokine in der BALF wurde unter Anwendung der Multiplex Suspension Array Technologie der Firma Biorad durchgeführt. Dafür wurde ein Bio-Plex™ Mouse 8-Plex Cytokine Assay (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, GM-CSF, IL-10, RANTES (CCL5), KC, MCP-1) der Firma BD verwendet. Direkt nach ihrer Gewinnung wurden die BALF 1 und BALF 2 zentrifugiert (2200 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand der BALF 1 entnommen und in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß bei -80 °C bis zur Verwendung im Zytokin-Assay gelagert. Zur Durchführung des Bio-Plex™ Mouse Multi-Plex Cytokine Assay wurden die BALF Proben (BALF 1 Überstand) auf Eis aufgetaut. Der Zytokinstandard wurde ebenfalls auf Eis mit 500  $\mu$ l Probenmedium gelöst (500 ng/ml), gründlich gerüttelt und 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Durchführung des Assays nach Herstellerangaben. Die Messung der Proben erfolgte im Bio-Plex Array Reader.

### **3.6.11. Isolierung der RNA aus Mauslungen**

Die nicht-lavagierte Lunge wurde in 1 ml Trizol unter Verwendung des Ultra-Turrax T 8 homogenisiert und bei -80 °C bis zur Isolierung der RNA gelagert. Nach Auftauen der Lungenhomogenate wurden die Proben für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform. Die Proben wurden 15 sec gerüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt, 500  $\mu$ l 2-Propanol hinzugefügt, die Probe gründlich gerüttelt und zentrifugiert (20 min, 12000 rpm, 4 °C). Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde

verworfen, das RNA-Pellet in jeweils 100 µl TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) resuspendiert und in der RT-PCR eingesetzt.

### **3.6.12. Untersuchung des klinischen Verlaufs der Pneumokokkenpneumonie**

Die vorbehandelten Tiere wurden im Anschluss an die Infektion für eine Dauer von 10 Tagen überwacht. Während des Versuchszeitraumes wurde das Allgemeinbefinden und der klinische Zustand der Tiere beobachtet und dokumentiert. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse. War die Erkrankung bei einem Tier soweit fortgeschritten, dass kurzfristig mit einem letalen Verlauf gerechnet werden musste und sein Leiden ein ethisch vertretbares Maß überschritt, erfolgte die Euthanasie dieses Tieres (zervikale Dislokation nach Ketamin/Xylazin-Narkose). Hierfür wurden folgende Handlungsanweisungen, modifiziert nach den „Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ (Stand 21.01.1997), zugrunde gelegt:

Tier isoliert sich	a
struppiges Fell	a
verstärkte Atmung	a
Tier vermeidet Bewegungen	a
Teilnahmslosigkeit	a
Schmerz beim Anfassen	b
Krämpfe, Torkeln, Apathie	b
Schmerz (Gesichtsausdruck, gekrümmte Haltung, Laufen auf Zehenspitzen)	b
Blässe (Augen, Ohren)	b
Atemnot	c
Bauch hart und gespannt	c
Hautfalten bleiben stehen	c
Abnahme von mehr als 20% des Körpergewichtes	c

**Tabelle 2**

Anweisungen:

a - Tier weiter beobachten

b - in Kombination mit Keuchen, Schmerzen oder Blässe Tier einschläfern

c - Tier einschläfern

Nach 10-tägiger Beobachtungsfrist wurden alle überlebenden Tiere mittels letaler intraperitonealer Ketamin/Xylazin Injektion euthanasiert.

### **3.6.13. Bestimmung der Bakterienlast in Blut und Lunge**

Die entnommene Lunge wurde direkt in einem Medikamentenbecher, gefüllt mit 1 ml PBS, unter Verwendung einer geraden Präparierschere zerkleinert und in ein BD Falcon™ Zellsieb (100 µm), welches auf ein 50ml-Falcon aufgesetzt wurde, gegeben. Der Medikamentenbecher wurde nochmals mit PBS gespült bis keine Gewebereste mehr enthalten waren. Mit Hilfe eines 2ml-Spritzenkonus wurde die Lunge durch das Zellsieb gedrückt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Anschließend wurde das BD Falcon™ Zellsieb (100 µm) in mehreren Zwischenschritten mit PBS gespült, bis nur noch Bindegewebe zurückblieb. Die Organsuspension wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und gründlich gerüttelt. Je 10 µl der Organsuspension wurden pur sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf vorgewärmten Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Anschließend erfolgte die Auszählung der CFU und die Berechnung der Bakterienlast der Lunge unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe und der eingesetzten Probenmenge von 10 µl.

Je 5 µl Blut wurden pur sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf vorgewärmten Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Anschließend erfolgten die Auszählung der CFU und die Berechnung der Bakterienlast im Blut unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe und der eingesetzten Probenmenge von 5 µl.

### **3.6.14. Bestimmung der Lymphozytenpopulationen aus Lunge und BAL**

Die blutleer perfundierte Lunge wurde wie oben beschrieben präpariert und im Anschluss mit einer Präparierschere in PBS zerkleinert. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer in 5 ml RPMI + 150 µg DNase und 0,7 mg Kollagenase aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C im

Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension durch ein 70µM Zellsieb mit 40 ml RPMI + 1,2 mg DNase gespült. Die Zellen wurden bei 200g für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet im Anschluss in PBS aufgenommen. Die Zellen der BALF wurden äquivalent zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden in der Neubauerkammer gezählt und äquivalent zu den Zellen der Zellkultur zur Messung der intrazellulären Zytokine mit Ionomycin und PMA restimuliert, die Zytokinsekretion mit Brefeldin A gehemmt und im Anschluss für die Messung im Durchflusszytometer gefärbt.

### 3.7. Statistik

Alle gezeigten Versuche wurden mehrfach (mindestens dreimal) erfolgreich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des „One way ANOVA“ und dem Newmann Keuls post Test sowie dem Students T Test. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ( $p < 0,05$ ) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Zur Erstellung der Balkendiagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde die Software PRISM (Graph Pad Prism ®) verwendet.

### 3.8. Materialien, Reagenzien, Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte waren für den Laborgebrauch hergestellt.

#### 3.8.1. Plastikwaren, Zellkulturschalen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen verschiedenster Ausführungen wurden alle bei Falcon und Corning bezogen. Die Reaktionsgefäße stammten ebenfalls von Falcon oder Eppendorf. Die 96- Lochplatten für die qPCR waren von Applied Biosystems.

#### 3.8.2. Medien

Alle Medien wurden für die Infektionsversuche ohne Penicillin/ Streptomycin verwendet.

Medium für humane DC		
RPMI		PAA
FCS	10 %	PAA

IL-4	200 U/ml	Immunotools
GM-CSF	750 U/mL	Immunotools
Hepes	10 mM	Gibco
L-Glutamin	4 mM	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	100 µl	PAA

Medium für murine DC	Wachstumsmedium	
RPMI		PAA
2-Mercaptoethanol	0,05 mM	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat	1 mM	PAA
L-Glutamin	1 %	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	100 µl	PAA
B-Zell Hybridoma Überstand	2 %	
	Stimulationsmedium	
RPMI		PAA
2-Mercaptoethanol	0,05 mM	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat	1 mM	PAA
L-Glutamin	1 %	Gibco

Medium für humane Makrophagen		
RPMI		PAA
FCS	10 %	PAA
L-Glutamin	4 mM	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	100 µl	PAA

Medium für murine Makrophagen	Wachstumsmedium	
RPMI		PAA
FCS	20 %	PAA
L-Zell Überstand	30 %	
L-Glutamin	1 %	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	100 µl	PAA
	Stimulationsmedium	
RPMI		PAA
FCS	10 %	PAA
L-Zell Überstand	15 %	
L-Glutamin	1 %	Gibco

Medium L929-Zellen		
RPMI		PAA

FCS	10 %	PAA
-----	------	-----

Medium B-Zell Hybridoma		
RPMI		PAA
FCS	10 %	PAA
L-Glutamin	1%	PAA

### 3.8.3. Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation wurde mit Kits und Magneten der Firma Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei kamen die folgenden Kits zum Einsatz:

Human CD4 MultiSort Kit mit human CD45Ro Microbeads

Human CD14 Kit

FITC MultiSort Kit mit Rat anti Maus CD4 FITC und Maus CD62L Microbeads

### 3.8.4. Antikörper

In der Durchflusszytometrie wurden mit FITC, PE und APC fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet.

Maus Anti - human CD3 Klon MEM-57	Immunotools
Maus Anti - human CD4 Klon OKT-4	eBioscience
Maus Anti - human CD11c Klon BU15	Immunotools
Maus Anti - human CD80 Klon MEM-233	Immunotools
Maus Anti - human CD86	BD Pharmingen
Maus Anti - human CD25	BD Pharmingen
Maus Anti - human IL-17A Klon eBio64CAP17	eBioscience
Maus Anti - human IFNgamma Klon 4S.B3	eBioscience
Maus Anti - human CD45RA 4G11	Deutsches Rheumaforschungszentrum
Ratte Anti - Maus CD3 Klon 145-2C11	BD Pharmingen
Ratte Anti - Maus CD4 Klon GK 1.5	Deutsches Rheumaforschungszentrum
Ratte Anti - Maus IL-17A Klon eBioTC11- 18H10.1	eBioscience
Ratte Anti - Maus IFNgamma Klon XMG1.2	eBioscience

Ratte Anti - Maus CD16/CD32 Klon 2.4G2	BD Pharmingen
Ratte Anti - Maus/ human IL-22 Klon IL22JOP	eBioscience
Ratte Anti - Maus CD45 Klon 30-F11	BD Pharmingen
Ratte Anti - Maus GR-1 Klon RB6-8C5	BD Pharmingen
Ratte Anti - Maus F4/80 Klon 6F12	BD Pharmingen

### **3.8.5. Nukleinsäureassays**

#### **RNA Isolation:**

PerfectPure RNA Kit der Firma 5-Prime

Trizol der Firma Invitrogen

#### **Reverse Transkription:**

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems

#### **Quantitative PCR:**

TaqMan Universal PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems

TaqMan Assays gegen humane und murine GAPDH, IL23p19 der Firma Applied Biosystems

### **3.8.6. Elisa**

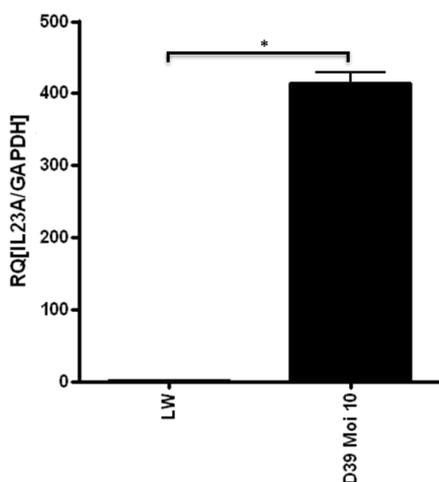
Elisakits gegen humane und murine IL-23 und IL-17 der Firma eBioscience

Maus Bio-plex Multi-Plex Cytokine Kit der Firma Biorad

## 4. Ergebnisse

### 4.1. *Streptococcus pneumoniae* induziert die Expression von IL-23 in humanen dendritischen Zellen

Das zur IL-12 Familie gehörende Zytokin IL-23 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zellantwort. Es sollte daher untersucht werden, ob die Infektion von humanen dendritischen Zellen mit *S. pneumoniae* zu einer Induktion von IL-23 führt. Primäre humane dendritische Zellen wurden für 24 Stunden mit einer multiplicity of infection (MOI) 10 von *S. pneumoniae* Stamm D39 infiziert. Das heißt, dass rechnerisch jede Zelle mit 10 Bakterien infiziert wurde. Im Anschluss wurde die Expression von IL23p19 (=IL23A) in der qPCR bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression von IL23A durch die Infektion mit *S. pneumoniae* (Abb. 3).

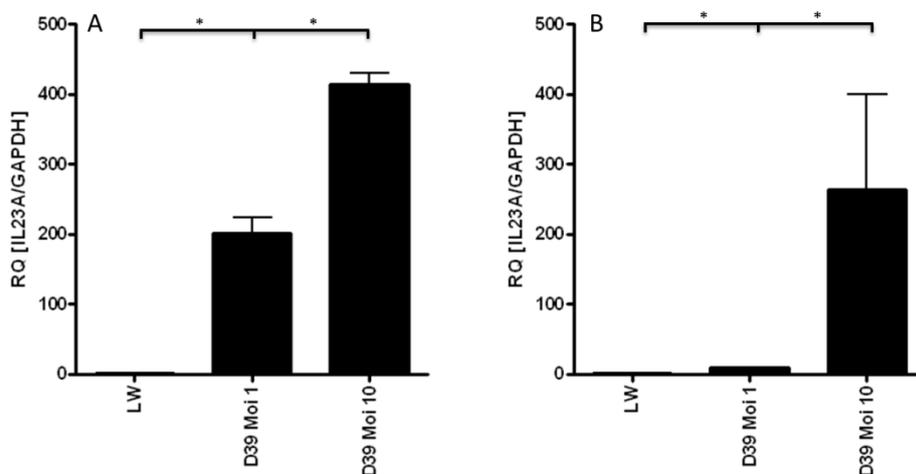


**Abbildung 3** *S. pneumoniae* induziert IL-23A in primären humanen dendritischen Zellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* Stamm D39 für 24 Stunden, Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten. n=4

### 4.2. *Streptococcus pneumoniae* induziert die Expression von IL23A in humanen Makrophagen und dendritischen Zellen

Aufgrund der deutlichen Zunahme der Expression von IL23A durch die Infektion mit *S. pneumoniae* in dendritischen Zellen sollte die Regulation der Expression von IL23A weiter untersucht werden. Dafür wurden zunächst primäre humane dendritische Zellen und primäre humane Makrophagen mit *S. pneumoniae* Stamm D39 für 24 Stunden in einer MOI 1 und 10 infiziert. Im Anschluss wurde die relative Expression von IL23A mRNA in der quantitativen

RT-PCR bestimmt. Es bestand sowohl in primären humanen dendritischen Zellen als auch in primären humanen Makrophagen eine Dosisabhängigkeit in der Induktion von IL-23A nach Infektion mit *S. pneumoniae* (Abb. 4). Die hier dargestellten Daten zeigen die Expression von IL23A in primären humanen dendritischen Zellen und Makrophagen, die aus Blutproben derselben Spender isoliert und ausdifferenziert wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Bei primären humanen Zellen von unterschiedlichen Spendern ist immer von einer größeren Varianz der Ergebnisse auszugehen, da größere genetische Unterschiede bestehen.

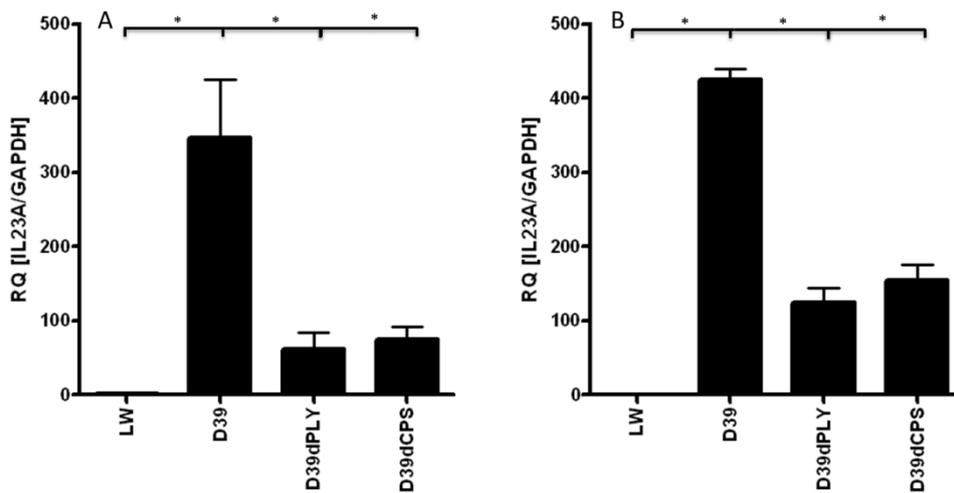


**Abbildung 4** *S. pneumoniae* Stamm D39 induziert IL-23 mRNA in primären humanen dendritischen Zellen (A) und primären humanen Makrophagen (B). Acht unabhängige Experimente mit MOI 10 und vier unabhängige Experimente mit MOI 1.

### 4.3. Die Expression von IL23A ist abhängig von bakteriellen Pathogenitätsfaktoren

*S. pneumoniae* besitzt zahlreiche Faktoren, die sein Überleben sowie die erfolgreiche Vermehrung im Wirt erlauben sollen. Hierbei kommt insbesondere der Kapsel und dem Exotoxin Pneumolysin eine wichtige Rolle zu. Um den Einfluss der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* auf die Expression von IL-23 zu untersuchen, wurden daher primäre humane dendritische Zellen und primäre humane Makrophagen mit *S. pneumoniae* infiziert. Weiterhin wurden die Zellen mit einer Deletionsmutante, die nicht in der Lage ist, Pneumolysin zu bilden (D39dPLY) und einer kapsellosen Mutante, die kein Kapselpolysaccharid bildet (D39dCPS), in einer MOI 10 für 24 Stunden infiziert. Im Anschluss

wurde erneut eine qRT-PCR durchgeführt um die Expression von IL-23 in den dendritischen Zellen und den Makrophagen zu messen. Die Expression von IL-23 mRNA war sowohl in dendritischen Zellen als auch in Makrophagen bei Infektion mit den Mutanten signifikant verringert im Vergleich zur Infektion mit den Wildtyp Pneumokokken (Abb. 5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erkennung von Pneumolysin und Bestandteilen der bakteriellen Kapsel die Expression von IL-23 beeinflusst.

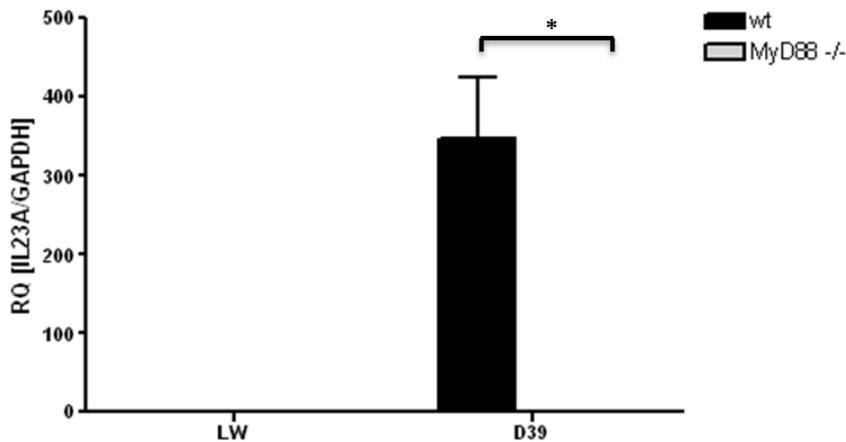


**Abbildung 5** Die Expression von IL-23 mRNA in primären humanen dendritischen Zellen (A) und primären humanen Makrophagen (B) ist abhängig von bakteriellen Pathogenitätsfaktoren. Das Fehlen der bakterielle Expression von Pneumolysin (D39dPLY) oder der bakteriellen Kapsel (D39dCPS) führt zu einer signifikanten Verminderung der Expression von IL-23 mRNA. Vier unabhängige Experimente.

#### **4.4. *Streptococcus pneumoniae* induziert die Expression von IL23A in murinen Makrophagen in Abhängigkeit von MyD88**

Es ist bekannt, dass Pneumokokken durch das TLR-System der angeborenen Immunantwort erkannt werden und dass dadurch eine inflammatorische Signalkaskade induziert wird. Es wurden daher Wildtyp-Knochenmarksmakrophagen aus C57Bl/6-Mäusen und Knochenmarksmakrophagen aus MyD88-defizienten Mäusen auf demselben genetischen Hintergrund mit einer MOI 10 von *S. pneumoniae* Stamm D39 für 24 Stunden infiziert. Im Anschluss wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Expression von IL-23 quantifiziert. Im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen war die Expression von IL-23-mRNA in den MyD88-defizienten Zellen massiv inhibiert und konnte mit Hilfe der qPCR nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.

6). Somit muss von einer zentralen Rolle der MyD88 abhängigen TLRs in der Induktion der IL-23 Expression nach Pneumokokkeninfektion von murinen Makrophagen ausgegangen werden.

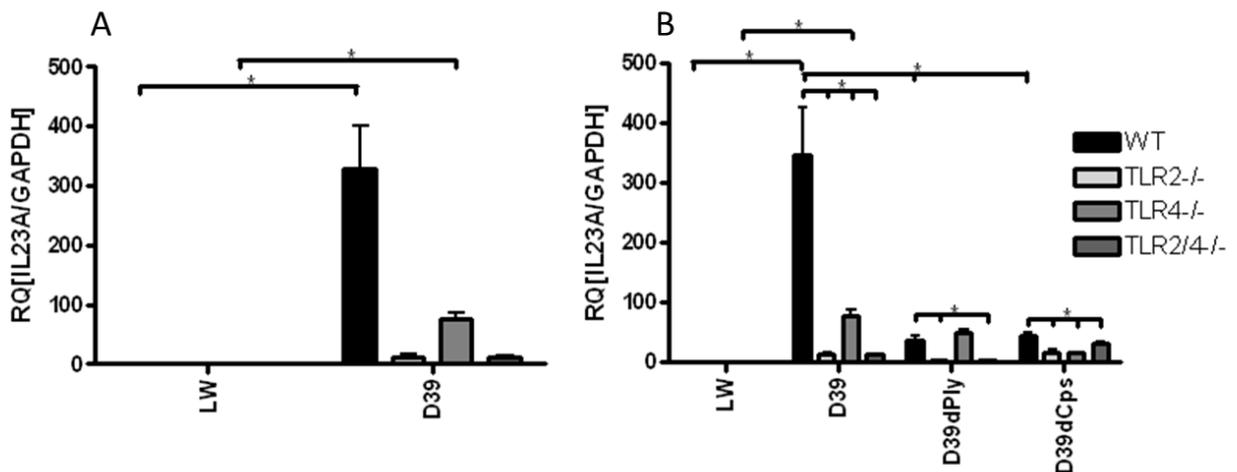


**Abbildung 6** *S. pneumoniae* Stamm D39 induziert IL-23-mRNA in primären murinen Knochenmarksmakrophagen in Abhängigkeit von MyD88. Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.5. Die Expression von IL-23 ist abhängig von TLR-2 und TLR-4

Aufgrund der beobachteten Ergebnisse aus den Versuchen mit den MyD88 defizienten Makrophagen sollten nun die oberhalb von MyD88 lokalisierten Rezeptoren gefunden werden, welche die Induktion der IL23A-mRNA in *S. pneumoniae*-infizierten Zellen vermitteln. In der Vergangenheit konnte bereits eine Rolle von TLR-2 und TLR-4 in der Erkennung von *S. pneumoniae* und für die Induktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine gezeigt werden [118, 119]. Sowohl Pneumolysin als auch die Kapselbestandteile von *S. pneumoniae* scheinen eine Rolle in der Induktion der Expression von IL23A zu spielen (siehe Abb. 5). Im Folgenden wurden TLR-2, TLR-4 und TLR-2/-4 defiziente murine Knochenmarksmakrophagen mit Pneumokokken infiziert und die Expression von IL-23-mRNA mittels qRT-PCR gemessen. Die Expression von IL-23 in Wildtypmakrophagen war wieder stark abhängig von der bakteriellen Expression von Kapselbestandteilen und dem Zytolysin Pneumolysin. (Abb. 7B) Es zeigte sich außerdem eine verminderte bzw. aufgehobene Expression von IL-23 in den TLR-2, TLR-4 und TLR-2/-4-defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen im Vergleich zu infizierten WT-Zellen nach Pneumokokkeninfektion (Abb. 7A). Hierbei war die Rolle von TLR-2 deutlich ausgeprägter als die von TLR-4, jedoch war auch die Reduktion der Expression von IL-23 in

TLR-4<sup>-/-</sup> BMM signifikant. Eine zusätzliche Reduktion der Expression von IL23A durch den Doppelknockout von TLR-2 und TLR-4 war nicht zu beobachten.

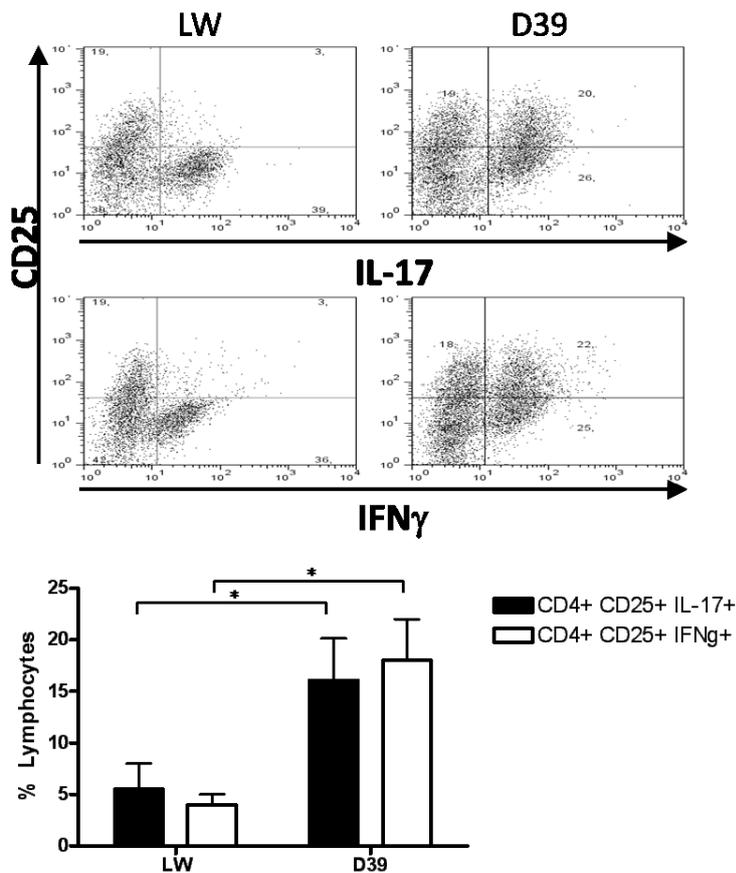


**Abbildung 7** Die Expression von IL-23 mRNA ist abhängig von TLR-2 und TLR-4 sowie von Pneumolysin und den Kapselpolysacchariden. Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.6. Mit *S. pneumoniae* infizierte dendritische Zellen induzieren Th17-Zellen

Es konnte bisher gezeigt werden, dass die Expression von IL23A in humanen und murinen antigenpräsentierenden Zellen abhängig ist von der Expression von TLR-2 und -4 sowie des Adaptormoleküls MyD88. Es sollte nun untersucht werden, welche funktionelle Rolle die Expression von IL-23 im Rahmen einer bakteriellen Infektion mit *S. pneumoniae* spielt. Das Zytokin IL-23 nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation von T-Zellen ein. So konnte in der Vergangenheit die Wichtigkeit von IL-23 für die Regulation und Induktion von IL-17 produzierenden T-Zellen, den so genannten Th17-Zellen gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob die Infektion mit Pneumokokken zu einer Induktion von Th17-Zellen führt, wurden humane primäre naive dendritische Zellen mit einer MOI 10 des Pneumokokkenstammes D39 infiziert und nach einer Stunde mit Gentamycin behandelt, um eine weitere Vermehrung der Pneumokokken im Verlauf des Versuchs zu verhindern. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit naiven frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und nach einer Woche der Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im FACS gemessen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Induktion von IL-17<sup>+</sup> aktivierten T-Zellen (Abb. 8). Als Aktivierungsmarker wurde CD25 bestimmt. Der Anteil der

IL-17<sup>+</sup> Lymphozyten entspricht annähernd dem der IFN $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen in diesem Kokulturmodell.

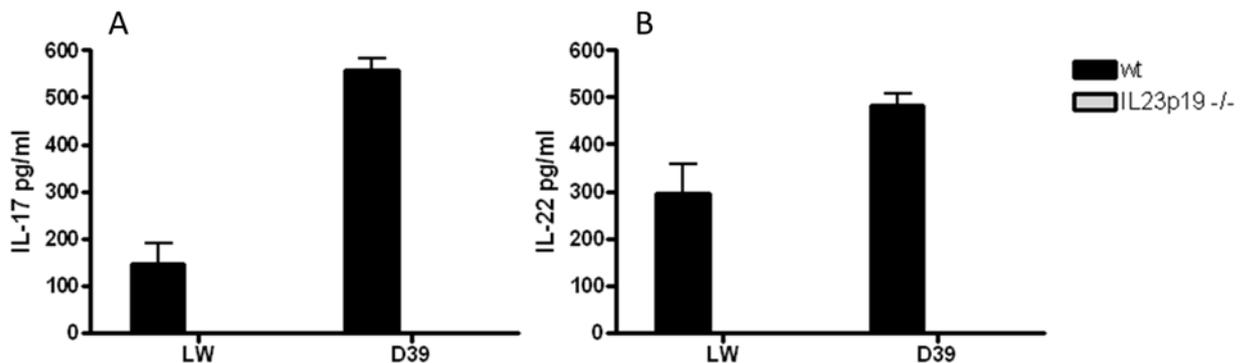


**Abbildung 8** Pneumokokken (D39) induzieren eine Th1- und Th17-Antwort in einem Kokulturmodell mit primären dendritischen Zellen und T-Zellen. Repräsentative Abbildung aus drei unabhängigen Experimenten, Mittelwerte. n=3

#### 4.7. Die Bildung von IL-17 und IL-22 in murinen T-Zellen scheint abhängig zu sein von IL-23 nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Analog zu den humanen Kokulturversuchen wurden primäre dendritische Zellen aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen und IL-23-defizienten Mäusen mit Pneumokokken in einer MOI 10 infiziert. Am folgenden Tag wurden naive T-Zellen aus der Milz von Wildtypmäusen isoliert und mit den dendritischen Zellen für 7 Tage kokultiviert und im Anschluss die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberstand im ELISA gemessen. In einem vorläufigen, bisher nicht wiederholten Versuch zeigte sich, dass die Produktion von IL-17 und IL-22 in der DC-T-

Zell-Kokultur nach Pneumokokkeninfektion abhängig war von der Expression von IL-23 in den DCs (Abb. 9). Aufgrund von technischen Problemen war eine Wiederholung des Versuchs und eine Messung der Zellen im FACS in der Folge nicht möglich. Somit bedürfen die Ergebnisse dieses Versuches der weiteren Bestätigung bevor eindeutige Schlüsse daraus gezogen werden können.

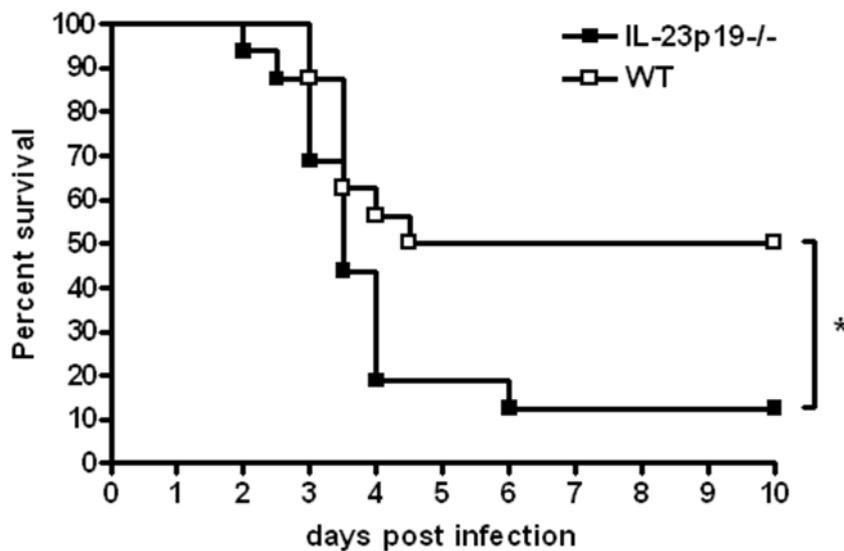


**Abbildung 9** Primäre murine dendritische Zellen induzieren die Bildung von IL-17 und IL-22 aus primären murinen naiven Milz-T-Zellen nach einer Woche Kokultur in Abhängigkeit von IL-23. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Versuchs der bisher nicht wiederholt werden konnte. Die Zellen entstammen aus 3 Tieren und wurden in 6 parallelen Kokulturen untersucht.

#### 4.8. IL-23 ist wichtig für das Überleben einer Pneumokokkenpneumonie

Es konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* nach Infektion von dendritischen Zellen und Makrophagen in der Lage ist, IL-23 zu bilden und dass diese dendritischen Zellen in der Folge naive T-Zellen zur Bildung von IL-17 anregen. Es stellte sich daher die Frage nach der Bedeutung von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie. Um diese Frage zu beantworten wurden IL-23 defiziente Mäuse vom Stamm C57Bl/6 in einem bereits gut etabliertem und publizierten Mauspneumoniemodell untersucht. Hierbei wurden C57Bl/6-Wildtypmäuse und IL-23-defiziente C57Bl/6-Mäuse mit Pneumokokken intranasal infiziert und der klinische Verlauf sowie die Sterblichkeit der Tiere beobachtet. Dabei konnte eine deutlich erhöhte Mortalität der IL-23-defizienten Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren beobachtet werden (Abb. 10). Die intranasale Infektion von C57Bl/6 Mäusen mit *S. pneumoniae* führt zur Ausbildung einer schweren Pneumonie [120]. Die Infektionsdosis war so gewählt worden, dass 50% der

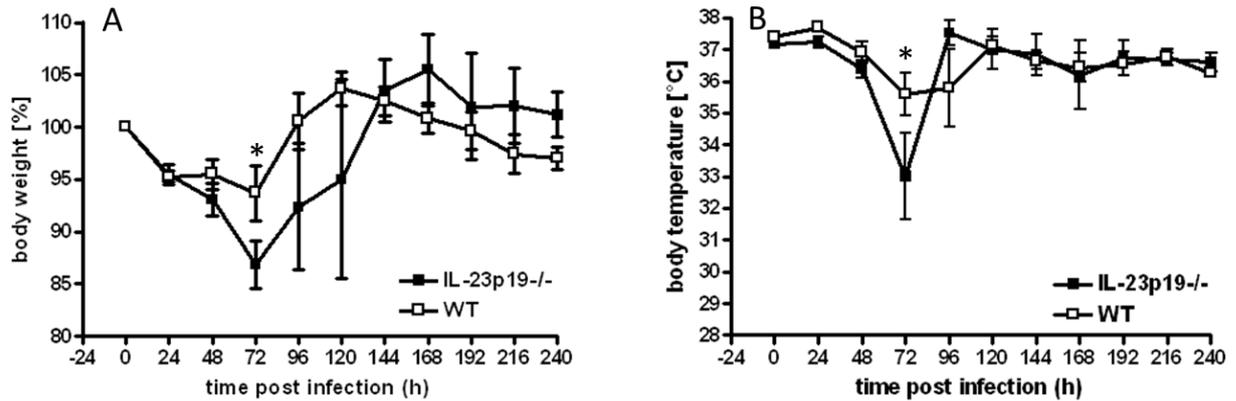
Wildtypiere an ihr versterben werden. Es konnte gezeigt werden, dass IL-23 defiziente Mäuse eine mit 90% deutlich höhere Mortalität nach der Pneumokokkeninfektion aufweisen.



**Abbildung 10** Wildtypiere haben einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber IL-23-defizienten Mäusen nach intranasaler Infektion mit *S. pneumoniae* (n=16), Kaplan Meier Kurve.

#### **4.9. IL-23-defiziente Mäuse und Wildtypmäuse haben einen ähnlichen Krankheitsverlauf**

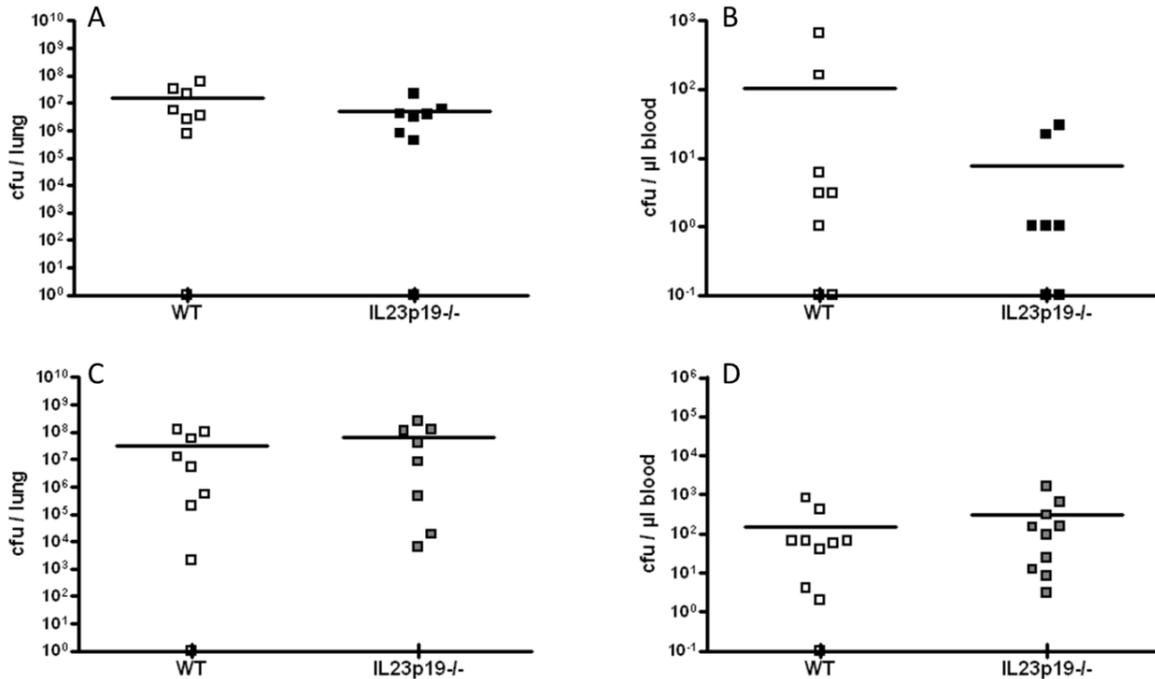
Im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie wurden zweimal täglich die Körpertemperatur und das Körpergewicht der Tiere bestimmt sowie das klinische Erscheinungsbild der Tiere beurteilt. Über den Verlauf der Erkrankung bis zum Tod der Tiere oder dem Ende der Untersuchung nach 10 Tagen war kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung des Körpergewichts und der Körpertemperatur zwischen den infizierten Wildtypmäusen und den IL-23-defizienten Mäusen zu beobachten. Lediglich nach 72 Stunden konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in beiden klinischen Parametern beobachtet werden, der sich im weiteren Verlauf jedoch erneut anglich. Bei den IL-23-defizienten Mäusen lag zu diesem Zeitpunkt sowohl die Körpertemperatur als auch das Körpergewicht deutlich unter dem der Wildtyp-C57Bl/6-Mäuse. Dies korrelierte mit dem klinischen Erscheinungsbild der Mäuse. Die IL-23-defizienten Tiere zeigten ein ausgeprägteres Krankheitsbild nach 72 Stunden mit allen Zeichen einer schweren Infektion mit struppigem Haar, gekrümmter Körperhaltung sowie Isolation von den anderen Tieren im Käfig, als die Wildtypmäuse (Abb. 11).



**Abbildung 11** Das Körpergewicht (A) sowie die Körpertemperatur (B) der infizierten Tiere unterschied sich im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie nicht. Lediglich nach 72 Stunden konnte ein signifikanter Unterschied in beiden klinischen Parametern beobachtet werden. n = 16

#### 4.10. IL-23 hat keinen Einfluss auf die Bakterienlast während der Pneumokokkenpneumonie der Maus

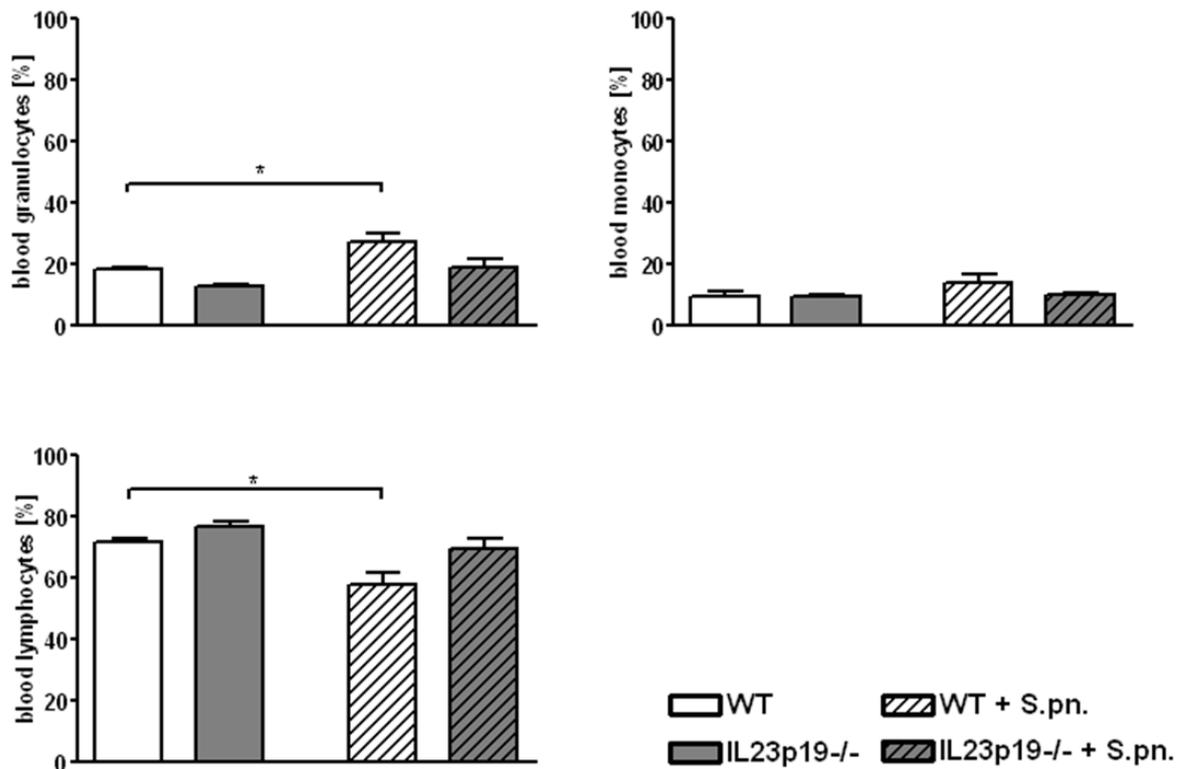
Um die Ursache für den Mortalitätsunterschied zwischen den Wildtyp-C57Bl/6 und den IL-23 defizienten Mäusen zu finden wurde die Menge an Pneumokokken in der Lunge und im Blut der Tiere 24 und 48 Stunden nach intranasaler Infektion bestimmt. Es ist bekannt, dass IL-23 über die Induktion der Expression von IL-22 die Expression von antimikrobiellen Peptiden induzieren sowie den IL-17 abhängigen Neutrophileneinstrom beeinflussen kann [45]. Es sollte daher geprüft werden, ob zu den untersuchten Zeitpunkten eine unterschiedliche Bakterienlast in den Tieren zu den beobachteten Mortalitätsunterschieden führt. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Bakterienlast zwischen den beiden Gruppen nach 24 und 48 Stunden (Abb. 12). Somit scheinen Defekte in der antibakteriellen Abwehr nicht ursächlich für die erhöhte Mortalität der IL-23 defizienten Mäuse verantwortlich zu sein.



**Abbildung 12** Die Bakterienlast 24 (A und B) und 48 (C und D) Stunden nach Infektion der Mäuse in der Lunge (A und C), bzw. im Blut (B und D). Es zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede in der Anzahl der Bakterien in den infizierten Mäusen.

#### 4.11. Die Pneumokokkenpneumonie induziert eine Neutrophilie und relative Lymphopenie

Im weiteren Verlauf sollte zusätzlich geklärt werden, ob die IL-23-abhängige Th17-Antwort zu einer vermehrten Neutrophilenrekrutierung mit konsekutiv verstärkter Immunantwort geführt hat. Das Blutbild der infizierten Mäuse wies 48 Stunden nach der Infektion eine Neutrophilie und leichte Lymphopenie auf (Abb. 13). Dies entspricht dem bei einer bakteriellen Infektion zu erwartenden Blutbildveränderungen. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp C57Bl/6-Mäusen und den IL-23-defizienten Tieren beobachtet werden.

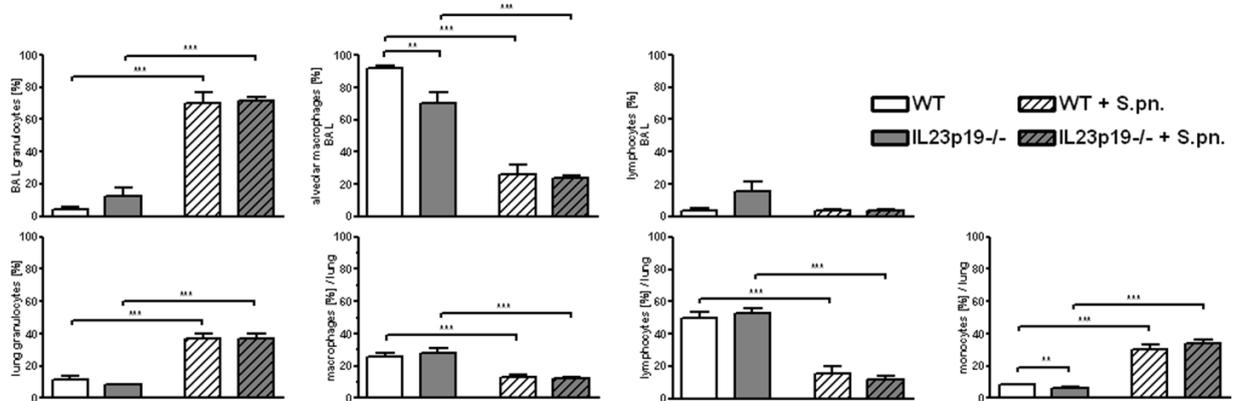


**Abbildung 13** Im Blutbild der infizierten Mäuse findet sich im Vergleich zu den nicht infizierten, nur mit PBS intranasal behandelten Tieren, eine leichte Zunahme der Granulozyten sowie eine leichte Abnahme der Lymphozyten nach 48 Stunden. Ein Unterschied zwischen den Wildtyp und den IL-23-defizienten Tieren besteht nicht. Mittelwerte von 3 unabhängigen Messungen. n=3

#### 4.12. Die Pneumokokkenpneumonie löst ein entzündliches Infiltrat in der Lunge aus

Im Rahmen einer bakteriellen Infektion kommt es zu einer ausgeprägten Inflammation am Ort der Infektion. Es wurden daher 48 Stunden nach Infektion die Zellen in der BAL sowie im Lungengewebe auf einen Einstrom von inflammatorischen Zellen, wie Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, untersucht. Es zeigte sich eine deutliche insbesondere granulozytäre Entzündungsreaktion mit einem deutlichen relativen Abfall der Anzahl an Makrophagen und Lymphozyten jedoch mit einer Zunahme an monozytären Zellen (Abb. 14). Es bestand also eine deutlich Abwehrreaktion auf die bakterielle Infektion. Ein Unterschied in

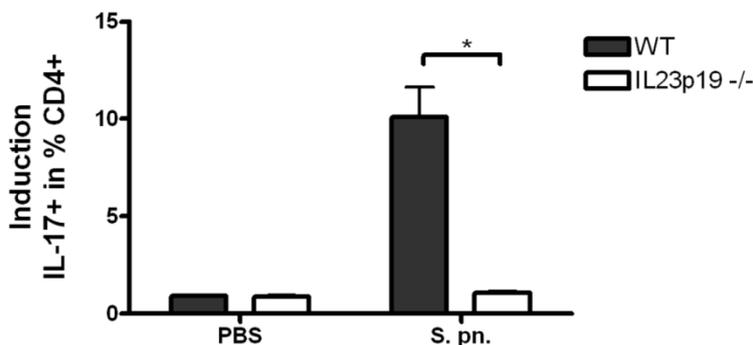
der lokalen zellulären Immunreaktion zwischen den Wildtyptieren und den IL-23-defizienten Tieren konnte jedoch nicht beobachtet werden.



**Abbildung 14 Eine Pneumokokkenpneumonie führt zu Granulozytose und Lymphopenie in BAL und Lungengewebe.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen IL-23 defizienten Mäusen und Wildtypmäusen in der Ausprägung des Einstroms inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe von mit Pneumokokken infizierten Mäusen. Mittelwerte von 9 unabhängigen Messungen. n=9

### 4.13. Die Pneumokokkenpneumonie löst eine IL-23 abhängige Th17-Antwort in der Lunge aus

In einem weiteren Schritt sollte der relative Anteil der Th17-Lymphozyten an allen Zellen der BAL und der Lunge untersucht und verglichen werden. Hierzu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und IL-17 inkubiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Th17-Zellen in den Lungen der infizierten Wildtypmäuse (Abb. 15). In den IL-23-defizienten Tieren war keine Zunahme der Th17-Zellen nachweisbar.



**Abbildung 15** Anteil der IL-17 produzierenden CD4+ Lymphozyten an der Gesamtlmphozytenpopulation in der Lunge. Während der Pneumokokkenpneumonie kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Th17-Zellen in den Wildtypmäusen, jedoch nicht in den IL-23-defizienten Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.14. Zytokinsekretion in Blut und BAL im Rahmen der Pneumokokkenpneumonie

Durch eine bakterielle Infektion wird eine massive Zytokinsekretion durch myeloide und nicht myeloide Zellen, wie z.B. Epithel- und Endothelzellen ausgelöst. Um zu testen, ob eine IL-23-defizienz zu einer zu WT-Mäusen unterschiedlichen Zytokinantwort führt, wurde ein Multiplex-Assay der Firma Biorad zur gleichzeitigen Messung der Konzentration wichtiger proinflammatorischen Zytokine im Mausblut und in der BAL durchgeführt. Hierbei werden farbmarkierte antikörperbesetzte Kügelchen mit geringen Mengen Probenflüssigkeit inkubiert. Durch dieses Verfahren ist es möglich trotz der geringen Menge der Proben aus den infizierten Mäusen ein breites Spektrum an Zytokinen zu bestimmen. Es zeigte sich ein deutliches inflammatorisches Zytokinprofil im Blut mit einer signifikant erhöhten Menge an IL-6, RANTES, KC und MCP-1 (Abb. 16 B, C, F, G). Weiterhin wurden erhöhte Mengen an IL-12p40, RANTES und KC (Abb. 17 C, F, G) in der BAL nach Infektion mit *S. pneumoniae* gemessen. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp und den IL-23 defizienten Mäusen

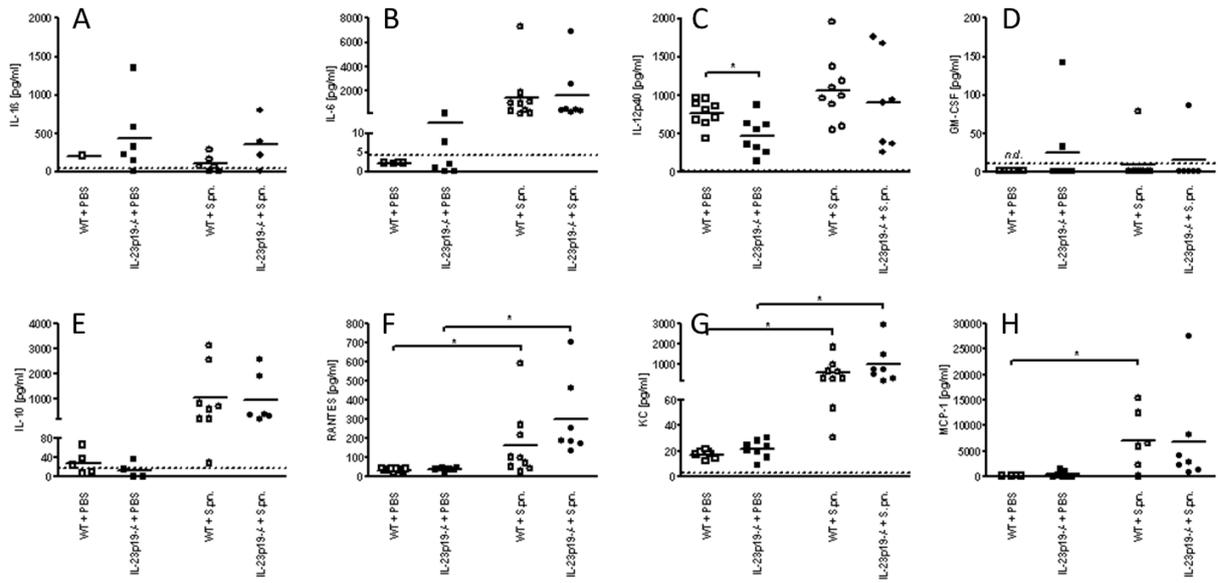


Abbildung 16 Zytokinproduktion im Blut von mit *S. pneumoniae* D39 infizierten und nicht infizierten Mäusen. n=5-

8

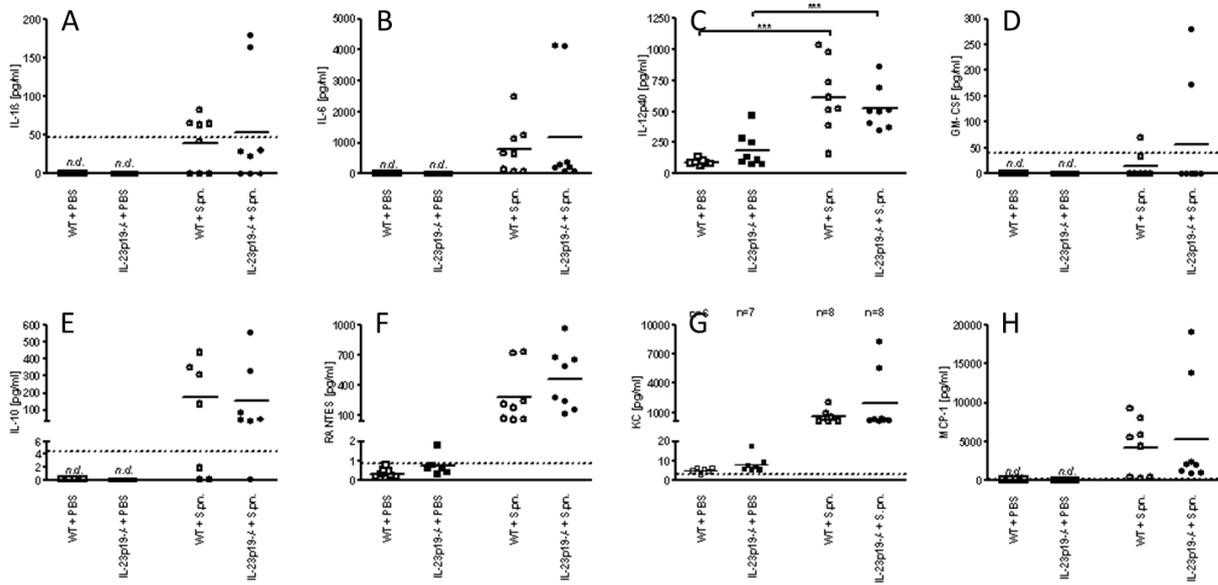


Abbildung 17 Zytokinproduktion in der BAL von mit *S. p.* D39 infizierten und nicht infizierten Mäusen. n=5-8

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *S. pneumoniae* zur Expression von IL-23 in antigenpräsentierenden Zellen führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-23 abhängig ist von TLR2 und TLR4 sowie dem zentralen Adaptermolekül MyD88. Auf Seiten der Pneumokokken schienen die Pathogenitätsfaktoren Pneumolysin sowie die Kapsel die Expression von IL-23 zu beeinflussen. Obwohl die genauen Ligand-Rezeptorinteraktionen weitere Untersuchungen bedürfen, deuten die vorliegenden Daten daraufhin, dass Pneumokokkenzellwandbestandteile, wie z.B. Lipopeptide oder Lipoteichonsäuren für die TLR2-Aktivierung, und möglicherweise Pneumolysin für die TLR4-abhängigen Effekte verantwortlich sind. Ob und ggf. wie die Pneumokokkenkapsel direkt oder indirekt die Interaktion der Bakterien mit Rezeptoren der angeborenen Immunität beeinflusst, sollte ebenfalls in Folgeuntersuchungen weiterführend untersucht werden.

Um zu klären, welche Funktion die Expression von IL-23 in antigenpräsentierenden Zellen hat, wurde der Einfluss auf die Ausbildung der T-Zellantwort untersucht. Hierbei zeigte sich eine IL-23 abhängige Induktion einer Th17-Antwort nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Weiterhin konnte eine wichtige Rolle von IL-23 im klinischen Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie im Mausmodell beobachtet werden. Hier zeigte sich ein deutlicher Überlebensvorteil für WT-Mäuse gegenüber IL-23-defizienten Tieren. Auch in den *in vivo* Versuchen konnte eine IL-23 abhängige Th17-Antwort nach Infektion mit *S. pneumoniae* nachgewiesen werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Vermehrung oder der zellulären Entzündungsreaktion zwischen den Wildtyp- und den IL-23-defizienten Mäusen gefunden werden. Der genaue Mechanismus, der das IL-23-abhängige Überleben der Wildtypmäuse sichert, sollte in weiterführenden Untersuchungen genauer charakterisiert werden.

### 5.1. Antigenpräsentierende Zellen als Zielzellen von *S. pneumoniae*

In der vorliegenden Arbeit wurden dendritische Zellen und Makrophagen und ihre Reaktion auf eine Infektion mit *S. pneumoniae* untersucht. Die Aufgabe dieser Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion ist es, Antigene aufzunehmen und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, um so eine gezielte T-Zell-abhängige Immunantwort auszulösen und diese durch Zytokine zu regulieren. Antigenpräsentierende Zellen stehen damit an der Grenze zwischen dem angeborenen

und dem erworbenen Immunsystem. Hierzu stehen ihnen verschiedene Rezeptorsysteme zur Verfügung, die dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden. An erster Stelle sind hier die Toll-like Rezeptoren zu nennen. Bei der Erkennung durch diese Rezeptoren wird nicht zwischen pathogenen und apathogenen Mikroben unterschieden.

In Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst die Fähigkeit zur Erkennung von *S. pneumoniae* durch dendritischen Zellen und Makrophagen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen und Makrophagen in der Lage sind, Pneumokokken zu erkennen und dadurch die Expression von IL-23 auszulösen.

Antigenpräsentierende Zellen haben v.a. die Aufgabe eine gezielte T-Zellantwort zu induzieren und zu regulieren. Hierbei sind zahlreiche Zytokine beteiligt, die einen Einfluss auf naive Th-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen haben. Insgesamt sind drei Signale von der dendritischen Zelle zur Aktivierung von naiven T-Zellen notwendig. Das Signal 1 ist hierbei die Interaktion von auf MHC II-Molekülen präsentiertem Peptid mit dem T-Zellrezeptor. Das Signal 2 wird durch kostimulatorische Moleküle auf Seiten der APCs und durch entsprechende Rezeptoren auf Seiten der T-Zellen vermittelt. Als drittes Signal produzieren die dendritischen Zellen verschiedene Zytokine zur Regulation der Th-Zellantwort. So ist die Th1-Zellantwort abhängig von IL-12 und IFN $\gamma$ , die Th2-Zellantwort bedarf IL-4 und Th17-Zellen bilden sich, wenn die APCs vornehmlich IL-1, TGF $\beta$ , IL-6 und IL-23 freisetzen. IL-12 und IL-23 gehören hierbei zur gleichen Zytokinfamilie. Sie teilen die identische Untereinheit IL12p40, unterscheiden sich jedoch in ihrer zweiten Untereinheit und ihrer Funktion deutlich. Während IL-12 in der Lage ist, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Th1 Antwort zu stimulieren, kommt IL-23 eine zentrale Rolle in der Induktion und Regulation von Th17-Zellen zu. In den hier gezeigten initialen Versuchen wurde daher die Fähigkeit von dendritischen Zellen und Makrophagen untersucht IL-23 zu exprimieren. Es konnte eine deutliche dosisabhängige Zunahme der Expression von IL-23 in dendritischen Zellen und Makrophagen nach Infektion mit Pneumokokken gezeigt werden.

In der Vergangenheit war bereits eine wichtige Rolle von IL12p40 in der Pneumokokkenpneumonie nachgewiesen worden. Hierbei wurden IL12p40 defiziente Mäuse mit Pneumokokken infiziert [121]. In Folge konnte eine deutlich verkürzte Überlebenszeit sowie eine massive erhöhte bakterielle Last in den Lungen der Mäuse beobachtet werden. Zur Zeit dieser Untersuchung war IL-23 noch nicht bekannt, so dass damals davon ausgegangen wurde, dass Mäuse mit einem Defekt im IL12p40 Gen defizient für IL-12 sind. In einer weiteren Studie

wurden mit Pneumokokken infizierte Wildtypmäuse mit intranasal appliziertem IL-12 behandelt [122]. Dies führte zu einer Abnahme der Bakterienlast in den Lungen der Tiere begleitet von einem verstärkten Neutrophileneinstrom und höheren IFN $\gamma$ -Spiegeln in der BAL [122]. Seit der Beschreibung von IL-23 als heterodimeres Zytokin bestehend aus den Untereinheiten IL12p40 und IL23p19 müssen die Ergebnisse dieser Studien neu interpretiert werden. Es ist nicht mehr klar, ob der in den IL12p40 defizienten Mäusen beschriebene Effekt IL-12 oder IL-23 zugeschrieben werden kann. Die Rolle von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht geklärt. Die vorliegende Untersuchung fokussiert daher auf die Regulation der Expression von IL-23 und die Rolle von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie der Maus.

## **5.2. Die Expression von IL23A ist abhängig von Pneumolysin und den Kapselpolysacchariden von *S. pneumoniae***

Aufgrund früherer Studien, die einen Einfluss der Expression von Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* auf die Zytokinantwort von Wirtszellen zeigten, sollte der Einfluss der bakteriellen Kapsel und des Exotoxins Pneumolysin auf die Expression von IL-23 untersucht werden. Hierzu standen zwei Mutanten von *S. pneumoniae* Stamm D39 vom Serotyp 2 zur Verfügung, in denen der Genlokus für die Expression von Pneumolysin (D39dPLY) oder der Kapselpolysaccharide (D39dCPS) deletiert war.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Pneumokokken des Stamms D39 in Abhängigkeit von Pneumolysin in der Lage sind, in dendritischen Zellen Apoptose auszulösen [123]. Hierzu sind große Mengen an Bakterien (MOI 800) notwendig. In derselben Publikation wurde ebenfalls gezeigt, dass die Anzahl apoptotischer Zellen bei einer MOI von 10 nur sehr gering war. Daher wurden bei der vorliegenden Arbeit die Infektionsversuche mit einer maximalen MOI von 10 durchgeführt. Weiterhin finden sich in der Literatur Studien, in denen der Einfluss von Pneumolysin auf die Phagozytose und die Expression von IL-12 nach Infektion von dendritischen Zellen mit *S. pneumoniae* untersucht wurde [124]. Hier zeigte sich, dass Pneumolysin-defiziente Pneumokokken wesentlich besser phagozytiert wurden und eine stärkere Zytokinantwort im Sinne einer höheren Expression von IL-12 auslösten. Dies unterschied sich nur geringfügig zwischen humanen und murinen dendritischen Zellen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von IL-23 deutlich geringer war, wenn dendritische Zellen oder Makrophagen mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken oder unbekapselten Pneumokokken infiziert wurden. Die beobachteten Effekte könnten auf eine unterschiedliche Regulation der Expression von IL-12 und IL-23 in Pneumokokken-infizierten Wirtszellen hindeuten. Die Verwendung von unterschiedlichen Pneumokokkenstämmen in der vorliegenden Arbeit und der zitierten Untersuchung beeinflusst die Untersuchungsergebnisse zusätzlich, da in dieser Arbeit der Stamm D39 und in der zitierten Arbeit der Stamm T4 (TIGR4) verwendet wurden. Die beiden Stämme unterscheiden sich klinisch deutlich darin, dass eine intranasale Infektion einer Maus mit dem Stamm T4 zu einer lokalen schweren Pneumonie führt, während die Infektion der Maus mit D39 Pneumokokken vom Serotyp 2 zu einer schweren Pneumonie mit konsekutiver Sepsis führt [125]. Es scheint also einen deutlichen Unterschied in der Immunantwort auf die unterschiedlichen Serotypen und möglicherweise auf ihre unterschiedlichen Pneumolysine zu geben, der sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachten lässt. Die Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide der beiden Stämme unterscheidet sich ebenfalls. Es konnte gezeigt werden, dass dies einen deutlichen Pathogenitätsunterschied verursachen kann [126]. Dies verursacht jedoch keinen Unterschied in der Fähigkeit von dendritischen Zellen die Pneumokokken zu phagozytieren [127]. Es ist daher nicht möglich eine generelle Aussage über die Regulation der Genexpression der IL-12 Zytokine im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie zu treffen, da sowohl die Regulation der Zytokine unterschiedlich zu sein scheint, als auch ein beträchtlicher Einfluss der verschiedenen Pneumokokkenstämmen auf die Zytokinexpression beobachtet werden kann.

Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression von IL-23 in dendritischen Zellen und Makrophagen beobachtet werden, die mit der unbekapselten Mutante von D39 (D39dCPS) infiziert wurden. Es wurde beschrieben, dass eine intakte bakterielle Kapsel die Fähigkeit zur Opsonierung und Phagozytose von Pneumokokken durch antigenpräsentierende Zellen effektiv hemmt und verzögert [13, 119, 124, 128]. Die Expression von IL-23 scheint abhängig von der Expression einer intakten bakteriellen Polysaccharidkapsel zu sein. Dies deutet auf eine Rolle von extrazellulären Rezeptoren in der Erkennung der Pneumokokken und konsekutiver Steigerung der Expression von IL-23 hin, obwohl die genauen zugrundeliegenden Mechanismen noch weiterer Untersuchungen bedürfen.

### **5.3. Die Expression von IL-23 ist abhängig von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort**

In der zweiten Hälfte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden die Toll-like Rezeptoren im Vertebraten das erste Mal beschrieben [129]. Diese Rezeptoren wurden in den folgenden Jahren als wichtigste und zentrale Rezeptoren der angeborenen Immunantwort identifiziert und ihre Rolle in zahlreichen Infektionsmodellen genauer untersucht. Im weiteren Verlauf konnten zahlreiche weitere Rezeptoren der angeborenen Immunantwort identifiziert werden, wie z. B. die NOD-like Rezeptoren sowie die RIG-I-like Rezeptoren. In diesem Zusammenhang konnte eine Rolle von TLR-2 und TLR-4 sowie von dem NLRP-3-Inflammasome in der Erkennung von Pneumokokken beschrieben werden [130-132]. Hierbei scheint insbesondere das NLRP-3-Inflammasom und möglicherweise TLR-4 in der Lage zu sein, Pneumolysin zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass endotoxinfreies Pneumolysin alleine nicht in der Lage ist eine stark vermehrte Zytokinfreisetzung in dendritischen Zellen auszulösen, jedoch zusammen mit einem TLR-Stimulus die Freisetzung von Zytokinen der IL-1-Familie gegenüber einer Infektion mit Pneumolysin defizienten Pneumokokken deutlich verstärkt [130]. Dies erklärt sich am ehesten durch die Aktivierung des NLRP-3-Inflammasoms durch Pneumolysin nach vorheriger Aktivierung des NF- $\kappa$ B Weges durch einen TLR Stimulus [133]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang von der Pneumolysinexpression und der Expression von IL-23 gezeigt werden. Eine NLRP-3 abhängige Expression von IL-23 ist bisher nicht beschrieben und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Jedoch ist bekannt, dass IL-23 nach Stimulation mit IL-1 vermehrt gebildet wird [134]. Dies könnte ebenfalls die teilweise von TLR-2 und 4 abhängige Expression von IL-23 nach Infektion mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken erklären. Die Erkennung der Pneumokokkenkapsel durch das TLR System ist bisher nur unzureichend untersucht. Es ist nicht klar welche Strukturen in der Polysaccharidkapsel von *S. pneumoniae* in der vorliegenden Arbeit die TLR-abhängigen Effekte hervorruft. Die gezeigten TLR-2-abhängigen Effekte könnten möglicherweise durch die Erkennung einer erst sekundär durch die Infektion freigesetzten molekularen Struktur hervorgerufen worden sein. Die Rolle von TLR-2 in der Erkennung von *S. pneumoniae* scheint deutlich geringer zu sein, als für andere grampositive Bakterien [135].

Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit Experimente mit pneumolysin- und kapselpolysaccharid-defizienten Pneumokokken eine deutliche Abschwächung in der Expression

von IL-23 gezeigt haben, sollte im nächsten Schritt die Rolle der TLRs in der Regulation der Expression von IL-23 gezeigt werden. Hierzu wurden zunächst murine Knochenmarksmakrophagen infiziert, die defizient für das zentrale TLR-Adaptermolekül MyD88 waren. Diese Zellen können die Signale der TLRs-1,-2 und TLR-4 bis TLR-9 nicht oder im Fall von TLR-4 nur über die Adaptermolekülwege TRAM und TRIF weiterleiten [136]. Nach Infektion von MyD88-defizienten Knochenmarksmakrophagen mit Pneumokokken kam es zu einem kompletten Verlust der IL-23 Expression in diesen Zellen. Dies deutet auf eine zentrale Rolle von MyD88-abhängigen TLRs hin. In Zusammenschau mit den zuvor publizierten Daten über die Erkennung von Pneumokokken sowie den eigenen Ergebnissen, die eine wichtige Rolle von Pneumolysin und der Kapselpolysaccharide der Pneumokokken in der Regulation der IL-23-Expression in antigenpräsentierenden Zellen zeigen, schienen TLR-2 und -4 als primäre Kandidaten zur weiteren Untersuchung relevant. Es wurden daher TLR-2, TLR-4 und TLR-2/4 defiziente Knochenmarksmakrophagen mit Pneumokokken infiziert. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von IL-23 insbesondere in den TLR-2 defizienten Zellen. Jedoch auch in den TLR-4 und den TLR-2/4 defizienten Zellen zeigte sich eine deutlich verminderte IL-23-Expression. Nach Infektion dieser Zellen mit Pneumolysin- und Kapselpolysaccharid-defizienten Pneumokokken konnte die bereits deutlich verminderte Expression von IL-23 durch das Fehlen von TLR-2 und TLR-4 nicht mehr weiter beeinflusst werden. Da die Expression von IL-23 in TLR-2- und TLR-4-defizienten Makrophagen im Gegensatz zur IL-23-Expression in MyD88-defizienten Zellen jedoch nicht vollständig verhindert wurde, scheint ein weiterer MyD88-abhängiger Signalweg eine Rolle in der Expression von IL-23 in Pneumokokken-infizierten murinen Knochenmarksmakrophagen zu spielen. Hierbei könnte insbesondere der Fähigkeit von Pneumolysin, das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren und eine IL-1-Sekretion zu induzieren, eine Rolle zukommen [133, 137]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  in der Lage ist, die Expression von IL-23 zu induzieren und zu steigern [138]. Da der IL-1-Rezeptor sein Signal ebenfalls über MyD88 vermittelt, könnte dies eine mögliche Erklärung für den oben beschriebenen Effekt darstellen. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Die fast komplett fehlende Expression von IL-23 in den Makrophagen, die mit Pneumolysin defizienten Pneumokokken infiziert wurden unterstreicht jedoch die Wichtigkeit von Pneumolysin in der Regulation der Expression von IL-23 und deutet zusammen mit den gezeigten Ergebnissen in den MyD88 defizienten

Makrophagen auf eine mögliche Interaktion mit dem NLRP3-IL-1-Signalweg, wie oben beschrieben, hin.

Zusammenfassend konnte eine zentrale Rolle der Pathogenitätsfaktoren Pneumolysin und der Kapselpolysaccharide sowie der Erkennung durch die MyD88-abhängigen TLRs 2 und 4 in der Regulation der Expression von IL-23 in humanen, bzw. murinen antigenpräsentierenden Zellen gezeigt werden. Es ergeben sich Hinweise auf eine wichtige Rolle weiterer durch Pneumolysin aktivierter Pathogenerkennungsmechanismen, wie beispielsweise des NLRP-3-Inflammasoms.

#### **5.4. Pneumokokken infizierte dendritische Zellen induzieren eine Th17-Antwort**

Es sollte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Funktion IL-23 bei einer Pneumokokkenpneumonie zukommt. Bisher konnte eine wichtige Rolle von IL-23 in der Klebsiellenpneumonie gezeigt werden [81]. Es kam nach einer pulmonalen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* zu einer IL-23-abhängigen IL-17-Produktion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-23 wichtig war für die Induktion einer IL-22-Antwort auf eine Klebsiellenpneumonie [113]. Weiterhin konnte die Rolle der Th17-Zellen als wichtigster Produzent von IL-17 und IL-22 und die Abhängigkeit der Th17-Antwort von IL-23 während einer Klebsiellenpneumonie gezeigt werden. Darüber hinaus konnte eine wichtige Rolle von IL-23 unter anderem in der durch *Toxoplasma gondii* induzierten Colitis gezeigt werden, bei der die IL-23 abhängige IL-22-Sekretion im Darm zu einer massiven Entzündungsreaktion führte [76]. In Studien zur *Mycoplasma* induzierten Pneumonie und der *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie konnte ebenfalls eine wichtige Rolle für die IL-23 abhängige Th17-Antwort gezeigt werden [107, 139]. Hierbei spielte insbesondere die IL-23 abhängige und IL-17 vermittelte Neutrophilenrekrutierung in die Lunge eine wichtige Rolle im Verlauf der Pneumonie. Dies zeigt, dass die IL-23 – Th17 – IL-17/IL-22-Achse eine zentrale Rolle im Verlauf zahlreicher Infektionen mit extrazellulären und intrazellulären Erregern unterschiedlichster Art spielt. Nach aktuellen Kenntnissen spielt IL-23 eine Rolle in der Regulation der T-Zell-Antwort sowohl in Infektionsmodellen als auch in Autoimmunprozessen [83, 140-143]. So beeinflusst IL-23 neben der Th17-Achse auch regulatorische T-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen sowie Type III innate lymphocytes [102].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss einer Pneumokokkeninfektion auf die Induktion einer Th17-Antwort untersucht werden. Hierzu wurden in einem Kokulturmolell primäre humane dendritische Zellen mit Pneumokokken infiziert und mit naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Es zeigte sich eine Induktion von IL-17 produzierenden Th17-Zellen durch die Bakterien. Die induzierte Th17-Antwort war in ihrer Ausprägung unter *in vitro* Bedingungen vergleichbar mit der entstandenen Th1-Antwort. Da die naiven T-Zellen aus dem Buffy Coat von Spenderblut gewonnen wurden, erfolgte eine Selektion von naiven nicht Gedächtnis- („non memory“) T-Zellen (CD4<sup>+</sup> CD45Ra<sup>+</sup> CD45Ro<sup>-</sup>). Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass die unterschiedliche Anamnese der Spender bezüglich einer Besiedlung oder zurückliegenden Infektion mit Pneumokokken keinen potentiellen Einfluss auf die Ergebnisse der Versuche hatte. Dies beschränkt die Ergebnisse aber natürlich dahingehend, dass mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine Aussage über die Aktivierung von Gedächtnis-Th17-Zellen nicht möglich ist. Ebenso erfolgten aufgrund technischer Probleme keine Untersuchungen auf eine mögliche Aktivierung von IL-17 produzierenden  $\gamma\delta$ T-Zellen oder Type III innate lymphocytes.

Das in dieser Arbeit verwendete Infektionsmodell unterscheidet sich maßgeblich von zahlreichen vorher verwandten Modellen dahingehend, dass die Zellen mit lebenden Bakterien infiziert wurden. Die meisten publizierten Arbeiten untersuchten den Einfluss von hitze- oder ethanolinaktivierten Bakterien auf die Zytokinsekretion und Aktivierung der dendritischen Zellen. Die Wahl der Infektionsdosis war besonders relevant, da gezeigt werden konnte, dass insbesondere Pneumolysin in höheren Dosen Apoptose in dendritischen Zellen auslösen kann [123]. Weiterhin scheint die Phagozytose in der Induktion einer T-Zellantwort durch dendritische Zellen eine wichtige Rolle zu spielen, da für die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen die Präsentation von an MHC-Molekülen gebundenen Peptiden durch dendritische Zellen notwendig ist. Lebende Pneumokokken können sich der Phagozytose mit Hilfe ihrer Kapsel jedoch weitgehend entziehen. Im Rahmen der hier vorliegenden Experimente kam weiterhin fetales Kälberserum zum Einsatz, so dass kein humanes Komplementsystem und keine humanen IgA Antikörper vorhanden waren und somit keine optimalen Bedingungen für die humanen Zellen zur Opsonierung der Bakterien bestanden.

Ein Problem bei *in vitro* Modellen zur Untersuchung der Aktivierung der naiven T- Zellen stellt der Mangel an T-Zellen mit einem T-Zellrezeptor spezifisch für Pneumokokkenantigen dar.

Daher erfolgte zur unspezifischen Stimulation des T-Zellrezeptors die Zugabe von aktivierenden CD3-Antikörpern, so dass Signal 1, Aktivierung des T-Zellrezeptors zur Aktivierung der naiven T-Zellen unter allen experimentellen Bedingungen unabhängig von der Stimulation der dendritischen Zellen vorlag, unabhängig von der Präsentation von MHC gebundenen Peptiden durch die Pneumokokken.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter diesen Bedingungen zu einer deutlichen Zunahme der Expression von IL-23 durch die Aktivierung von TLR-2 und TLR-4 und nachfolgend des MyD88 Weges kommt.

Durch die hier gezeigten Experimente ist es also möglich, die Frage zu beantworten, ob *S. pneumoniae* in der Lage ist, eine Th17-Antwort in naiven humanen T-Zellen nach Infektion von dendritischen Zellen zu induzieren. Um den Einfluss von IL-23 in diesem Zusammenhang weiter zu untersuchen, musste das Experiment unter IL-23-defizienten Bedingungen in einem „loss of function“ Modell wiederholt werden. Da eine vollständige Depletion von IL-23 durch Antikörper nicht sichergestellt werden kann, wurden dendritische Zellen aus den Knochenmarksstammzellen von IL-23-defizienten Mäusen ausdifferenziert und mit *S. pneumoniae* infiziert. Im Anschluss wurden diese Zellen dann analog zu den Versuchen mit humanen dendritischen Zellen und T-Zellen mit naiven T-Zellen aus der Milz von Wildtypmäusen kokultiviert. Hierbei erfolgte ebenfalls das Signal 1 von aktivierenden CD3 Antikörpern und Signal 2 und 3 (kostimulatorische Rezeptoren und Zytokine) mussten von den dendritischen Zellen erzeugt werden. Hierbei zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Th17-Antwort von IL-23 auf die Infektion mit Pneumokokken.

*In vitro*-Modelle zur Untersuchung der Induktion von T-Zellantworten leiden immer unter dem Mangel eines natürlichen Zytokinumfeldes und der fehlenden anatomischen Nähe zu weiteren Immunzellen sowie dem Stroma, denen die naiven T-Zellen im Lymphknoten ausgesetzt sind. Der Versuch dieses Umfeld im *in vitro*-Modell nachzubilden reflektiert natürlich immer nur den aktuellen Stand des Wissens um die dort vorherrschenden Bedingungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf den Zusatz weitere Zytokine verzichtet, um die Ausdifferenzierung der T-Zellen durch die von den dendritischen Zellen gebildeten Zytokine nicht zu beeinflussen.

Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre untersuchten die Ausreifung von Th17-Zellen *in vitro* mit Hilfe von naiven T-Zellen und verschiedenen Zytokincocktails. Hierbei zeigte sich, dass für

die Induktion einer Th17-Antwort die Zytokine TGF $\beta$ , IL-1 und IL-6 eine zentrale Rolle spielen und IL-23 eine wichtige Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Th17-Antwort und der Proliferation der Th17-Zellen hat [144-149]. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben, konnten jedoch verschiedene Kombinationen und Konzentrationen dieser Zytokine und verschiedener weiterer Faktoren wie die Aktivierung des Arylhydrocarbon Rezeptors gefunden werden, die zur Expression von ROR $\gamma$ T und damit verbunden zu einer Th17-Differenzierung in naiven T Zellen führen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei den Versuchen zur Induktion von Th17-Zellen durch *S. pneumoniae* infizierte dendritische Zellen keine die Differenzierung beeinflussenden Zytokine beigefügt, da nicht genau bekannt ist, welche der beschriebenen Faktoren in der pneumokokkenabhängigen Induktion der Th17-Antwort eine Rolle spielen.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass dendritische Zellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* naive T-Zellen zu Th17-Zellen ausdifferenzieren und deren Proliferation aufrechterhalten können.

### **5.5. IL-23 ist wichtig für das Überleben einer Pneumokokkenpneumonie**

Da IL-23 eine regulatorische Funktion auf zahlreiche Aspekte der Immunantwort mit Beeinflussung der T-Helferzellantwort sowie der Typ 3 *innate lymphoid cells* (ILCs) [150] und in Folge auf die Aktivität von immunologisch aktiven Zellen wie Granulozyten und Epithelzellen ausüben kann, sind *in vitro* Untersuchungen über die Relevanz und die Funktion von IL-23 in einer bestimmten inflammatorischen Situation nur eingeschränkt aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von IL-23 auf die Mortalität von Mäusen durch eine pulmonale Infektion mit *S. pneumoniae* untersucht. Dazu wurden C57Bl/6 Wildtypmäuse und C57Bl/6 Mäuse mit einer Defizienz in der IL-23-Untereinheit IL23p19 intranasal mit Pneumokokken infiziert. Dabei wurde die Dosis so gewählt, dass Wildtypmäuse vom Stamm C57Bl/6 in ca. 50% der Fälle versterben. Die Dosis wurde in zahlreichen bereits publizierten Vorversuchen in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Witzentath in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité, mit denen die Tierversuche gemeinsam durchgeführt wurden, ermittelt.

Die Mortalitätsstudie zeigte einen deutlichen Anstieg in der Mortalität der IL-23 defizienten Mäuse mit 90% gegenüber einer Mortalität von 50% in den Wildtyptieren. Der klinische Verlauf

unterschied sich insbesondere in den ersten 4 Tagen dahingehend, dass die IL-23-defizienten Tiere eine niedrigere Körpertemperatur und ein niedrigeres Körpergewicht aufwiesen. Bereits zu diesem Zeitpunkt verstarben die meisten IL-23 defizienten Tiere. Dies deutet auf ein insbesondere in den ersten Tagen der Infektion stattfindenden, IL-23 abhängigen Prozess hin.

Da die Tiere zum gleichen Tageszeitpunkt und unter gleichen Bedingungen infiziert und beobachtet wurden, ist ein externer Einfluss oder eine gestörte zirkadiane Rhythmik unwahrscheinlich. Die Mäuse waren alle vom Inzuchstamm C57Bl/6 und aus einer gemeinsamen Zucht (mating couples). Weiterhin ist aufgrund der gleichen Tierhaltung sowie die Verabreichung des gleichen Tierfutters von einer sehr ähnlichen mikrobiellen Besiedlung der Tiere auszugehen.

Die unterschiedliche Gesamtmortalität der Wildtypmäuse im Vergleich zu den IL-23 defizienten Tieren ist auf einen Effekt in den ersten 72h nach Infektion zurückzuführen. Die weist auf einen frühen Effekt von IL-23 auf die Pneumokokkenpneumonie hin. Dies könnte bedeuten, dass der IL-23 vermittelte Effekt von Effektorzellen der angeborenen Immunantwort, wie z. B. den innate lymphoid cells III oder den  $\gamma\delta$ -T-Zellen oder im etwas späteren Verlauf der Infektion von Th17-Zellen vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass ILC III-Zellen in Abhängigkeit von IL-23 eine protektive Rolle an mukosalen Grenzflächen ausüben und zum Beispiel im Rahmen einer Influenza Infektion vor weiteren bakteriellen Infektionen schützen können [101, 151].

### **5.5.1. Mögliche Ursachen für die erhöhte Mortalität von IL-23p19-defizienten Tieren gegenüber Wildtyptieren in der Pneumokokkenpneumonie**

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass IL-23-defiziente Mäuse eine im Vergleich zu Wildtyptieren deutlich erhöhte Mortalität während der Pneumokokkenpneumonie haben. Die IL-23-abhängige Sekretion von IL-22 kann zur Bildung von zahlreichen antimikrobiellen Peptiden und damit verbunden zur Abtötung von Bakterien führen [83, 112]. Die hier gezeigten Daten konnten jedoch keinen Effekt von IL-23 auf die Bakterienlast in der Lunge oder im Blutstrom der Maus zu den untersuchten Zeiten nach Infektion mit *S. pneumoniae* nachweisen. Im Gegensatz dazu hatten IL-23-defiziente Tiere im *K. pneumoniae*-Pneumoniemodell eine erhöhte Bakterienlast im Vergleich zu WT-Tieren [83]. Weiterhin konnte

in dieser und anderen Studien eine Abhängigkeit der IL-22 Produktion von IL-23 gezeigt werden und ein damit zusammenhängender Mangel an antimikrobiellen Peptiden [76, 77, 152]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *S. pneumoniae* in der Lunge und im Blut von Wildtyptieren mit IL-23 defizienten Mäusen verglichen. Hierbei zeigte sich 24 und 48 Stunden nach intranasaler Infektion kein Unterschied in der Zahl der koloniebildenden Einheiten. In der zitierten Arbeit wurde die Anzahl der Klebsiellen nach 24-stündiger Infektion sowohl in der Lunge als auch in der Milz ermittelt. Es finden sich keine Daten über den weiteren Verlauf der bakteriellen Vermehrung, so dass möglicherweise ein früher Effekt des genetischen Defekts beobachtet wurde. Es ist nicht bekannt ob sich die Bakterienlast in den Lungen und der Milz der mit *K. pneumoniae* infizierten Tiere im weiteren Verlauf erneut angeglichen hat. In der hier vorliegenden Arbeit wurden keine früheren Zeitpunkte als 24 Stunden nach intranasaler Infektion mit *S. pneumoniae* untersucht, so dass ein möglicher schneller Effekt, z. B. vermittelt durch ILC III,  $\gamma\delta$ -T-Zellen oder Gedächtnis-Th17-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Dies geschah aufgrund von früheren Publikationen und Experimenten der Arbeitsgruppe, in denen eine maximale pulmonale Inflammation und der Übergang von einer Pneumonie zu einer Sepsis in C57Bl/6 Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae* nach 48 Stunden beobachtet worden war [120]. Diese ließen darauf schließen, dass ein genetischer Defekt mit einem Einfluss auf das Immunsystem wohl am ehesten zu diesem Zeitpunkt einen Effekt hervorrufen sollte. Es besteht also ein bisher ungeklärter Unterschied in der IL-23 vermittelten Immunantwort und deren Einfluss auf die Bakterienlast zwischen *K. pneumoniae* und *S. pneumoniae*.

Weiterhin bestand ein Unterschied zwischen der Infektionsdosis der Mäuse für die Mortalitätsstudie und die Untersuchungen der Immunreaktion auf eine Infektion mit *S. pneumoniae*. Die Mäuse für die Mortalitätsstudie wurden mit einer LD50-Dosis (eine Dosis, die für 50% der Wildtyptiere letal war) infiziert, während die Mäuse für die Untersuchungen der Immunreaktion mit einer für LD100 (eine Dosis die für 100% der Wildtyptiere letal war) wurden. Dieses Vorgehen sollte die Effekte maximieren und zu einer besseren Messbarkeit der Unterschiede führen. Im Nachhinein ist aber nicht auszuschließen, dass sowohl die Zeit- als auch die Dosisunterschiede zwischen der Mortalitätsstudie und den weiteren vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit die beobachtete Immunreaktion sowie die Abtötung der Pneumokokken und die fehlenden Unterschiede zwischen den Wildtyp und den IL-23

defizienten Mäusen beeinflusst haben. Dies könnte erklären warum in den vorliegenden Experimenten kein Unterschied zwischen den Wildtypmäusen und den IL-23 defizienten Tieren gefunden werden konnte.

Eine bakterielle Infektion führt zu einer insbesondere durch Neutrophile geprägten zellulären Immunreaktion. Studien die den Einfluss der IL-23/ Th17/ IL-17-Achse in verschiedenen Pneumoniemodellen untersucht haben, sahen einen Einfluss insbesondere in der Frühphase der Infektion mit einem IL-17-abhängigen Neutrophileneinstrom sowie einer deutlich erhöhten Bakterienlast in den Lungen der infizierten defizienten Mäuse [81, 104]. Publierte Studien zur Pneumokokkenpneumonie zeichnen ein deutliches Bild zum Verlauf der Immunreaktion in mindestens zwei Phasen. In der frühen Phase scheinen insbesondere Mechanismen der angeborenen Immunantwort [153, 154] und ggf. des T-Zell-Gedächtnisses [155, 156] eine Rolle zu spielen. In der zweiten Phase der Immunantwort gegen Pneumokokken und in der Immunantwort nach Impfung, bzw. bei intranasaler Besiedlung, übernehmen die Mechanismen der erworbenen Immunität, insbesondere die CD4+ T-Zellantwort eine wichtige Rolle in der Abwehr. Hierbei konnte insbesondere in Experimenten, die die Immunreaktion in Mäusen auf eine Pneumokokkenpneumonie bei bestehender nasaler Besiedlung mit *S. pneumoniae* untersuchten, eine wichtige Rolle für IL-17 in der Abwehr der Infektion gefunden werden [157]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen, die gegen Antigene von *S. pneumoniae* gerichtet sind, eine Kolonisation der Schleimhäute durch *S. pneumoniae* sicher verhindern können [158, 159]. Die Expression von IL-17 in Th-17 Zellen, aber auch in den anderen IL-17 produzierenden lymphozytären Zellen steigert die GM-CSF-abhängige Reifung von Neutrophilen im Knochenmark, führt direkt und indirekt zu einem vermehrten Neutrophileneinstrom in das entzündete Gewebe und verstärkt dadurch die zelluläre Abwehr gegen Bakterien [159, 160].

In weiteren *in vivo* Versuchen wurde daher die pulmonale Inflammation in den Wildtypmäusen mit der in den IL-23 defizienten Mäusen verglichen. 48 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* kam es zu einem deutlichen Neutrophileneinstrom in die Lungen der Tiere, was sich in der bronchoalveolären Lavage messen lies. Weiterhin kam es zu einer Erhöhung der Granulozytenzahl im Blut. Sowohl in den Wildtyp-, als auch in den IL-23-defizienten Mäusen kam es weiterhin zu einer relativen Lymphopenie in der Lunge, der BAL und dem Blut. Verglichen mit dem Bild einer Pneumokokkenpneumonie des Menschen zeigt sich in der Maus

das analoge Bild einer Immunreaktion auf eine bakterielle Infektion mit Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und einer relativen Verminderung der Lymphozytenzahl [161]. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den IL-23-defizienten Mäusen gemessen werden.

Nach 48 Stunden besteht im hier verwendeten Infektionsmodell eine ausgeprägte pulmonale Inflammation mit Verlust der pulmonalen Barrierefunktion und deutlicher systemischer Streuung der Infektion [120, 133, 162, 163]. Dies führt zu einer massiven Zytokinsekretion und einer Aktivierung des Immunsystems mit überschießender Immunreaktion und Ausbildung eines systemischen Schocks. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war zu diesem Zeitpunkt kein Einfluss von IL-23 auf die zelluläre Immunreaktion nachweisbar.

Eine Studie, die den Einfluss von Morphinen auf den Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie untersuchte, fand einen inhibitorischen Effekt von Morphinium auf die IL-23 Sekretion und in Folge eine verminderte Th17-Antwort mit verminderter IL-17-Konzentration, vermindertem Neutrophileneinstrom in die Lunge und gesteigerter Bakterienvermehrung in der Lunge in den ersten 6- 24 Stunden. Der weitere Verlauf der Pneumokokkenpneumonie wurde nicht untersucht [160, 164]. Zu diesem Zeitpunkt besteht noch keine ausgeprägte systemische inflammatorische Reaktion. Die Rolle von ILC III und weiteren IL-23 abhängig und unabhängig aktivierten lymphozytären Zellen wurde bisher noch nicht im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie untersucht. Ihr Einfluss auf die zelluläre Immunreaktion ist daher unklar. Es ist möglich, dass der durch die IL-23-Defizienz beobachtete Effekt in der Mortalitätsstudie auf einen sehr frühen Defekt in der lokalen Immunantwort auf *S. pneumoniae* in der Lunge zurückzuführen ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Bakterienlast in den Lungen und im Blut der Mäuse nach 48 Stunden untersucht. Dabei fand sich kein signifikanter Unterschied in der Ausbreitung und der Vermehrung der Bakterien in den Mäusen. Im Unterschied zu den hier zitierten Studien erfolgte die Untersuchung in der eigenen Studie zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt. In der Mortalitätsstudie zeigte sich ein deutlicher klinischer Unterschied der Tiere nach 72 Stunden. Die Wahl des späten Zeitpunkts sowie eine unterschiedliche Infektionsdosis könnte dazu geführt haben, dass in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der Vermehrung der Bakterien und in der Anzahl der Granulozyten in den Lungen der Tiere gefunden wurden.

Die hier gezeigten Experimente zeigen einen deutlichen Anstieg der IL-17-produzierenden Th17-Zellen in der Lunge der Wildtypiere, während die Zahl der IL-17-produzierenden Zellen

in den IL-23-defizienten Mäusen konstant blieb. Dies spiegelt die wichtige Rolle von IL-23 in der Induktion und Regulation der Th17-Antwort wieder, da die Differenzierung, jedoch nicht die Vermehrung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen unabhängig von IL-23 möglich ist. Für die weitere Reifung und Vermehrung benötigen diese neuen Th17-Zellen jedoch IL-23 [45].

Um den in dieser Arbeit gesehenen Mortalitätsunterschied weiter zu untersuchen, wurden die Konzentrationen wichtiger inflammatorischer Zytokine im Blut und der BAL gemessen. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Konzentration von IL-10, KC, MCP-1 und RANTES im Blut sowie von IL12p40, KC, IL-10, MCP-1 in der BAL von infizierten Tieren, ohne das ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypmäusen und den IL-23-defizienten Mäusen beobachtet werden konnte.

Die durchgeführten Experimente ließen einen deutlichen Überlebensvorteil von Wildtyptieren gegenüber IL-23-defizienten Mäusen während einer durch *S. pneumoniae* verursachten Pneumonie erkennen. Einen Einfluss einer erhöhten Bakterienlast sowie der zellulären Immunantwort und der Zytokinantwort als Ursache für die erhöhte Mortalität der IL-23-defizienten Mäuse erscheinen aufgrund der erhobenen Daten eher unwahrscheinlich, obwohl die abschließende Beurteilung die Untersuchung weiterer Zeitpunkte bedarf. Trotz Hinweisen auf eine verminderten Th17-Antwort konnten keine der bekannten Th17-abhängigen Effekte im Sinne einer verminderten Bakterienlast aufgrund einer Th17-abhängigen Expression von antimikrobiellen Peptiden, einer Th17-abhängigen Neutrophilenrekrutierung oder einer Th17-abhängigen Steigerung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen beobachtet werden. Aufgrund der zentralen regulatorischen Rolle von IL-23 und der großen Anzahl der beeinflussten immunologischen Mechanismen ist eine weitergehende Bearbeitung dieser Fragestellung notwendig. Weitere Erkenntnisse kann die Untersuchung des Einflusses von IL-23 auf  $\gamma\delta$ T-Zellen, Gedächtnis-Th17-Zellen, die Rolle der ILC III und mögliche direkte Effekte von IL-23 auf die lokale pulmonale Immunabwehr im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie erbringen. Außerdem sollten nachfolgende Experimente den Einfluss von IL-23 auf das Lungenparenchym und hier besonders auf die Epithelzellen untersuchen. Dabei wäre es interessant eine Untersuchung der genetischen Expressionsprofile der Epithelzellen zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen. Weiterhin könnte die Untersuchung der unterschiedlichen Gruppen von dendritischen Zellen in der Lunge einen Ansatzpunkt liefern um die Rolle von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen. Experimente mit einer kürzeren Zeitkinetik könnten

helfen eine Unterscheidung zwischen der Rolle der angeborenen IL-17 und IL-22 exprimierenden Zellen ( $\gamma\delta$ T-Zellen, ILC-III-Zellen etc.) und den im Verlauf der Infektion erworbenen Th17-Zellen zu ermöglichen.

## **5.6. Zusammenfassung**

Es konnte gezeigt werden, dass humane und murine dendritische Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit von TLR-2, TLR-4 und MyD88 in der Lage sind, nach Infektion mit *S. pneumoniae* IL-23 zu exprimieren. Weiterhin konnte eine IL-23-abhängige Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen sowie deren Sekretion von IL-17 und IL-22 nach Infektion mit *S. pneumoniae in vitro* beobachtet werden. In einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie führt der Mangel an IL-23 zu einer signifikant erhöhten Mortalität der Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen. Die vorliegenden Daten zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine IL-23-abhängige Induktion von Th17-Zellen durch *S. pneumoniae*.

Zusammenfassend wurde damit begonnen, einen wichtigen Mechanismus an der Grenze zwischen angeborener und erworbener Immunität in der Pneumonie mit *S. pneumoniae* zu untersuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Hoffken, Lorenz, Kern, et al. Epidemiology, Diagnosis, Antimicrobial Therapy and Management of Community-Acquired Pneumonia and Lower Respiratory Tract Infections in Adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network Capnetz Germany. *Pneumologie* 2009;63:e1-68
- 2 Pletz, Rohde, Schutte, et al. [Epidemiology and Aetiology of Community-Acquired Pneumonia (Cap)]. *Dtsch Med Wochenschr* 2011;136:775-80
- 3 Evans, Gaisford. Treatment of Pneumonia with 2-(P-Aminobenzenesulphonamido) Pyridine. *The Lancet* 1938;232:14-9
- 4 van der Poll, Opal. Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Pneumococcal Pneumonia. *The Lancet* 374:1543-56
- 5 von Bernuth, Picard, Jin, et al. Pyogenic Bacterial Infections in Humans with Myd88 Deficiency. *Science* 2008;321:691-6
- 6 Coonrod. Pneumococcal Pneumonia. *Semin Respir Infect* 1989;4:4-11
- 7 Hausdorff, Feikin, Klugman. Epidemiological Differences among Pneumococcal Serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005;5:83-93
- 8 Kadioglu, Andrew. The Innate Immune Response to Pneumococcal Lung Infection: The Untold Story. *Trends in Immunology* 2004;25:143-9
- 9 Jedrzejak. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:187-207 ; first page, table of contents
- 10 Braun, Sublett, Freyer, et al. Pneumococcal Pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Mediate Brain Cell Apoptosis During Meningitis. *The Journal of clinical investigation* 2002;109:19-27
- 11 Cundell, Weiser, Shen, et al. Relationship between Colonial Morphology and Adherence of *Streptococcus Pneumoniae*. *Infection and Immunity* 1995;63:757-61
- 12 Hammerschmidt, Wolff, Hocke, et al. Illustration of Pneumococcal Polysaccharide Capsule During Adherence and Invasion of Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 2005;73:4653-67
- 13 Kim, Weiser. Association of Intrastrain Phase Variation in Quantity of Capsular Polysaccharide and Teichoic Acid with the Virulence of *Streptococcus Pneumoniae*. *J Infect Dis* 1998;177:368-77

- 14 Paton, Andrew, Boulnois, et al. Molecular Analysis of the Pathogenicity of Streptococcus Pneumoniae: The Role of Pneumococcal Proteins. *Annu Rev Microbiol* 1993;47:89-115
- 15 Kadioglu, Taylor, Iannelli, et al. Upper and Lower Respiratory Tract Infection by Streptococcus Pneumoniae Is Affected by Pneumolysin Deficiency and Differences in Capsule Type. *Infection and Immunity* 2002;70:2886-90
- 16 Rayner, Jackson, Rutman, et al. Interaction of Pneumolysin-Sufficient and -Deficient Isogenic Variants of Streptococcus Pneumoniae with Human Respiratory Mucosa. *Infection and Immunity* 1995;63:442-7
- 17 Steinfort, Wilson, Mitchell, et al. Effect of Streptococcus Pneumoniae on Human Respiratory Epithelium in Vitro. *Infection and Immunity* 1989;57:2006-13
- 18 Gingles, Alexander, Kadioglu, et al. Role of Genetic Resistance in Invasive Pneumococcal Infection: Identification and Study of Susceptibility and Resistance in Inbred Mouse Strains. *Infection and Immunity* 2001;69:426-34
- 19 Orihuela, Gao, McGee, et al. Organ-Specific Models of Streptococcus Pneumoniae Disease. *Scand J Infect Dis* 2003;35:647-52
- 20 Janeway. How the Immune System Protects the Host from Infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2001;3:1167-71
- 21 Medzhitov, Janeway. Innate Immune Induction of the Adaptive Immune Response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999;64:429-35
- 22 Abbas, Janeway. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell* 2000;100:129-38
- 23 Hoffmann, Kafatos, Janeway, et al. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 1999;284:1313-8
- 24 Medzhitov, Janeway. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 1997;91:295-8
- 25 Medzhitov, Janeway. Innate Immunity: Impact on the Adaptive Immune Response. *Current opinion in immunology* 1997;9:4-9
- 26 Medzhitov, Janeway. Innate Immune Recognition and Control of Adaptive Immune Responses. *Seminars in immunology* 1998;10:351-3
- 27 Janeway, Medzhitov. Introduction: The Role of Innate Immunity in the Adaptive Immune Response. *Seminars in immunology* 1998;10:349-50
- 28 Walker, McKenzie. Innate Lymphoid Cells in the Airways. *European journal of immunology* 2012;42:1368-74

- 29 Sander, Blander. Innate Immune Cells Cast an Eye on DNA. *J Mol Cell Biol* 2009;1:77-9
- 30 Medzhitov. Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response. *Nature* 2007;449:819-26
- 31 Koppe, Suttorp, Opitz. Recognition of Streptococcus Pneumoniae by the Innate Immune System. *Cellular microbiology* 2012;14:460-6
- 32 Opitz, van Laak, Eitel, et al. Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;181:1294-309
- 33 Franchi, Warner, Viani, et al. Function of Nod-Like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol Rev* 2009;227:106-28
- 34 Medzhitov, Janeway. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-44
- 35 Hammarlund, Lewis, Hansen, et al. Duration of Antiviral Immunity after Smallpox Vaccination. *Nature medicine* 2003;9:1131-7
- 36 Burgdorf, Kautz, Bohnert, et al. Distinct Pathways of Antigen Uptake and Intracellular Routing in Cd4 and Cd8 T Cell Activation. *Science* 2007;316:612-6
- 37 Bevan. Cross-Priming for a Secondary Cytotoxic Response to Minor H Antigens with H-2 Congenic Cells Which Do Not Cross-React in the Cytotoxic Assay. *The Journal of experimental medicine* 1976;143:1283-8
- 38 Guermonprez, Saveanu, Kleijmeer, et al. Er-Phagosome Fusion Defines an Mhc Class I Cross-Presentation Compartment in Dendritic Cells. *Nature* 2003;425:397-402
- 39 Blander, Medzhitov. Toll-Dependent Selection of Microbial Antigens for Presentation by Dendritic Cells. *Nature* 2006;440:808-12
- 40 Weck, Grunebach, Werth, et al. Tlr Ligands Differentially Affect Uptake and Presentation of Cellular Antigens. *Blood* 2007;109:3890-4
- 41 Schenten, Medzhitov. The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. *Adv Immunol* 2011;109:87-124
- 42 Chung, Chang, Martinez, et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* 2009;30:576-87
- 43 Veldhoen, Hocking, Atkins, et al. Tgfbeta in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of Il-17-Producing T Cells. *Immunity* 2006;24:179-89

- 44 Wei, Laurence, Elias, et al. Il-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives Il-17 Production in a Stat3-Dependent Manner. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:34605-10
- 45 Zhou, Ivanov, Spolski, et al. Il-6 Programs T(H)-17 Cell Differentiation by Promoting Sequential Engagement of the Il-21 and Il-23 Pathways. *Nature immunology* 2007;8:967-74
- 46 Veldhoen, Hocking, Flavell, et al. Signals Mediated by Transforming Growth Factor-Beta Initiate Autoimmune Encephalomyelitis, but Chronic Inflammation Is Needed to Sustain Disease. *Nature immunology* 2006;7:1151-6
- 47 Ghoreschi, Laurence, Yang, et al. Generation of Pathogenic T(H)17 Cells in the Absence of Tgf-Beta Signalling. *Nature* 2010;467:967-71
- 48 Jenkins, Taylor, Norton, et al. Cd28 Delivers a Costimulatory Signal Involved in Antigen-Specific Il-2 Production by Human T Cells. *Journal of immunology* 1991;147:2461-6
- 49 Freeman, Gray, Gimmi, et al. Structure, Expression, and T Cell Costimulatory Activity of the Murine Homologue of the Human B Lymphocyte Activation Antigen B7. *The Journal of experimental medicine* 1991;174:625-31
- 50 Nabavi, Freeman, Gault, et al. Signalling through the Mhc Class Ii Cytoplasmic Domain Is Required for Antigen Presentation and Induces B7 Expression. *Nature* 1992;360:266-8
- 51 Bill, Palmer. Positive Selection of Cd4+ T Cells Mediated by Mhc Class Ii-Bearing Stromal Cell in the Thymic Cortex. *Nature* 1989;341:649-51
- 52 Kaufmann. Role of T-Cell Subsets in Bacterial Infections. *Current opinion in immunology* 1991;3:465-70
- 53 Steinman. Linking Innate to Adaptive Immunity through Dendritic Cells. *Novartis Found Symp* 2006;279:101-9; discussion 9-13, 216-9
- 54 Steinman, Kaplan, Witmer, et al. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. V. Purification of Spleen Dendritic Cells, New Surface Markers, and Maintenance in Vitro. *The Journal of experimental medicine* 1979;149:1-16
- 55 Steinman, Adams, Cohn. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. Iv. Identification and Distribution in Mouse Spleen. *The Journal of experimental medicine* 1975;141:804-20
- 56 Steinman, Lustig, Cohn. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. 3. Functional Properties in Vivo. *The Journal of experimental medicine* 1974;139:1431-45
- 57 Steinman, Cohn. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. Ii. Functional Properties in Vitro. *The Journal of experimental medicine* 1974;139:380-97

- 58 Steinman, Cohn. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *The Journal of experimental medicine* 1973;137:1142-62
- 59 Banchereau, Steinman. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature* 1998;392:245-52
- 60 Peiser, Koeck, Kirschning, et al. Human Langerhans Cells Selectively Activated Via Toll-Like Receptor 2 Agonists Acquire Migratory and Cd4+T Cell Stimulatory Capacity. *Journal of leukocyte biology* 2008;83:1118-27
- 61 Nencioni, Schwarzenberg, Brauer, et al. Proteasome Inhibitor Bortezomib Modulates Tlr4-Induced Dendritic Cell Activation. *Blood* 2006;108:551-8
- 62 Chen, Floyd, Olson, et al. Dendritic-Cell-Associated C-Type Lectin 2 (Dcal-2) Alters Dendritic-Cell Maturation and Cytokine Production. *Blood* 2006;107:1459-67
- 63 Steinman, Hemmi. Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:17-58
- 64 Munz, Steinman, Fujii. Dendritic Cell Maturation by Innate Lymphocytes: Coordinated Stimulation of Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of experimental medicine* 2005;202:203-7
- 65 Fujii, Liu, Smith, et al. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity Via Maturing Dendritic Cells in Vivo Requires Cd40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and Cd80/86 Costimulation. *The Journal of experimental medicine* 2004;199:1607-18
- 66 Steinman. The Control of Immunity and Tolerance by Dendritic Cell. *Pathol Biol (Paris)* 2003;51:59-60
- 67 Lambrecht, Hammad. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annual review of immunology* 2012;30:243-70
- 68 Merad, Sathe, Helft, et al. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual review of immunology* 2013;31:563-604
- 69 Fitzgerald-Bocarsly, Feng. The Role of Type I Interferon Production by Dendritic Cells in Host Defense. *Biochimie* 2007;89:843-55
- 70 Kushwah, Hu. Complexity of Dendritic Cell Subsets and Their Function in the Host Immune System. *Immunology* 2011;133:409-19
- 71 Coccia, Severa, Giacomini, et al. Viral Infection and Toll-Like Receptor Agonists Induce a Differential Expression of Type I and Lambda Interferons in Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *European journal of immunology* 2004;34:796-805

- 72 Basner-Tschakarjan, Gaffal, O'Keeffe, et al. Adenovirus Efficiently Transduces Plasmacytoid Dendritic Cells Resulting in Tlr9-Dependent Maturation and Ifn-Alpha Production. *J Gene Med* 2006;8:1300-6
- 73 Wei, Rogers, Lewis, et al. The Role of the Il-12 Cytokine Family in Directing T-Cell Responses in Oral Candidosis. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:697340
- 74 Del Vecchio, Bajetta, Canova, et al. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. *Clin Cancer Res* 2007;13:4677-85
- 75 Gee, Guzzo, Che Mat, et al. The Il-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:40-52
- 76 Muñoz, Heimesaat, Danker, et al. Interleukin (Il)-23 Mediates Toxoplasma Gondii-Induced Immunopathology in the Gut Via Matrixmetalloproteinase-2 and Il-22 but Independent of Il-17. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:3047-59
- 77 Zheng, Valdez, Danilenko, et al. Interleukin-22 Mediates Early Host Defense against Attaching and Effacing Bacterial Pathogens. *Nature medicine* 2008;14:282-9
- 78 Ivanov, McKenzie, Zhou, et al. The Orphan Nuclear Receptor Rorgammata Directs the Differentiation Program of Proinflammatory Il-17+ T Helper Cells. *Cell* 2006;126:1121-33
- 79 Alam, Maekawa, Kitamura, et al. Notch Signaling Drives Il-22 Secretion in Cd4+ T Cells by Stimulating the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:5943-8
- 80 Langrish, Chen, Blumenschein, et al. Il-23 Drives a Pathogenic T Cell Population That Induces Autoimmune Inflammation. *The Journal of experimental medicine* 2005;201:233-40
- 81 Happel, Zheng, Young, et al. Cutting Edge: Roles of Toll-Like Receptor 4 and Il-23 in Il-17 Expression in Response to Klebsiella Pneumoniae Infection. *The Journal of Immunology* 2003;170:4432-6
- 82 Wu, Martin, Rino, et al. Il-23-Dependent Il-17 Production Is Essential in Neutrophil Recruitment and Activity in Mouse Lung Defense against Respiratory Mycoplasma Pneumoniae Infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2007;9:78-86
- 83 Aujla, Chan, Zheng, et al. Il-22 Mediates Mucosal Host Defense against Gram-Negative Bacterial Pneumonia. *Nature medicine* 2008;14:275-81
- 84 Aujla, Dubin, Kolls. Th17 Cells and Mucosal Host Defense. *Seminars in immunology* 2007;19:377-82

- 85 Kastelein, Hunter, Cua. Discovery and Biology of Il-23 and Il-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation. *Annual review of immunology* 2007;25:221-42
- 86 Kinnebrew, Buffie, Diehl, et al. Interleukin 23 Production by Intestinal Cd103+ Cd11b+ Dendritic Cells in Response to Bacterial Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense. *Immunity* 2012;36:276-87
- 87 Oppmann. Novel P19 Protein Engages Il-12p40 to Form a Cytokine, Il-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from Il-12. *Immunity* 2000;13:715-25
- 88 Lucas, Ghilardi, Li, et al. Il-27 Regulates Il-12 Responsiveness of Naive Cd4+ T Cells through Stat1-Dependent and -Independent Mechanisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003;100:15047-52
- 89 Owaki. A Role for Il-27 in Early Regulation of Th1 Differentiation. *J. Immunol.* 2005;175:2191-200
- 90 Pflanz. Il-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of Ebi3 and P28 Protein, Induces Proliferation of Naive Cd4+ T Cells. *Immunity* 2002;16:779-90
- 91 Jankowski, Kopinski, Goc. Interleukin-27: Biological Properties and Clinical Application. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010;58:417-25
- 92 Collison, Delgoffe, Guy, et al. The Composition and Signaling of the Il-35 Receptor Are Unconventional. *Nature immunology* 2012;13:290-9
- 93 Harrington, Hatton, Mangan, et al. Interleukin 17-Producing Cd4+ Effector T Cells Develop Via a Lineage Distinct from the T Helper Type 1 and 2 Lineages. *Nature immunology* 2005;6:1123-32
- 94 Annunziato, Cosmi, Santarlasci, et al. Phenotypic and Functional Features of Human Th17 Cells. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:1849-61
- 95 Harrington, Mangan, Weaver. Expanding the Effector Cd4 T-Cell Repertoire: The Th17 Lineage. *Current opinion in immunology* 2006;18:349-56
- 96 Milner, Brenchley, Laurence, et al. Impaired T(H)17 Cell Differentiation in Subjects with Autosomal Dominant Hyper-Ige Syndrome. *Nature* 2008;452:773-6
- 97 Minegishi, Saito. Molecular Mechanisms of the Immunological Abnormalities in Hyper-Ige Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1246:34-40
- 98 Mjosberg, Bernink, Peters, et al. Transcriptional Control of Innate Lymphoid Cells. *European journal of immunology* 2012;42:1916-23

- 99 Cherrier, Ohnmacht, Cording, et al. Development and Function of Intestinal Innate Lymphoid Cells. *Current opinion in immunology* 2012;24:277-83
- 100 Ness-Schwickerath, Morita. Regulation and Function of Il-17a- and Il-22-Producing Gammadelta T Cells. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2371-90
- 101 Ivanov, Renneson, Fontaine, et al. Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation During Influenza a Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection. *J Virol* 2013;
- 102 Sutton, Mielke, Mills. Il-17-Producing Gammadelta T Cells and Innate Lymphoid Cells. *European journal of immunology* 2012;42:2221-31
- 103 Gaffen. An Overview of Il-17 Function and Signaling. *Cytokine* 2008;43:402-7
- 104 Kimizuka, Kimura, Saga, et al. Roles of Interleukin-17 in an Experimental Legionella Pneumophila Pneumonia Model. *Infection and Immunity* 2012;80:1121-7
- 105 Lohr, Knoechel, Wang, et al. Role of Il-17 and Regulatory T Lymphocytes in a Systemic Autoimmune Disease. *J. Exp. Med.* 2006;203:2785-91
- 106 Takahashi, Vanlaere, de Rycke, et al. Il-17 Produced by Paneth Cells Drives Tnf-Induced Shock. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1755-61
- 107 Wu, Martin, Rino, et al. Il-23-Dependent Il-17 Production Is Essential in Neutrophil Recruitment and Activity in Mouse Lung Defense against Respiratory Mycoplasma Pneumoniae Infection. *Microbes and Infection* 2007;9:78-86
- 108 Yang, Chang, Park, et al. Regulation of Inflammatory Responses by Il-17f. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1063-75
- 109 Yen. Il-23 Is Essential for T Cell-Mediated Colitis and Promotes Inflammation Via Il-17 and Il-6. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1310-6
- 110 Hamada, Umemura, Shiono, et al. Il-17a Produced by Gammadelta T Cells Plays a Critical Role in Innate Immunity against Listeria Monocytogenes Infection in the Liver. *Journal of immunology* 2008;181:3456-63
- 111 Mei, Liu, Dai, et al. Cxcr2 and Cxcl5 Regulate the Il-17/G-Csf Axis and Neutrophil Homeostasis in Mice. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:974-86
- 112 Wolk, Witte, Wallace, et al. Il-22 Regulates the Expression of Genes Responsible for Antimicrobial Defense, Cellular Differentiation, and Mobility in Keratinocytes: A Potential Role in Psoriasis. *European journal of immunology* 2006;36:1309-23
- 113 Aujla, Chan, Zheng, et al. Il-22 Mediates Mucosal Host Defense against Gram-Negative Bacterial Pneumonia. *Nature medicine* 2008;14:275-81

- 114 Colonna. Interleukin-22-Producing Natural Killer Cells and Lymphoid Tissue Inducer-Like Cells in Mucosal Immunity. *Immunity* 2009;31:15-23
- 115 Zenewicz, Yancopoulos, Valenzuela, et al. Interleukin-22 but Not Interleukin-17 Provides Protection to Hepatocytes During Acute Liver Inflammation. *Immunity* 2007;27:647-59
- 116 Weber, Schlautkotter, Kaiser-Moore, et al. Inhibition of Interleukin-22 Attenuates Bacterial Load and Organ Failure During Acute Polymicrobial Sepsis. *Infection and Immunity* 2007;75:1690-7
- 117 Ghilardi, Kljavin, Chen, et al. Compromised Humoral and Delayed-Type Hypersensitivity Responses in Il-23-Deficient Mice. *Journal of immunology* 2004;172:2827-33
- 118 Herrmann. *Streptococcus Pneumoniae* Infection Aggravates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Via Toll-Like Receptor 2. *Infect. Immun.* 2006;74:4841-8
- 119 Schröder, Morath, Alexander, et al. Lipoteichoic Acid (Lta) of *Streptococcus Pneumoniae* and *Staphylococcus Aureus* Activates Immune Cells Via Toll-Like Receptor (Tlr)-2, Lipopolysaccharide-Binding Protein (Lbp), and Cd14, Whereas Tlr-4 and Md-2 Are Not Involved. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:15587-94
- 120 Reppe, Tschernig, Luhrmann, et al. Immunostimulation with Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Increased Survival in Murine Pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009;40:474-81
- 121 Yamamoto, Kawakami, Kinjo, et al. Essential Role for the P40 Subunit of Interleukin-12 in Neutrophil-Mediated Early Host Defense against Pulmonary Infection with *Streptococcus Pneumoniae*: Involvement of Interferon- $\gamma$ . *Microbes and Infection* 2004;6:1241-9
- 122 Sun, Salmon, Lotz, et al. Interleukin-12 Promotes Gamma Interferon-Dependent Neutrophil Recruitment in the Lung and Improves Protection against Respiratory *Streptococcus Pneumoniae* Infection. *Infection and Immunity* 2007;75:1196-202
- 123 Colino, Snapper. Two Distinct Mechanisms for Induction of Dendritic Cell Apoptosis in Response to Intact *Streptococcus Pneumoniae*. *The Journal of Immunology* 2003;171:2354-65
- 124 Littmann, Albiger, Frentzen, et al. *Streptococcus Pneumoniae* Evades Human Dendritic Cell Surveillance by Pneumolysin Expression. *EMBO Molecular Medicine* 2009;1:211-22
- 125 Hendriksen, Bootsma, van Diepen, et al. Strain-Specific Impact of Psa of *Streptococcus Pneumoniae* on Global Gene Expression and Virulence. *Microbiology* 2009;155:1569-79
- 126 Jothi, Manikandakumar, Ganesan, et al. On the Analysis of the Virulence Nature of Tigr4 and R6 Strains of *Streptococcus Pneumoniae* Using Genome Comparison Tools. *Journal of Chemical Sciences* 2007;119:559-63

- 127 Koppe, Högner, Doehn, et al. Streptococcus Pneumoniae Stimulates a Sting- and Ifn Regulatory Factor 3-Dependent Type I Ifn Production in Macrophages, Which Regulates Rantes Production in Macrophages, Cocultured Alveolar Epithelial Cells, and Mouse Lungs. *The Journal of Immunology* 2012;188:811-7
- 128 Hyams, Camberlein, Cohen, et al. The Streptococcus Pneumoniae Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. *Infection and Immunity* 2010;78:704-15
- 129 Medzhitov, Preston-Hurlburt, Janeway. A Human Homologue of the Drosophila Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature* 1997;388:394-7
- 130 McNeela, Burke, Neill, et al. Pneumolysin Activates the Nlrp3 Inflammasome and Promotes Proinflammatory Cytokines Independently of Tlr4. *PLoS pathogens* 2010;6:e1001191
- 131 Dessing, Hirst, de Vos, et al. Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Pulmonary Inflammation and Injury Induced by Pneumolysin in Mice. *PloS one* 2009;4:e7993
- 132 Malley, Henneke, Morse, et al. Recognition of Pneumolysin by Toll-Like Receptor 4 Confers Resistance to Pneumococcal Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100:1966-71
- 133 Witzenrath, Pache, Lorenz, et al. The Nlrp3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia. *Journal of immunology* 2011;187:434-40
- 134 Peral de Castro, Jones, Ni Cheallaigh, et al. Autophagy Regulates Il-23 Secretion and Innate T Cell Responses through Effects on Il-1 Secretion. *Journal of immunology* 2012;189:4144-53
- 135 Lammers, de Porto, de Boer, et al. The Role of Tlr2 in the Host Response to Pneumococcal Pneumonia in Absence of the Spleen. *BMC Infect Dis* 2012;12:139
- 136 Kagan, Su, Horng, et al. Tram Couples Endocytosis of Toll-Like Receptor 4 to the Induction of Interferon-[Beta]. *Nature immunology* 2008;9:361-8
- 137 Fang, Tsuchiya, Kawamura, et al. Critical Roles of Asc Inflammasomes in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to Streptococcus Pneumoniae Infection. *The Journal of Immunology* 2011;187:4890-9
- 138 Liu, Chen, Chu, et al. Interleukin (Il)-23 P19 Expression Induced by Il-1 $\beta$  in Human Fibroblast-Like Synoviocytes with Rheumatoid Arthritis Via Active Nuclear Factor-Kb and Ap-1 Dependent Pathway. *Rheumatology* 2007;46:1266-73
- 139 Rudner, Happel, Young, et al. Interleukin-23 (Il-23)-Il-17 Cytokine Axis in Murine Pneumocystis Carinii Infection. *Infection and Immunity* 2007;75:3055-61

- 140 Wiekowski, Leach, Evans, et al. Ubiquitous Transgenic Expression of the Il-23 Subunit P19 Induces Multiorgan Inflammation, Runting, Infertility, and Premature Death. *Journal of immunology* 2001;166:7563-70
- 141 Becher, Durell, Noelle. Il-23 Produced by Cns-Resident Cells Controls T Cell Encephalitogenicity During the Effector Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:1186-91
- 142 Cua, Sherlock, Chen, et al. Interleukin-23 Rather Than Interleukin-12 Is the Critical Cytokine for Autoimmune Inflammation of the Brain. *Nature* 2003;421:744-8
- 143 Rudner, Happel, Young, et al. Interleukin-23 (Il-23)-Il-17 Cytokine Axis in Murine *Pneumocystis Carinii* Infection. *Infection and Immunity* 2007;75:3055-61
- 144 Qin, Wang, Feng, et al. Tgf-Beta Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of Socs3. *Journal of immunology* 2009;183:97-105
- 145 Lee, Awasthi, Yosef, et al. Induction and Molecular Signature of Pathogenic Th17 Cells. *Nature immunology* 2012;13:991-9
- 146 McGeachy, Cua. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity* 2008;28:445-53
- 147 McGeachy, Chen, Tato, et al. The Interleukin 23 Receptor Is Essential for the Terminal Differentiation of Interleukin 17-Producing Effector T Helper Cells in Vivo. *Nature immunology* 2009;10:314-24
- 148 McGeachy, Bak-Jensen, Chen, et al. Tgf-Beta and Il-6 Drive the Production of Il-17 and Il-10 by T Cells and Restrain T(H)-17 Cell-Mediated Pathology. *Nature immunology* 2007;8:1390-7
- 149 Acosta-Rodriguez, Napolitani, Lanzavecchia, et al. Interleukins 1beta and 6 but Not Transforming Growth Factor-Beta Are Essential for the Differentiation of Interleukin 17-Producing Human T Helper Cells. *Nature immunology* 2007;8:942-9
- 150 Spits, Artis, Colonna, et al. Innate Lymphoid Cells--a Proposal for Uniform Nomenclature. *Nature reviews. Immunology* 2013;13:145-9
- 151 Buonocore, Ahern, Uhlig, et al. Innate Lymphoid Cells Drive Interleukin-23-Dependent Innate Intestinal Pathology. *Nature* 2010;464:1371-5
- 152 Whittington, Armstrong, Uppington, et al. Interleukin-22: A Potential Immunomodulatory Molecule in the Lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004;31:220-6

- 153 van Zoelen, Schouten, de Vos, et al. The Receptor for Advanced Glycation End Products Impairs Host Defense in Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology* 2009;182:4349-56
- 154 Knapp, Wieland, van 't Veer, et al. Toll-Like Receptor 2 Plays a Role in the Early Inflammatory Response to Murine Pneumococcal Pneumonia but Does Not Contribute to Antibacterial Defense. *The Journal of Immunology* 2004;172:3132-8
- 155 van der Windt, Hoogendijk, de Vos, et al. The Role of Cd44 in the Acute and Resolution Phase of the Host Response During Pneumococcal Pneumonia. *Lab Invest* 2011;91:588-97
- 156 Olliver, Hiew, Mellroth, et al. Human Monocytes Promote Th1 and Th17 Responses to *Streptococcus Pneumoniae*. *Infect Immun* 2011;79:4210-7
- 157 Marqués, Rial, Muñoz, et al. Protection against *Streptococcus Pneumoniae* Serotype 1 Acute Infection Shows a Signature of Th17- and Ifn- $\Gamma$ -Mediated Immunity. *Immunobiology* 2012;217:420-9
- 158 Moffitt, Gierahn, Lu, et al. Th17-Based Vaccine Design for Prevention of *Streptococcus Pneumoniae* Colonization. *Cell Host & Microbe* 2011;9:158-65
- 159 Zhang, Clarke, Weiser. Cellular Effectors Mediating Th17-Dependent Clearance of Pneumococcal Colonization in Mice. *The Journal of clinical investigation* 2009;119:1899-909
- 160 Ma, Wang, Wan, et al. Morphine Disrupts Interleukin-23 (Il-23)/Il-17-Mediated Pulmonary Mucosal Host Defense against *Streptococcus Pneumoniae* Infection. *Infection and Immunity* 2010;78:830-7
- 161 de Jager, van Wijk, Mathoera, et al. Lymphocytopenia and Neutrophil-Lymphocyte Count Ratio Predict Bacteremia Better Than Conventional Infection Markers in an Emergency Care Unit. *Critical Care* 2010;14:R192
- 162 Witznath, Gutbier, Schmeck, et al. Phosphodiesterase 2 Inhibition Diminished Acute Lung Injury in Murine Pneumococcal Pneumonia. *Crit Care Med* 2009;37:584-90
- 163 Witznath, Gutbier, Hocke, et al. Role of Pneumolysin for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Crit Care Med* 2006;34:1947-54
- 164 Wang, Ma, Charboneau, et al. Morphine Inhibits Murine Dendritic Cell Il-23 Production by Modulating Toll-Like Receptor 2 and Nod2 Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:10225-32

## **7. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Vincent van Laak, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von IL-23 in der Pneumokokkenpneumonie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **8. Lebenslauf**

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

## 9. Publikationsliste

- 1 Mergenthaler, Kahl, Kamitz, et al. Mitochondrial Hexokinase Ii (Hkii) and Phosphoprotein Enriched in Astrocytes (Pea15) Form a Molecular Switch Governing Cellular Fate Depending on the Metabolic State. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109:1518-23
- 2 Opitz, van Laak, Eitel, et al. Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010; 181:1294-309
- 3 Buss, Opitz, Hocke, et al. Essential Role of Mitochondrial Antiviral Signaling, Ifn Regulatory Factor (Irf)3, and Irf7 in Chlamydomphila Pneumoniae-Mediated Ifn-Beta Response and Control of Bacterial Replication in Human Endothelial Cells. *J Immunol* 2010; 184:3072-8
- 4 Witzenrath, Gutbier, Schmeck, et al. Phosphodiesterase 2 Inhibition Diminished Acute Lung Injury in Murine Pneumococcal Pneumonia. *Critical care medicine* 2009; 37:584-90
- 5 Reppe, Tschernig, Luhrmann, et al. Immunostimulation with Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Increased Survival in Murine Pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009; 40:474-81
- 6 Schmeck, Lorenz, N'Guessan P, et al. Histone Acetylation and Flagellin Are Essential for Legionella Pneumophila-Induced Cytokine Expression. *J Immunol* 2008; 181:940-7
- 7 Lippmann, Rothenburg, Deigendesch, et al. Ifnbeta Responses Induced by Intracellular Bacteria or Cytosolic DNA in Different Human Cells Do Not Require Zbp1 (Dlm-1/Dai). *Cellular microbiology* 2008; 10:2579-88
- 8 Slevogt, Schmeck, Jonatat, et al. Moraxella Catarrhalis Induces Inflammatory Response of Bronchial Epithelial Cells Via Mapk and Nf-Kappab Activation and Histone Deacetylase Activity Reduction. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2006;290: L818-26
- 9 Schmeck, Moog, Zahlten, et al. Streptococcus Pneumoniae Induced C-Jun-N-Terminal Kinase- and Ap-1 -Dependent Il-8 Release by Lung Epithelial Beas-2b Cells. *Respiratory research* 2006; 7:98
- 10 Schmeck, Beermann, van Laak, et al. Listeria Monocytogenes Induced Rac1-Dependent Signal Transduction in Endothelial Cells. *Biochemical pharmacology* 2006; 72:1367-74
- 11 Opitz, Vinzing, van Laak, et al. Legionella Pneumophila Induces Ifnbeta in Lung Epithelial Cells Via Ips-1 and Irf3, Which Also Control Bacterial Replication. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281:36173-9

- 12 Opitz, Puschel, Beermann, et al. *Listeria Monocytogenes* Activated P38 Mapk and Induced Il-8 Secretion in a Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Manner in Endothelial Cells. *J Immunol* 2006; 176:484-90
- 13 Schmeck, Beermann, van Laak, et al. Intracellular Bacteria Differentially Regulated Endothelial Cytokine Release by Mapk-Dependent Histone Modification. *J Immunol* 2005; 175:2843-50
- 14 Schmeck, Zahlten, Moog, et al. *Streptococcus Pneumoniae*-Induced P38 Mapk-Dependent Phosphorylation of Rela at the Interleukin-8 Promotor. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279:53241-7

## **10. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Suttorp für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seiner Klinik zu verfassen und für die persönliche Förderung, die ich durch ihn bereits erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. Bastian Opitz danke ich für die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Finanzierung der vorliegenden Arbeit. Seine Geduld und Ausdauer haben diese Dissertation erst ermöglicht. Durch seine Offenheit und Freude an der Forschung vermittelte er mir einen Einblick in die spannende Welt der Wissenschaft, zeigte mir aber auch immer wieder die Fallstricke und Probleme, die eine wissenschaftliche Karriere mit sich bringt. Dadurch war es mir über die lange Zeit der gemeinsamen Arbeit und Freundschaft möglich meine Forschung, aber auch meine persönliche und berufliche Laufbahn besser zu planen und zu überdenken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Witzenrath und Dr. Katrin Reppe, ohne die eine Durchführung der tierexperimentellen Teile meiner Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Danke auch an meine Freunde und Kollegen aus dem Labor, durch die die langen Stunden in der Zellkultur, an der PCR und im Chemielabor so viel schöner und erträglicher geworden sind. Mein besonderer Dank geht dabei an Janine Zahlten, die mir nicht nur die Pneumokokkenkultur beigebracht hat. Vielen Dank auch an die anderen wissenschaftlichen Mitarbeiter im Labor, an die MTAs und an Frau Hartstein für die immer benötigte Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen Problemen.

Vielen Dank auch den Gutachtern und Lesern meiner Doktorarbeit, die sich die Zeit genommen haben, diese Dissertation zu beurteilen.

Was wäre ich ohne meine Eltern! Ihnen habe ich meine Existenz zu verdanken. Ihre Mühe, ihre Zeit und ihr Wille haben es mir ermöglicht, der Mensch zu werden, der ich heute bin. Ich bin ihnen unendlich dankbar dafür, dass sie mir die Erziehung und die Bildung ermöglicht haben, die mich dahin gebracht haben wo ich heute bin. Ihre fortdauernde Unterstützung in allen Lebenslagen, ihre Freundschaft und Liebe tragen mich über alle Hürden des Lebens und lassen

mich die schönen Seiten des Lebens noch mehr genießen. Dafür bin ich ihnen unendlich dankbar!

Es sind manchmal die kleinsten Zufälle im Leben, die alles verändern. Ein eben solcher Zufall führte mich an die Seite meiner Frau. Ohne sie könnte ich nicht der Mensch sein, der ich bin. Ohne sie könnte ich nicht die Arbeit machen, die ich so gerne mache. Ohne sie, wäre diese Dissertation vielleicht nie geschrieben worden. Ich danke ihr für all die Unterstützung, dafür dass sie mir den Rücken freihält und immer da ist, wenn ich sie am meisten brauche. Und ich danke ihr für die zwei größten Geschenke, die man mir machen kann. Ihre Liebe und unseren wundervollen Sohn.

Meinem Sohn danke ich für sein Lächeln am Morgen, dass mich motiviert in den Tag starten lässt, und sein freudiges Willkommen am Abend, dass mir immer wieder bewusst macht, wofür ich lebe. Ich danke ihm auch für seine Geduld und für sein Verständnis, wenn Papa mal wieder keine Zeit hat und arbeiten muss. Ganz besonders danke ich ihm aber für die Kraft die er mir gibt, immer wieder aufs Neue spannende Abenteuer mit ihm zu erleben. Ich hoffe, dass er immer so neugierig bleiben möge und die Welt durch seine Augen weiterhin ganz neu entdeckt.

Mein Dank gilt auch meinem Freund Dr. Philipp Mergenthaler für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Dissertation. Vielen Dank auch für die vielen schönen Stunden, die wir gemeinsam verbracht haben und uns gegenseitig unterstützt und aufgemuntert haben.

Vielen Dank!