

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

# **Die Rolle von IL-17C und IL-17RE bei obstruktiven Lungenerkrankungen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2020

vorgelegt von: Giovanna Vella  
geb. am: 22.08.1989 in Bergisch Gladbach

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität des Saarlandes als Dissertation

Tag der Promotion: 15.12.2020

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Ch. Beisswenger

Prof. T. Speer

## Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

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

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

1. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. PD Dr. Christoph Beisswenger: Betreuung der Doktorarbeit, Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
3. Dr. Christian Herr: Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
4. Anja Honecker: Tierhaltung, Hilfestellung bei intranasaler Infektion, technische Assistenz
5. Dr. Michael Wegmann: Kollaboration bei den Asthmaversuchen
6. Dr. Lars Lunding: Kollaboration bei den Asthmaversuchen
7. Andreas Kamyschnikow: Tierhaltung, Immunhistochemische Färbungen, Sputum Aufbereitung, Auszählung des Differentialzellbildes, technische Assistenz
8. Felix Ritzmann: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
9. Dr. Lisa Wolf: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
10. Victoria Weinhold: Sputum Aufbereitung, technische Assistenz

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer

Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

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

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

**The IL-17 receptor IL-17RE mediates polyIC-induced exacerbation of experimental allergic asthma**

Vella G, Lunding L, Ritzmann F, Honecker A, Herr C, Wegmann M, Bals R, Beisswenger C.

Respiratory Research 2020.

**IL-17C associates with disease severity during acute exacerbation of COPD and promotes inflammation-induced lung damage**

Vella G, Ritzmann F, Wolf L, Kamyschnikow A, Stodden H, Herr C, Hortense S, Bals R, Beisswenger C.

Zur Publikation eingereicht.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
1 Zusammenfassung.....	V
Summary .....	VII
2 Einleitung .....	1
2.1 Definition und Klassifizierung der COPD .....	1
2.1.1 Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD .....	2
2.1.2 Rolle der Makrophagen und Neutrophile in COPD.....	5
2.1.2.1 Makrophagen .....	5
2.1.2.2 Neutrophile Granulozyten .....	6
2.2 Asthma bronchiale.....	8
2.2.1 Th1 /Th2/ Th17 Antwort.....	11
2.2.2 Asthma – Exazerbation .....	13
2.2.3 IL-17A im experimentellen Asthma-Modell.....	14
2.3 IL-17 Zytokin – und Rezeptorfamilie .....	15
2.3.1 IL-17/IL-17RE vermittelte Entzündung .....	15
2.4 Zielsetzung .....	20
3 Material und Methoden .....	21
3.1 Materialien .....	21
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	21
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.3 Geräte .....	24
3.2 Methoden .....	25
3.2.1 Versuchstiere .....	25
3.2.2 Versuchsmodelle.....	25

3.2.2.1 Allergisches Asthma-Modell mit und ohne Exazerbation .....	25
3.2.2.2 PBS scheinensensibilisierte Mäuse und pIC behandelte Versuchstiere ...	26
3.2.2.3 Akutes COPD-Mausmodell .....	27
3.2.2.4 Chronisches CS-Mausmodell.....	28
3.2.2.5 Chronisches NTHi-Mausmodell .....	29
3.2.3 Herstellung von nontypeable NTHi Lysat .....	29
3.2.4 Invasive Lungenfunktionsmessung .....	30
3.2.5 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL) und Bestimmung der Anzahl der Gesamtleukozyten .....	30
3.2.6 Erstellung und Auszählung der Cytospin-Präparate.....	31
3.2.7 Verarbeitung der Lunge.....	31
3.2.7.1 Herstellung des Lungenhomogenisates.....	32
3.2.7.2 RNA Isolierung.....	32
3.2.7.3 cDNA Synthese.....	32
3.2.7.4 Quantitative RT-PCR .....	33
3.2.8 Messung der Zytokine .....	34
3.2.8.1 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).....	34
3.2.8.2 Luminex Multiplex Assay .....	35
3.2.9 Präparation der Lunge für histologische Färbungen .....	35
3.2.9.1 Immunhistochemische Färbung .....	36
3.2.10 Inflammatorischer Score .....	37
3.2.11 Stereologische Auswertung .....	38
3.2.12 Sputum-Gewinnung bei akut exazerbierten COPD-Patienten .....	38
3.3 Statistische Analysen .....	38
4 Ergebnisse .....	40
4.1 Analyse von Entzündungsmediatoren im Sputum von COPD-Patienten während einer AECOPD .....	40
4.1.1 Stammdaten des untersuchten Patientenkollektivs.....	40

4.1.2	IL-17C ist im Sputum bei fortgeschrittener COPD erhöht.....	41
4.1.3	IL-17C korreliert negativ mit IL-17E/IL-25.....	44
4.2	Funktion von IL-17C in COPD-Mausmodellen.....	46
4.2.1	IL-17C hat keinen Einfluss auf den CS-induzierten Anstieg der Anzahl der Entzündungszellen.....	46
4.2.2	IL-17C vermittelt eine akute Entzündung der Lunge .....	47
4.2.3	IL-17C vermittelt chronische neutrophile Entzündung der Lunge .....	50
4.3	pIC induziert eine akute Entzündungsreaktion in der Lunge unabhängig von dem IL-17C Rezeptor IL-17RE .....	57
4.4	Funktion von IL-17RE bei der allergischen Entzündung der Lunge.....	59
4.4.1	IL-17RE reguliert die Expression von Zytokinen und Chemokinen bei der pIC-induzierten Exazerbation des experimentellen Asthmas .....	60
4.4.2	IL-17RE vermittelt die pIC-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im experimentellen Asthma.....	64
4.4.3	Die Defizienz von IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die Atemwegs-Hyperreaktivität .....	66
5	Diskussion.....	69
5.1	IL-17C assoziiert mit der Schwere der Erkrankung bei AECOPD.....	69
5.2	IL-17C vermittelt NTHi-induzierten Lungenschaden .....	71
5.3	Funktion von IL-17RE bei der Entwicklung einer OVA-induzierten allergischen Entzündung .....	74
5.4	Funktion von IL-17RE bei der pIC-induzierten Exazerbation im experimentellen Asthma-Modell .....	75
6	Literaturverzeichnis .....	77
7	Anhang.....	98
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	98
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	101
7.3	Tabellenverzeichnis.....	104



7.4	Publikationen .....	105
7.5	Kongressbeiträge .....	107
7.6	Danksagung .....	108
7.7	Lebenslauf .....	109

# 1 Zusammenfassung

Die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und das Asthma bronchiale gehören zu den häufigsten Erkrankungen der Lunge. Auch wenn sich die Pathogenese unterscheidet, führt die chronische Entzündung der Lunge bei beiden Erkrankungen zu einem Verlust der Lungenfunktion. Zigarettenrauch ist die Hauptursache für die COPD. Darüber hinaus geht die COPD mit einem veränderten Mikrobiom der Lunge einher, sodass auch nach einer Raucherentwöhnung Infektionen mit gramnegativen Bakterien wie nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) maßgeblich zur chronischen Entzündung der Lunge bei COPD-Patienten beitragen. Zudem lösen bakterielle und virale Infektionen Exazerbationen aus, die durch akute Verschlechterung der Erkrankung gekennzeichnet sind. Beim Asthma bronchiale, führen virale Infekte zu einer Verstärkung der Entzündung in den Atemwegen und insgesamt zu einer Verschlechterung der Symptome.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des epithelialen Zytokins IL-17C und dessen spezifischen Rezeptors IL-17RE bei den obstruktiven Atemwegserkrankungen COPD und Asthma bronchiale untersucht.

Die Interleukine IL-17A, IL-17C und IL-17E wurden im Spontansputum von COPD-Patienten während einer AECOPD nachgewiesen, wobei nur die Konzentrationen von IL-17C mit der Schwere der Erkrankung assoziierten. Die Funktion von IL-17C wurde in einem murinen Modell der NTHi-induzierten pulmonalen Entzündung untersucht. In diesem Modell führte, wie in gängigen LPS/Elastase-abhängigen COPD-Modellen, die 4-wöchige Exposition mit inaktivierten NTHi zu einer neutrophilen Entzündung und zu einem Lungenschaden. Versuche mit IL-17C-defizienten Tieren zeigten, dass IL-17C eine akute und chronische NTHi-induzierte neutrophile Entzündung der Lunge vermittelt. Dies ging mit verminderten Konzentrationen des Zytokins G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) einher. G-CSF trägt entscheidend zur Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, sowie zur Rekrutierung und Langlebigkeit der neutrophilen Granulozyten in entzündeten Geweben bei. Zudem war der NTHi-induzierte Lungenschaden, der über den mean chord length (MCL) ermittelt wurde, in den IL-17C-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp (WT) Mäusen signifikant vermindert. Bei der rauchinduzierten Entzündung der Lunge konnte für IL-17C keine Funktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse

legen nahe, dass IL-17C bei der COPD eine durch Bakterien hervorgerufene pulmonale Entzündung vermittelt. Bei der rauchinduzierten Entzündung scheint IL-17C jedoch keine Funktion zu haben.

Präklinische Studien zeigten, dass IL-17A und IL-17RA die Entwicklung einer allergischen Entzündung der Atemwege und Atemwegs-Hyperreaktivität (AHR) über die Rekrutierung von Entzündungszellen und Induktion der Kontraktion der glatten Muskulatur vermitteln. Da gezeigt wurde, dass IL-17C einen Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RE benötigt, um Zielzellen zu aktivieren, wurde in dieser Arbeit geprüft, ob der spezifische IL-17C-Rezeptor IL-17RE eine Funktion im OVA-induzierten experimentellen Asthma-Modell hat. Versuche mit IL-17RE-defizienten Tieren zeigten, dass IL-17RE für die Entwicklung einer OVA-induzierten allergischen Entzündung der Lunge und AHR nicht erforderlich ist. Während der Replikation respiratorischer Viren, die Exazerbationen beim Asthma auslösen, wird doppelsträngige RNA (dsRNA) als Zwischenprodukt gebildet, die vom Immunsystem über Mustererkennungsrezeptoren wie dem Toll-like Rezeptor (TLR) -3 erkannt wird. Zudem zeigten Studien, dass das Polyinosinic-polycytidylic acid (pIC), was synthetisch analog zur doppelsträngigen RNA ist und respiratorische Viren die Expression von IL-17C im Atemwegsepithel induzieren. Daher wurde in Mausversuchen durch die intranasale Applikation von pIC eine Exazerbation des experimentellen allergischen Asthmas ausgelöst. Bei einer akuten pIC-induzierten Entzündung der Lunge in Abwesenheit einer allergischen Entzündung zeigten Versuche mit IL-17RE-defizienten Mäusen keine Funktion des IL-17RE Rezeptors. Hingegen führt bei bestehender allergischer Entzündung der Lunge die Gabe von pIC zu einer verstärkten Entzündung, die IL-17RE abhängig ist. Die pulmonalen Konzentrationen entzündlicher Zytokine, die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den BAL-Flüssigkeiten und die Anzahl von Ly6B<sup>+</sup> Zellen im Lungenparenchym waren bei IL-17RE-defizienten Mäusen verringert. Zudem führte die Defizienz für IL-17RE zu einer teilweisen Reduktion der AHR in pIC-behandelten Mäusen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass IL-17RE keinen direkten Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskulatur hat, aber eine durch Viren hervorgerufene Entzündung der Lunge bei vorhandenem Asthma bronchiale vermittelt.

## Summary

### **The role of IL-17C and IL-17RE in obstructive lung diseases**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and bronchial asthma are among the most common diseases of the lung. Although the pathogenesis is different, chronic inflammation of the lung leads to a loss of lung function in both diseases. The main cause of COPD is cigarette smoke. In addition, COPD is associated with an altered microbiome of the lung, so that even after giving up smoking, infections with gram-negative bacteria such as nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) contribute significantly to chronic inflammation of the lung in COPD patients. Bacterial and viral infections trigger exacerbations, which are characterized by acute deterioration of the condition. In bronchial asthma viral infections frequently lead to an increase of inflammation of the airways and worsening of the symptoms.

The aim of this work was to investigate the role of the epithelial cytokine IL-17C and its specific receptor IL-17RE in COPD and bronchial asthma.

The interleukins IL-17A, IL-17C and IL-17E were detected in spontaneous sputum of COPD patients during AECOPD. Only concentrations of IL-17C were associated with disease severity. The function of IL-17C in a murine model of NTHi-induced pulmonary inflammation was further investigated. As seen in common LPS/elastase-dependent COPD models, four-week exposure to inactivated NTHi led to neutrophilic inflammation and lung damage. Experiments with IL-17C-deficient animals showed that IL-17C mediates acute and chronic NTHi-induced neutrophilic inflammation of the lung. This was accompanied by reduced concentrations of the cytokine G-CSF. G-CSF decisively contributes to the release and recruitment of neutrophils from bone marrow and increases longevity of neutrophils in inflamed tissues. In addition, NTHi-induced lung damage which was characterized by an increase in mean chord length (MCL) was significantly reduced in IL-17C-deficient mice compared to WT mice. However, no impact for IL-17C could be detected in smoke-induced lung inflammation. These results suggest that IL-17C mediates bacterial-induced pulmonary inflammation in COPD, even though it appears to have no function in smoke-induced inflammation.

Preclinical studies have shown that IL-17A and IL-17RA mediate the development of respiratory allergic inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) by recruiting inflammatory cells and inducing smooth muscle contraction. Since IL-17C has been shown to require a receptor complex of IL-17RA and IL-17RE to activate target cells, this work examined whether the specific IL-17C receptor IL-17RE has a function in the OVA-induced experimental asthma model. Experiments with IL-17RE-deficient animals showed that IL-17RE is not required for the development of OVA-induced allergic inflammation of the lung and AHR. During replication of respiratory viruses that cause exacerbations in asthma, double-stranded RNA (dsRNA) is produced as an intermediate product that is recognized by the immune system via pattern recognition receptors such as Toll-like receptor (TLR) -3. Several studies have also shown that the synthetic analogue of double-stranded RNA polyinosinic-polycytidylic acid (pIC) and respiratory viruses induce the expression of IL-17C in the respiratory epithelium. The intranasal application of pIC in mouse experiments triggered an exacerbation of experimental allergic asthma. Ablation of IL-17RE did not affect pIC-induced inflammation of the lung in the absence of allergic lung inflammation, whereas treatment of mice with pIC showed an exacerbated pulmonary inflammation in mice suffering from experimental asthma in an IL-17RE-dependent manner. The pulmonary concentrations of inflammatory cytokines, the number of neutrophil granulocytes in the BAL fluids and the number of Ly6B+ cells in the lung parenchyma were reduced in IL-17RE-deficient mice. In addition, the deficiency for IL-17RE led to a partial reduction of AHR in pIC-treated mice. Thus, the results suggest that IL-17RE appears to mediate lung inflammation caused by viral infections in the presence of bronchial asthma but does not directly influence smooth muscle contraction.

## 2 Einleitung

### 2.1 Definition und Klassifizierung der COPD

Millionen von Menschen leiden an der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), die global zu den vier häufigsten Todesursachen gehört [2-4]. Eine weltweite Studie zeigte, dass die Krankheitsprävalenz in der Bevölkerung bei >40 Jahren ungefähr bei 10% liegt und die COPD ein großes Gesundheitsproblem bleiben wird, bis bessere Präventions- und Behandlungsmethoden gefunden werden [5, 6]. Die COPD ist prinzipiell nicht heilbar, sodass Therapien nur die Symptome lindern und bestenfalls das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen. Zudem bleibt die COPD oftmals im frühen Stadium unerkannt und es wird nicht rechtzeitig interveniert [7]. Die COPD geht mit lokalen und systemischen Entzündungen der Lunge einher. Die Lungenfunktion lässt mit Voranschreiten der Erkrankung bis zur Ateminsuffizienz nach, welche meist mit einer Herzinsuffizienz einhergeht und zum Tod des Erkrankten führt [8]. Charakteristische Symptome der COPD sind: chronische und fortschreitende Kurzatmigkeit, chronischer Husten und Sputumproduktion [5]. Zudem können strukturelle Veränderungen der Lunge stattfinden: Umbau der kleinen Atemwege, Verlust des Lungenparenchyms bis hin zum Emphysem, vaskulärer Umbau und pulmonale Hypertonie [9]. Daher wird für die Diagnose eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt und gegebenenfalls ein Röntgenbild der Lunge erstellt. Dies erlaubt die COPD in verschiedene Stadien zu unterteilen. Bei der Lungenfunktionsmessung wird die Luftstrombegrenzung ermittelt. Hierbei wird das Verhältnis zwischen der Einsenkungskapazität ( $FEV_1$ , Forced Expiratory Pressure in 1 Second) und der forcierten Vitalkapazität ermittelt. Der  $FEV_1$ -Wert beschreibt das Luftvolumen, welches von der Gesamtlungenkapazität in 1 Sekunde zwangsweise ausgeatmet werden kann. Der FVC Wert beschreibt das Lungenvolumen, welches nach maximaler Einatmung mit maximaler Geschwindigkeit ausgeatmet werden kann [5]. Wird der  $FEV_1$ -Wert mit dem FVC-Wert ins Verhältnis gesetzt, kann das Stadium der COPD bestimmt werden. Seit 1998 gibt es die Globale Initiative für chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (GOLD). Die Initiative verfolgt das Ziel, die Prävention und das Management der COPD zu verbessern und das Forschungsinteresse an der COPD zu fördern [5]. Die COPD

wird laut GOLD in den Industrieländern weiter zunehmen [5]. Die GOLD unterteilt die COPD in vier GOLD-Stadien, 1 (mild) bis 4 (sehr schwer). Wenn der FEV<sub>1</sub>/FVC-Wert <70%, spricht man von einer COPD und ordnet sie in eines der vier COPD Stadien (Tab. 1) ein [5, 7].

**Tabelle 1: COPD Klassifizierung nach GOLD (nach [5, 7]).**

<b>GOLD Status</b>	<b>Patienten mit FEV<sub>1</sub>/FVC &lt; 0.70</b>	
<b>1</b>	Mild	FEV <sub>1</sub> ≥ 80% soll
<b>2</b>	Moderat	50% ≤ FEV <sub>1</sub> < 80% soll
<b>3</b>	Schwer	30% ≤ FEV <sub>1</sub> < 50% soll
<b>4</b>	Sehr schwer	FEV <sub>1</sub> < 30% soll

### 2.1.1 Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD

Zigarettenrauch gilt als größter Risikofaktor für die COPD [7, 10]. Zudem gelten aber auch industriell - und verkehrsbedingte Luftverschmutzung [11], beruflich bedingte Inhalation von Schadstoffen wie Stäube und Dämpfe [11, 12] und häusliche Luftverschmutzung in Entwicklungsländern durch offene Feuer als Risikofaktoren für die COPD. Auch wenn Zigarettenrauch häufig ursächlich für die COPD ist, entwickelt nicht jeder Raucher eine COPD. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass eine genetische Veranlagung die Entwicklung der COPD begünstigt. Ein Sonderfall stellt der Alpha-1-Antitrypsin-Mangel dar. Bei dieser Erkrankung kommt es erblich bedingt zu einem Mangel an Proteaseinhibitoren. Dies führt zu einem stark erhöhten Risiko an einer COPD zu erkranken, besonders wenn die betroffenen Menschen rauchen [13-15].

Die bakterielle Zusammensetzung der Lunge unterscheidet sich zwischen COPD-Patienten und gesunden Menschen [16-18]. Das Mikrobiom der gesunden Lunge besteht aus Bakterien, die hauptsächlich über die eingeatmete Luft und Mikroaspiration die Atemwege erreichen. Es ähnelt sehr stark dem Mikrobiota der Mundhöhle und des Rachenraums [19]. In der gesunden Lunge vermehren sich Bakterien kaum und werden fortlaufend eliminiert. Bei Rauchern und besonders bei

COPD-Patienten stellt sich die Situation anders dar. Die toxischen Substanzen, die beim Zigarettenrauch entstehen oder in verschmutzter Luft enthalten sind, stören in der Lunge die Gewebemöostase. Dies beeinträchtigt die Wirtsabwehr und führt zu Veränderungen der angeborenen und adaptiven Immunantwort des Wirtes [20-22]. Die Besiedlung der Lunge mit potenziell pathogenen Bakterien, bei denen es sich häufig um Proteobacteria handelt, wird begünstigt.

Ein wichtiger Abwehrmechanismus, um die Pathogene aus den Atemwegen zu eliminieren, ist die mukoziliäre Klärung. Die Atemwege sind mit Zilien ausgekleidet und können durch Bewegung inhalierte Partikel und sekretiertem Schleim aus den Atemwegen heraus befördern. Bei einem gesunden Patienten gewährleistet die mukoziliäre Klärung des respiratorischen Flimmerepithels, dass Fremdkörper, wie zum Beispiel Staubpartikel, Bakterien, Viren etc. durch koordinierte Bewegungen in Richtung Rachen befördert werden. Wird die Bildung von Zilien und der Zilienschlag durch Tabakrauch beeinträchtigt, können sich mikrobielle Krankheitserreger in den unteren Atemwegen ansiedeln. Auch eine erhöhte Schleimsekretion beeinträchtigt die mukoziliäre Klärung [22]. Eine gestörte mukoziliäre Reinigung führt bei Rauchern und COPD-Patienten zu Lungeninfektionen, chronischer Entzündung und Gewebeerstörungen [23, 24].

Die epithelialen Oberflächen der Lunge sind zudem nährstoffarm und wirken so dem Wachstum von Bakterien entgegen. Eine Entzündung führt zur Freisetzung von Nährstoffen, die gerade Pathogene aus der Gruppe der Protobacteria wie *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* für ihr Wachstum nutzen können. All dies begünstigt wiederkehrende und chronische Infektionen der Lunge und verstärkt höchstwahrscheinlich in einem Teufelskreis die pulmonale Entzündung. Dabei wirkt die pathogene Besiedlung der Atemwege als Entzündungsstimulus und kann zum Fortschreiten der Krankheit beitragen [22, 25]. So kann sich die mikrobielle Besiedlung der unteren Atemwege bei Patienten mit COPD auch nach Raucherentwöhnung fortsetzen. Die chronische Besiedelung der unteren Atemwege mit Pathogenen induziert Entzündungen, verstärkt die Mukussektion und kann zu fortschreitender Obstruktion des Luftstroms und zu Lungenschäden beitragen, welche charakteristisch für die COPD sind [22, 26, 27].

Akute Infektionen der Atemwege mit Viren oder Bakterien führen zu Episoden erhöhter Entzündungen und verschlimmerten Symptomen, was klinisch als akute Exazerbation (AECOPD) diagnostiziert wird [22]. Exazerbationen können durch Viren und Bakterien



ausgelöst werden. Bei den Viren ist der häufigste Vertreter das Rhinovirus, gefolgt vom Parainfluenza Virus. Hingegen sind die häufigsten Bakterien, die bei Exazerbationen eine Rolle spielen, *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und *P. aeruginosa* (Tab. 2) [22]. Die Besiedlung der Lunge mit *H. influenzae* macht 20-30% der Exazerbationen aus (Tab. 2) und ist das Hauptpathogen bei stabiler COPD [22].

**Tabelle 2: Bakterienpathogene, die bei Exazerbationen und stabiler COPD beteiligt sind (nach [22]).**

Bakterium	Rolle in Exazerbationen	Rolle bei stabiler COPD
<i>Haemophilus influenzae</i>	20-30%	Hauptpathogen
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10-15%	Geringe Rolle
<i>Moraxella catarrhalis</i>	10-15%	Geringe Rolle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5-10%, bei fortgeschrittener Erkrankung	bei fortgeschrittener Krankheit
<i>Enterobacteriaceae</i>	Bei fortgeschrittener Erkrankung isoliert, pathogene Bedeutung unbekannt	Unbekannt
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Häufig isoliert, selten Ursache	Unwahrscheinlich
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Häufig isoliert, selten Ursache	Unwahrscheinlich
<i>Staphylococcus aureus</i>	Selten isoliert, selten Ursache	Häufig detektiert
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	3-5%	häufig detektiert, pathogene Bedeutung unbekannt

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1-2%	unwahrscheinlich
------------------------------	------	------------------

## 2.1.2 Rolle der Makrophagen und Neutrophile in COPD

Es wird angenommen, dass neutrophile Granulozyten und Makrophagen, deren Rekrutierung und Aktivierung durch Zytokine und Chemokine wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ), GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor), G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor) und IL-8 (Interleukin-8) vermittelt wird, maßgeblich zur Pathogenese der COPD beitragen [8, 28, 29]. Einige Zytokine, wie zum Beispiel G-CSF ist sowohl beim Menschen als auch in der Maus vorhanden. Hingegen ist IL-8 in der Maus nicht vorhanden. Homolog zum humanem IL-8 besitzt die Maus KC (Keratinocyte chemoattractant), was beispielsweise die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten vermittelt.

### 2.1.2.1 Makrophagen

Makrophagen sind in verschiedenen Geweben und Organen wiederzufinden und sind für die Homöostase des Gewebes wichtig. Die sessilen, sich an der Oberfläche der Alveolen befindenden Makrophagen, werden als Alveolarmakrophagen bezeichnet. Die Alveolarmakrophagen sind eine der wichtigsten Immunzellen des angeborenen Immunsystems der Lunge [30] und sehr langlebig [31]. Mausstudien zeigten, dass residente Alveolarmakrophagen auf Monozyten zurückgehen, die schon während der Embryogenese und kurz nach der Geburt die Lunge besiedeln und sich durch Proliferation von selbst erneuern [32, 33]. Alveolarmakrophagen können sich im Fall einer Infektion aber auch aus Monozyten der Blutbahn entwickeln, die aus der Blutzirkulation in das pulmonale Gewebe rekrutiert werden können [34]. Makrophagen können mithilfe der Phagozytose Krankheitserreger eliminieren. In der Lunge gehören residente Alveolarmakrophagen zu den ersten Zellen, die mit Erregern in Kontakt kommen und eine Abwehrreaktion einleiten. Kommen Alveolarmakrophagen mit harmlosen Substanzen in Kontakt, zeigen sie eine geringe phagozytotische Aktivität und setzen kaum proinflammatorische Mediatoren frei [31, 35]. Kommen Makrophagen

mit Bakterien in Kontakt, werden sie in der Regel über Pattern Recognition Receptors (PRRs) aktiviert und lösen durch Abgabe proinflammatorischer Mediatoren eine lokale Entzündungsreaktion aus [28, 31]. Über die Sekretion von Zytokinen wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  können Makrophagen Epithelzellen der Lunge aktivieren. Dies führt in Epithelzellen zu einer erhöhten Expression von PRRs und Sekretion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden [36, 37]. Es wird angenommen, dass es bei der COPD durch die Beeinträchtigung der Phagozytose der Makrophagen zu einer erhöhten bakteriellen Belastung der Atemwege kommt [38]. Apoptotische Zellen exprimieren Phosphatidylserin und können somit von Makrophagen erkannt werden, die für Phosphatidylserin spezifische Rezeptoren an der Oberfläche besitzen [38, 39]. Die neutrophile Elastase ist in der Lage das Phosphatidylserin zu spalten. Vandivier zeigt in einer Studie, dass dies die Fähigkeit von Makrophagen apoptotische neutrophile Granulozyten zu phagozytieren beeinträchtigen kann, was möglicherweise zu einer erhöhten Anzahl an apoptotischen neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen führt und zum Verlauf der COPD beiträgt [38, 40]. Makrophagen spielen eine Rolle in der Entzündungsreaktion der COPD. So ist die Anzahl der Makrophagen in den Atemwegen, im Lungenparenchym, in der BAL-Flüssigkeit und im Sputum von COPD-Patienten bis zu dem 10-fachen erhöht [38]. Eine weitere Studie zeigte eine Zunahme der Makrophagen in der Lunge bei Patienten mit Emphysem im Vergleich zu normalen Rauchern [38, 41]. Zudem besteht eine Korrelation zwischen der Schwere der COPD und der Anzahl der Makrophagen [38, 44]. Makrophagen können durch Zigarettenrauch-Extrakt aktiviert werden und Matrix-Metalloproteinasen wie MMP-2, MMP-9 und MMP-12 abgeben [45, 46]. Alveolarmakrophagen von Rauchern, die an COPD leiden, geben vermehrt Entzündungsproteine ab und haben eine erhöhte elastolytische Aktivität im Vergleich zu Makrophagen aus Rauchern ohne COPD. Dies wird durch Zigarettenrauch Exposition verstärkt [38, 47, 48].

### **2.1.2.2 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten werden aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet, haben eine Lebensdauer von wenigen Stunden bis mehrere Tage und zirkulieren in der Blutbahn durch den ganzen Körper [49, 50]. Sie sind für die intra- und extrazellulären Abwehr von Mikroorganismen verantwortlich [50-52]. Ihre Granula sind mit antimikrobiellen

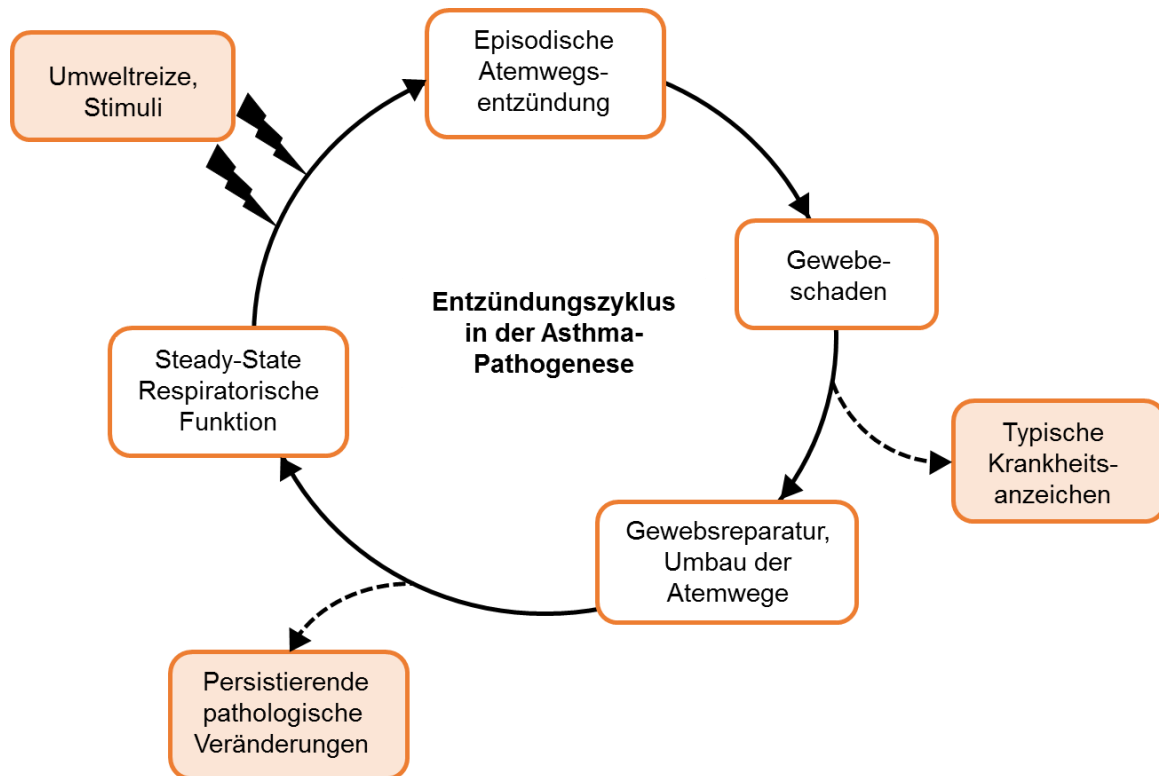
Proteinen und Peptiden gefüllt. Im Alveolarraum der gesunden Lunge befinden sich nur wenige neutrophile Granulozyten [30]. Während einer Infektion erkennen Alveolarmakrophagen und Epithelzellen Pathogene und geben Entzündungsmediatoren wie IL-8, TNF- $\alpha$  und MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2) ab. Dies führt zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an den Entzündungsherd [52]. Neutrophile Granulozyten sezernieren Serinproteasen (neutrophile Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP-8, MMP-9), welche zu Alveolarzerstörungen beitragen können und die Mukusproduktion stimulieren [38]. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege und das Parenchym erfordert die Adhäsion an Endothelzellen [38, 53]. In den Atemwegen von COPD-Patienten ist das E-Selektin auf den Endothelzellen hochreguliert [38, 53]. Neutrophile chemotaktische Faktoren wie IL-8 und LTB<sub>4</sub> (Leukotrien B<sub>4</sub>) leiten die Rekrutierung von adhärenenten neutrophilen Granulozyten in die Atemwege ein [38]. Durch GM-CSF und G-CSF kann das Überleben der neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen erhöht werden [38]. Welche Rolle die neutrophilen Granulozyten in der COPD spielen ist noch nicht vollständig geklärt. Zumindest bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsin-Mangel scheinen die von neutrophilen Granulozyten gebildeten Proteasen zum Auftreten einer COPD und Verlust der Lungenfunktion beizutragen [54-56]. Lacoste et al. wiesen in der BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten über die Konzentrationen an Myeloperoxidasen (MPO) eine erhöhte Anzahl an aktivierten neutrophilen Granulozyten nach [57]. Auch Keating et al. wiesen eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Sputum von COPD-Patienten im Vergleich zu Nichtraucher-Patienten nach, was mit erhöhten Konzentrationen an TNF- $\alpha$  und IL-8 einherging [58]. Sparrow et al. zeigten, dass es eine Korrelation zwischen der Anzahl an neutrophilen Granulozyten und dem Rückgang des FEV<sub>1</sub>-Wert der Lungenfunktion gibt [59]. Weitere Studien zeigten, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in Bronchialbiopsien und induziertem Sputum sowohl mit dem COPD Schweregrad als auch mit verschlechterter Lungenfunktion korrelierten [38, 44, 58, 60]. Zigarettenrauch scheint eine stimulierende Wirkung auf die Bildung von neutrophilen Granulozyten zu haben und die Freisetzung aus dem Knochenmark zu fördern. Dies wird möglicherweise durch G-CSF und GM-CSF vermittelt [38, 61]. Im Sputum von COPD-Patienten sind erhöhte Konzentrationen von Granulozyten-Aktivierungsmarker wie MPO und Lipocalin nachgewiesen worden. Dies spricht dafür, dass die in die Lunge rekrutierten neutrophilen Granulozyten aktiviert sind [38, 62-64].

Zigarettenrauch erhöht die Retention der neutrophilen Granulozyten in der Lunge [65]. Es scheint eine Korrelation zwischen der Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Sputum von Rauchern und dem Abfall des FEV<sub>1</sub> der Lungenfunktion zu geben [60]. Zudem zeigen neutrophile Granulozyten eine Zunahme des respiratorischen Bursts bei Rauchern, welches mit dem Grad der Luftstrombegrenzung korreliert [38, 66]. Der respiratorische Burst beschreibt die Fähigkeit von Phagozyten, freie Sauerstoffradikale (ROS) zu produzieren und auszuschütten, was zur Gefäßvolumenverengung und klinischer Symptomverschlechterung beiträgt. Durch die Freisetzung von zum Beispiel Serinproteasen können die neutrophilen Granulozyten Gewebeschäden induzieren [38, 67].

## **2.2 Asthma bronchiale**

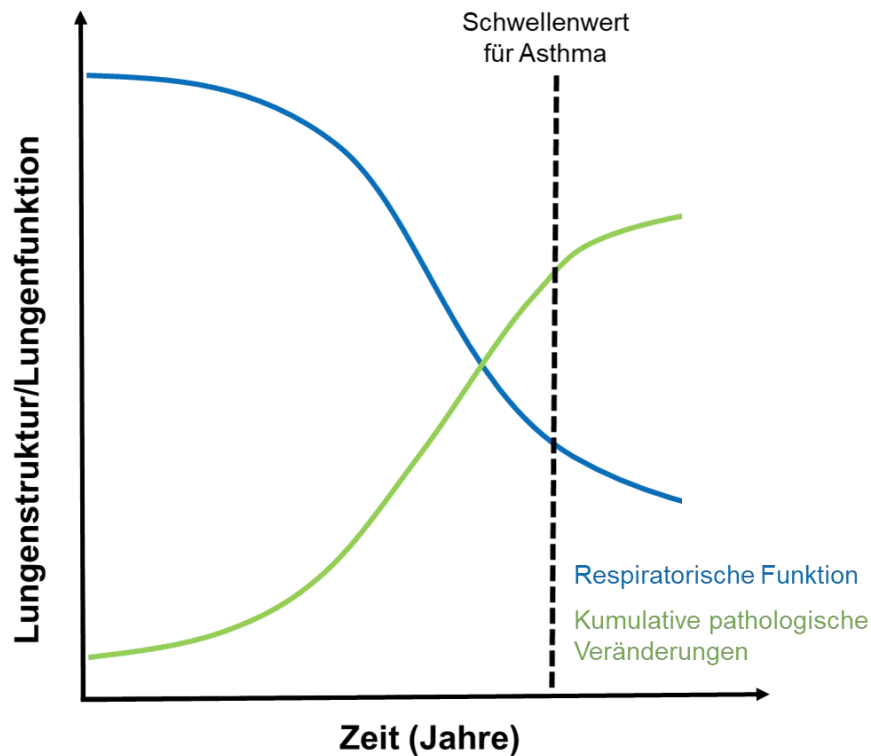
Die Globale Initiative für Asthma (GINA) definiert das Asthma bronchiale als eine heterogene Krankheit, die charakterisiert ist durch chronische Entzündungen der Atemwege und variablen Remodellierung der Lungen [68]. Weltweit leiden Millionen Menschen an Asthma bronchiale. Sie ist die häufigste entzündliche Erkrankung der Lunge und betrifft Kinder und Erwachsene. Es gibt verschiedene Formen des Asthmas. So wird zwischen dem allergischen (extrinsischen) Asthma und dem nicht-allergischen (intrinsischen) Asthma unterschieden. Es kann aber auch Mischformen des allergischen und nicht-allergischen Asthmas geben. Der westliche Lebensstil wird für die Entwicklung von Asthma verantwortlich gemacht. Im Gegensatz zur COPD führt Asthma bronchiale nicht zur erhöhter Mortalitätsrate. Unzureichende Therapien und wiederkehrende Exazerbationen stellen jedoch eine erhebliche globale gesundheitliche und wirtschaftliche Belastung dar. Bei Asthma bronchiale sind sowohl die kleinen als auch die großen Atemwege betroffen [68]. Asthma ist durch die Kombination aus Entzündung und strukturellem Umbau der Lunge gekennzeichnet [68]. Die Symptome von Asthma sind: Vermehrte Bildung von Schleim, Keuchen, Kurzatmigkeit, Engegefühl in der Brust und Husten. Die Symptome wie die Begrenzung des expiratorischen Luftstroms und die Überempfindlichkeit auf eine Reihe von Stimuli (inhalierte Reizstoffe) variieren im Laufe der Zeit in der Intensität [68]. Bei manchen Betroffenen verschlechtert sich die Lungenfunktion im Laufe der Lebenszeit [68, 69]. Bei schwerer chronischer Erkrankung und besonders bei spät

einsetzendem Asthma ist der Luftstrom dauerhaft begrenzt [68, 70]. Beginn und Fortschreiten der Krankheit kann schon postnatal während des Wachstumsprozess der Lunge stattfinden. Störungen während des Lungenwachstums können die Funktion der Lunge nachhaltig und dauerhaft verändern. In den ersten drei Jahren nach der Geburt finden wichtige Wachstumsprozesse der Lunge statt. Zu den Wachstumsprozessen zählen grobe strukturelle Veränderungen, wie beispielsweise die progressive Vergrößerung des Atemwegsdurchmessers, sowie subtilere Prozesse einschließlich der Alveolarisierung und assoziierte Veränderungen im Epithel, welches die Atemwege auskleidet [72]. Auch findet während des Wachstumsprozesses die Etablierung einer neuralen Kontrolle der glatten Muskulatur der Atemwege und Rezeptorensysteme statt [71, 72]. Die oben genannten Wachstumsprozesse der Lunge können durch Umwelteinflüsse beeinträchtigt werden und das normale Lungenwachstum einschränken [72-74]. Die Wachstumsprozesse der Lunge werden verzögert und der Betroffene ist ein erhöhtes Risiko Asthma zu entwickeln ausgesetzt [72]. Postnatale Entzündungen der noch wachsenden Lunge beispielsweise durch Viren, schädigen die Entwicklung einer gesunden Lunge, die auch im späteren Leben bestehen bleiben kann [72]. Der wiederholte Kontakt zu Allergenen löst chronische Entzündungen und Gewebeschäden aus. Diese aktivieren Reparaturmechanismen, die im Laufe der Zeit zum Asthma-typischen Umbau der Atemwege führt [68, 72]. Der Entzündungszyklus (Abb. 1) in der Asthma-Pathogenese wird durch wiederholte Entzündungen angetrieben, ausgelöst durch Luftschadstoffe, Atemwegsviren oder Allergenexposition [68, 72]. Eine mögliche Erklärung für die Anfälligkeit der asthmatischen Atemwege beispielsweise gegenüber dem Rhinovirus könnte sein, dass das Lungenepithel wiederholt beschädigt und repariert wird [68, 72]. Dadurch sind die angeborene Immunantwort und die Abwehrmechanismen gestört. Die Symptome sind zunächst intermittierend, assoziiert mit akuten Entzündungen, Ödemen und Verengung der Atemwege. Anhaltende Entzündungen führen zu wiederholten Zyklen der Gewebereparatur und -regeneration, die selbst anormal sind und zu pathologischen Veränderungen führen können, die über einen längeren Zeitraum hinweg bestehen [72].



**Abbildung 1: Dargestellt ist der Entzündungszyklus in der Asthma-Pathogenese (nach [72]).** Die Entwicklung des Asthmas wird durch wiederholte Zyklen von Entzündungen angetrieben, die durch Allergene oder durch die Luft übertragene Umweltreize ausgelöst werden. Die Symptome sind zunächst intermittierend und mit akuten Entzündungen, Ödemen und Verengung der Atemwege verbunden. Anhaltende Entzündungen führen zu wiederholten Zyklen der Gewebereparatur und -regeneration, die selbst anormal sein können und zu pathologischen Veränderungen führen, die über einen längeren Zeitraum hinweg bestehen.

Wenn sich diese Veränderungen akkumulieren, führen sie zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Lungenfunktion [72]. Sobald diese Veränderungen eine kritische Schwelle überschreiten (Abb. 2), sind sie möglicherweise nicht umkehrbar und können zu anhaltendem Asthma führen [72].



**Abbildung 2:** Dargestellt ist die Lungenstruktur/Lungenfunktion in einem Zeitdiagramm bei anhaltenden Entzündungen in der Asthma-Pathogenese (nach [72]). Anhaltende pathologische Veränderungen der Lunge, die sich akkumulieren und über einen längeren Zeitraum hinweg bestehen (beschrieben in Abb. 1), führen zu fortschreitender Verschlechterung der Lungenfunktion. Sobald diese Änderungen eine kritische Schwelle überschreiten, sind sie möglicherweise nicht mehr reversibel und können zu anhaltendem Asthma mit anhaltenden Symptomen führen.

### 2.2.1 Th1 /Th2/ Th17 Antwort

Das Asthma bronchiale ist eine allergische Entzündung der Atemwege, die durch die Umgestaltung der Atemwegswand und eine Überempfindlichkeit der Atemwege gekennzeichnet ist. Eine wichtige Rolle beim Asthma bronchiale besitzen die T-Helferzellen. Die naive T-Zell-Differenzierung zu Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) beziehungsweise Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen), wird durch die Transkriptionsfaktoren T-bet- und das GATA-Bindungsprotein 3 (GATA-3) reguliert und gilt als treibende Kraft für die Pathogenese von Asthma [75, 76]. Der Transkriptionsfaktor T-Bet ist entscheidend für die Th1-Zelldifferenzierung und Sekretion des Th1 Zytokins Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) [77]. IFN- $\gamma$  wird von Th1- und



Tc1-Zellen produziert. Bei Patienten mit akuten Exazerbationen ist die IFN- $\gamma$  Konzentration erhöht, wohingegen sie bei Asthma Patienten nicht erhöht ist [78].

Asthma Patienten weisen eine erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>-Zellen in den Atemwegen auf, die den Th2-Zellen zugeordnet werden [79]. Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 [79]. Der Hauptmediator für die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th2-Zellen und Sekretion Th2-typischer Zytokine ist der Transkriptionsfaktor GATA-3 [80]. Die Atemwege stabiler Asthmatiker haben eine erhöhte Anzahl an GATA3<sup>+</sup> T-Zellen [81]. Die Regulation von Th2 Zytokinen erfolgt unter anderem über die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) -vermittelte Phosphorylierung von GATA-3 [82]. Der NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) ist ein T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, der die transkriptionelle Aktivierung des IL-4-Promotors durch GATA-3 verstärkt [80]. IL-33 hat transkriptionsregulatorische Eigenschaften und fördert die Differenzierung von Th2-Zellen [77, 83]. Darüber hinaus wirkt IL-33 auch als selektiver chemotaktischer Botenstoff von Th2-Zellen [84]. IL-4 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Th2-Zellen aus Th0-Zellen und sind bei der ersten Sensibilisierung auf Allergene wichtig [77]. IL-13 induziert die IgE-Sekretion, verursacht strukturelle Veränderungen in den Atemwegen wie Becherzellhyperplasie und fördert die Th2-Zelldifferenzierung [77, 85]. IL-13 induziert die Atemwegs-Hyperreaktivität (AHR) und die Schleimhypersekretion durch die Aktivierung von STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6) im Atemwegsepithel [77, 86]. IL-13 wird von mehreren Zelltypen produziert, darunter sind neben den Th2-Zellen, Th1-Zellen, Tc2-Zellen, invariante NKT-Zellen und Entzündungszellen wie Mastzellen, Basophile und Eosinophile. IL-13 zeigt eine erhöhte Expression in den Atemwegen von Asthmatikern [77, 87]. Nach Allergen-Exposition steigen die IL-4 und IL-13 Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit an [77, 88]. Dabei korreliert die IL-13 Konzentration mit der Anzahl an eosinophilen Granulozyten [88]. Eine wichtige Rolle in der durch eosinophilen Granulozyten vermittelten Entzündung spielt IL-5. IL-5 ist an der Differenzierung der eosinophilen Granulozyten aus den Knochenmark-Vorläuferzellen beteiligt und verlängert das Überleben der eosinophilen Granulozyten [77]. Eine systemische und lokale Verabreichung von IL-5 an Asthmatiker führt zum Anstieg der eosinophilen Granulozyten und CD34<sup>+</sup> eosinophilen Vorläuferzellen [77, 89]. Versuche zeigten, dass die Blockade von IL-5 die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der Lunge reduziert und die Allergenreaktionen hemmt. Mepolizumab ist ein gegen IL-5

gerichteter therapeutischer Antikörper und wird zur Behandlung von eosinophilem Asthma verwendet. Es reduziert die eosinophilen Granulozyten im Blut und senkt die Häufigkeit der Exazerbationen. Bei Menschen führt die Blockade von IL-5 durch Mepolizumab zwar zur Reduktion der eosinophilen Granulozyten, hat aber keine Auswirkung auf die Allergenreaktion oder der AHR [77]. Auch eliminiert Mepolizumab die Anzahl der eosinophilen Granulozyten aus den Atemwegen nicht vollständig, weshalb der klinische Nutzen gering ist [77, 90].

Typ-17-T-Helferzellen (Th17-Zellen) sind eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungskrankheiten. In den Atemwegen von Asthma Patienten ist die Anzahl an Th17-Zellen erhöht [91]. Zudem sind Th17-Zellen mit einem schwereren Asthma Phänotyp, die weniger auf Kortikosteroide ansprechen, assoziiert [92-95]. Th17-Zellen unterliegen dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (RAR-related orphan receptor gamma t) [96]. Interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , IL-23 und TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) sind an der Differenzierung von Th17 Zellen beteiligt [95-97]. IL-17A, welches von Th17-Zellen produziert wird, ist im Sputum von Asthma Patienten erhöht [98]. Sowohl IL-17A als auch IL-17F werden mit einer neutrophilen vermittelten Entzündung in Verbindung gebracht. IL-17A und IL-17F induzieren die Freisetzung der neutrophilen CXC-Chemokine CXCL1 und CXCL8 aus Epithelzellen der Atemwege und glatten Muskelzellen der Atemwege [77, 99]. Sie scheinen eine Rolle bei der neutrophilen Entzündung von schwerem Asthma und COPD zu spielen [100].

## **2.2.2 Asthma – Exazerbation**

Asthma-Exazerbationen gehen mit akuten Verschlechterungen der Symptome einher und treten im Laufe der Erkrankung meist öfter auf. Exazerbationen erfordern Behandlungen und Therapien, da sich die Symptome wie Kurzatmigkeit, Husten, Stenoseatmung und Engegefühl in der Brust verschlechtern [101]. Zum Einsatz kommen meist entzündungshemmende Mittel wie Kortikosteroide in Kombination mit  $\beta$ 2-Sympathomimetika, was unter anderem die glatten Muskeln relaxiert und die Bronchien erweitert. Ein Krankenhausaufenthalt ist jedoch meist unumgänglich [102]. In einer Studie berichteten 66% der Personen mit moderatem und schwerem Asthma von häufigen Krankenhausbesuchen. Bei Personen mit mildem Asthma waren die

Krankenhausaufenthalte weniger [103]. Zudem berichtete die Mehrheit der Personen mit schwerem Asthma, dass aufgrund ihrer Exazerbation ein Krankenhausbesuch, zum Teil mit Aufenthalt auf der Intensivstation, unumgänglich war [103]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Entwicklung eines schweren Asthmaphänotyps mit wiederholten Exazerbationen einhergeht. Das Sputum und die BAL-Flüssigkeit von Patienten mit akuten Asthma Exazerbationen setzen sich aus eosinophilen- und neutrophilen Granulozyten zusammen und unterscheiden sich von chronischen Entzündungen [104, 105]. Exazerbationen von Asthmatiker mit schwerem Phänotyp weisen häufig eine Neutrophilie mit erhöhten Konzentrationen von IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  auf [106, 107]. Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen den Asthma-Exazerbationen und grippalen Infekten, hingegen gibt es keine Korrelation zwischen Exazerbationen und der Exposition gegenüber inhalierten Allergenen [108-111]. Exazerbationen sind mit Rhinoviren und dem respiratorischen Syncytial-Virus assoziiert [112, 113].

Die Zwei-Treffer-Hypothese beschreibt die Asthma-Exazerbation bei Patienten wie folgt: eine Virusinfektion ist der „zweite Treffer“, der auf eine bereits etablierte allergische Entzündung der Lunge als „ersten Treffer“ folgt [114]. Es gibt Hinweise darauf, dass virale RNAs eine exazerbationsassoziierte Entzündung verursachen. Virale einzelsträngige RNAs zeigen häufig doppelsträngige (ds) Motive. Die dsRNA tritt auch als Zwischenprodukt während der viralen Replikation auf. Über Mustererkennungsrezeptoren wie Toll-like Rezeptor- (TLR) 3 oder Retinsäure-induzierbares Gen-I kann die dsRNA vom Wirt erkannt werden [115, 116]. Die dsRNA-Motive, wie zum Beispiel Polyinosinic-polycytidylic acid (pIC) können in Modellen des experimentellen Asthmas Exazerbationen auslösen, die einer Rhinovirus-Infektion ähneln [117-119].

### **2.2.3 IL-17A im experimentellen Asthma-Modell**

Studien deuten auf eine Funktion von IL-17A und IL-17RA bei der Entwicklung einer allergischen Entzündung der Lunge und der AHR hin [120-123]. IL-17RA-defiziente Mäuse entwickeln keine OVA-induzierte allergische Atemwegsentzündung [123]. Kudo et al. zeigten, dass IL-17A, das von Th17-Zellen produziert wird, die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege in einer IL-17RA-abhängigen Weise steuert

[121]. Mäuse, denen Th17-Zellen fehlten, waren als Reaktion auf OVA und die Sensibilisierung und Herausforderung durch Hausstaubmilben vor AHR geschützt. Darüber hinaus zeigten *Ex-vivo*-Experimente, dass IL-17A die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege durch IL-17RA fördert [121]. Chesne et al. zeigten, dass die Behandlung von Mäusen mit einem Anti-IL-17-Antikörper während einer intranasalen Herausforderung mit Hausstaubmilben zu einer verringerten neutrophilen Entzündung und AHR führt [120]. Die *Ex-vivo*-Inkubation von Bronchien zeigte, dass IL-17A die kontraktile Kräfte als Reaktion auf Methacholin (MCh) erhöht [120]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Chenuet et al. erzielt, die zeigten, dass die Neutralisierung von IL-17A oder IL-17F und die Ablation von IL-17RA das durch Hausstaubmilben induzierte allergische Asthma bei Mäusen hemmt [122]. IL-17A vermittelt auch eine pIC-induzierte Exazerbation in einem OVA-abhängigen Modell von experimentellem Asthma [118].

## **2.3 IL-17 Zytokin – und Rezeptorfamilie**

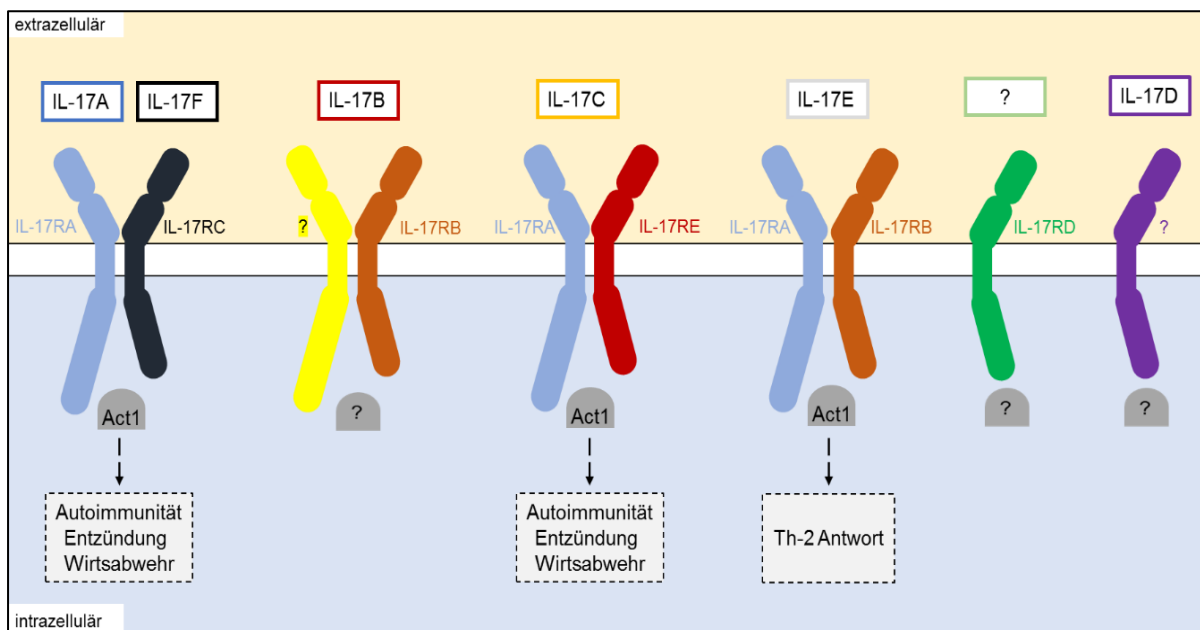
Der Körper reagiert auf Krankheitserreger, Allergene und anderen Umweltbelastungen mit einer Entzündungsreaktion als Schutzmechanismus. Bei einer akuten Entzündung und bei Infektionen werden Leukozyten zur Entzündungsstelle rekrutiert. Es ist wichtig, dass die Entzündung nach zum Beispiel der Eliminierung von Pathogenen wieder aufgelöst und die Gewebemöostase wieder gewährleistet wird. Ist die Entzündung länger anhaltend, führt dies zu chronischen Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Asthma, COPD und Krebs. Die Interleukin 17 (IL-17) und die Rezeptorfamilie beschreibt eine Untergruppe von Zytokinen und ihren spezifischen Rezeptoren, die bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen.

### **2.3.1 IL-17/IL-17RE vermittelte Entzündung**

Die IL-17 Familie besteht aus 6 Mitgliedern und setzt sich zusammen aus IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E/IL-25 und IL-17F [124, 125]. Die Aminosäuresequenz von IL-17A ähnelt den Sequenzen der anderen Mitgliedern der IL-17 Familie zwischen 16-50%, wobei IL-17F dem IL-17A Zytokin am ähnlichsten ist und IL-17E die geringste

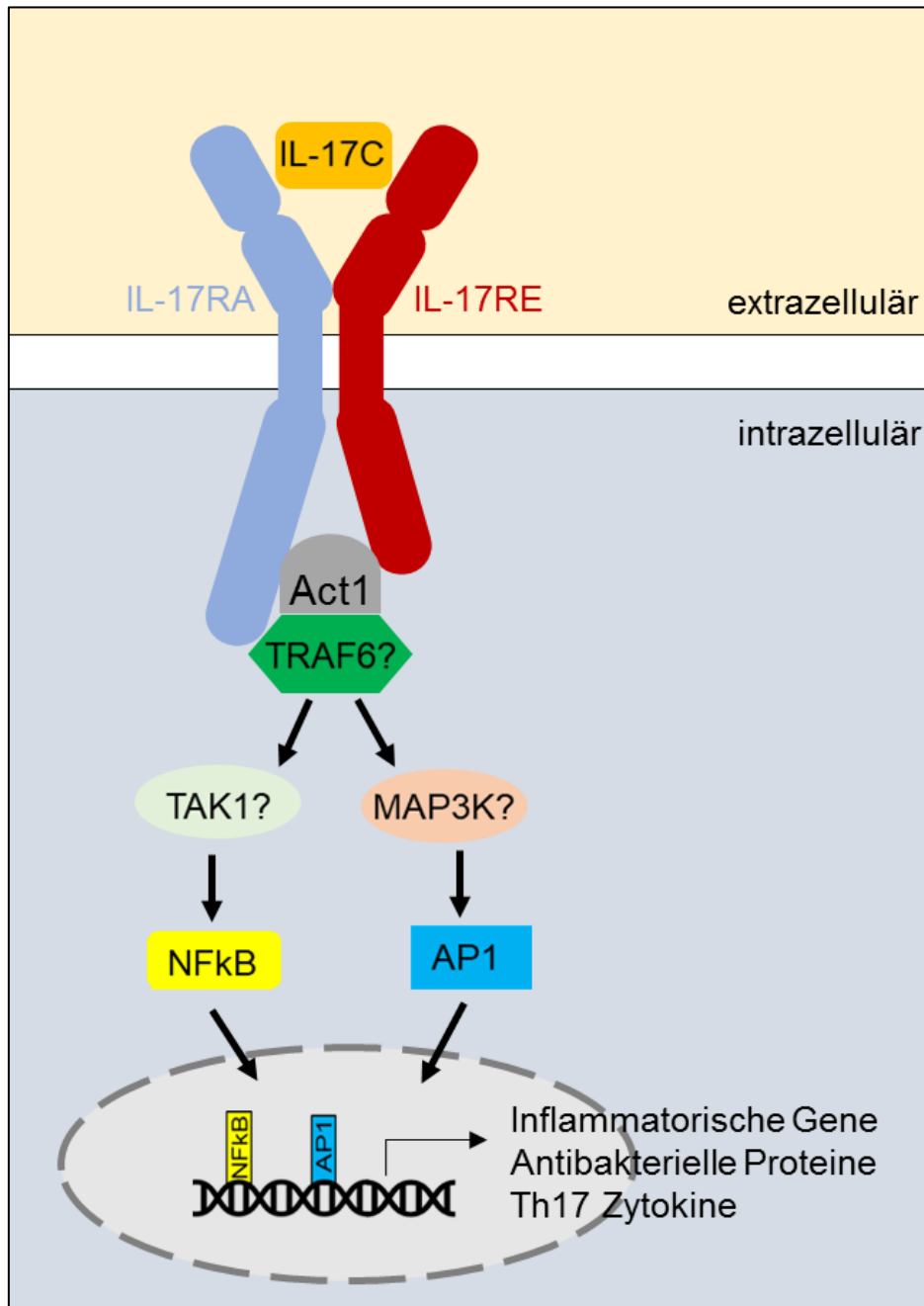
Übereinstimmung aufweist [1, 125]. Zahlreiche Studien zeigten, dass IL-17A und IL-17F in erster Linie von Immunzellen gebildet werden, während IL-17C von Epithelzellen verschiedener Organe wie der Haut, dem Darm und der Lunge gebildet wird [126]. Erkannt werden die verschiedenen IL-17 Zytokine über spezifische IL-17-Rezeptoren. Es gibt bislang 5 IL-17-Rezeptoren (Abb. 3) bestehend aus IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD und IL-17RE [127]. Die Rezeptoren besitzen eine IL-17R (SEFIR)-Domäne, die innerhalb der Rezeptorfamilie hoch konserviert ist. Strukturell ähnelt die IL-17R (SEFIR)-Domäne der Toll/IL-1R (TIR) Domäne in Toll-like Rezeptoren und dem IL-1b-Rezeptor [126, 128]. Der Interleukin Rezeptor IL-17RE wurde bei der Suche nach IL-17R-homologen Sequenzen identifiziert [129]. Studien zeigten, dass IL-17C über einen Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RE erkannt wird. IL-17RE ist somit spezifisch für IL-17C, während IL-17RA an der Erkennung verschiedener IL-17-Zytokine beteiligt ist [130, 131]. Während IL-17RA ubiquitär vorhanden ist, scheint IL-17RE spezifischer exprimiert zu sein [126]. Die Expression von IL-17RE ist in den Epithelzellen verschiedener Organe wie der Haut, der Lunge und dem Dickdarm nachweisbar [129, 131]. Zudem haben verschiedene Studien die Expression von IL-17RE in Th17-Zellen nachgewiesen. Aufgrund der zellspezifischen Expression von IL-17RE scheint IL-17C einerseits autokrin auf Epithelzellen zu wirken, andererseits aber auch Th17-Zellen zu aktivieren und damit die angeborene Immunantwort zu modulieren [126]. Über die Signalwege, die der IL-17RA/IL-17RE-Rezeptorkomplex nach Bindung von IL-17C aktiviert, ist relativ wenig bekannt. Da IL-17C wie IL-17A den Rezeptor IL-17RA für die Aktivierung von Zielzellen benötigt, wird angenommen, dass IL-17C ähnliche, wenn nicht sogar gleiche Signalkaskaden wie IL-17A aktiviert. Es gibt eine Vielzahl an Zellen, die zu den angeborenen Immunzellen gezählt werden, die im Rahmen einer frühen Immunantwort IL-17A bilden. Hierzu gehören LT<sub>i</sub> (Lymphoid Tissue inducer)-Zellen,  $\gamma\delta$ T (Gamma delta T)-Zellen, iNKT (Invariant natural killer T)-Zellen, natürliche Killerzellen (NK), und Paneth-Zellen [1, 132]. IL-17A aktiviert NF- $\kappa$ B, MAPKs und C/EBP-Kaskaden. Dies führt zu einer gesteigerten Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, antimikrobiellen Peptiden und Matrix-Metalloproteinasen [1, 133]. Verschiedene Studien zeigten, dass IL-17A die Bildung dieser Faktoren synergistisch mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  oder IL-22 steigert [1, 134, 135]. Obwohl IL-17A NF- $\kappa$ B aktivieren kann, scheint dieser synergistische Effekt auf eine mRNA-stabilisierende Wirkung von IL-17A zurückzugehen [136]. Als Hauptakteur im IL-17A

Signalweg ist der proximale Rezeptor-Adaptermolekül Act1 (NF- $\kappa$ B Aktivator 1; auch CIKS genannt, Verbindung zu IKK und SAPK/JNK) beschrieben [1, 137, 138]. Die E3-Ubiquitin-Ligase Act1 spielt wahrscheinlich auch im Signalweg der anderen Mitglieder der IL-17 Familie eine Rolle und wird von diesen möglicherweise geteilt [1, 139]. Für IL-17RE konnte gezeigt werden, dass es die ERK1/2-Phosphorylierung vermittelt [129]. In primären Maus Darmepithelzellen aber auch in humanen Kolontumorzellen induziert IL-17C die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAPK [1, 130]. Song et al. zeigten zudem, dass durch die Stilllegung des IL-17RE-Gens die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAPKs durch IL-17C in Darmepithelzellen vermindert wird [1, 130].



**Abbildung 3: Übersicht über die IL-17- Zytokine und Rezeptoren (nach [1]).** Die IL-17 Zytokinfamilie besteht aus sechs Mitgliedern, IL-17A bis IL-17F. Die Rezeptorfamilie besteht aus fünf Mitgliedern, IL-17RA bis IL-17RE. IL-17A und IL-17F, sind die am besten charakterisierten Mitglieder und bilden entweder ein Homodimer (siehe Abbildung) oder ein Heterodimer (nicht dargestellt). IL-17RA und IL-17RC bilden den heterodimeren Rezeptorkomplex, worüber IL-17A und IL-17F agieren. Dadurch wird ein nachgeschalteter Signalweg über Act1 aktiviert, der für die Wirtsabwehr oder die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sowie anderen entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung ist. IL-17B scheint an den Rezeptor IL-17RB zu binden, wobei deren biologischen Funktionen noch weitgehend unbekannt sind. IL-17C agiert über die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE. So wird eine Downstream-Signalisierung für die Wirtsabwehr oder die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sowie anderen entzündlichen Erkrankungen ausgelöst. IL-17E bindet an den IL-17RA und IL-17RB-Komplex zur Signalisierung der Th2-Antwort. Über den IL-17RD Rezeptor ist wenig bekannt und der Rezeptor für IL-17D wurde noch nicht identifiziert. Die Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-17C und IL-17E agieren über Act1.

Darüber hinaus wird das Act1 von IL-17C benötigt, um die Th17-Differenzierung zu fördern [1, 140]. Der IL-17C Signalweg (Abb. 4) geht über Act1 und löst eine Signalkaskade in IL-17RE-positiven Zellen aus [1]. IL-17C induziert über IL-17RE die Bildung von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden, ähnlich wie IL-17A [1].



**Abbildung 4: Der Signalweg von IL-17C (nach [1]).** IL-17C bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex, der sich aus IL-17RA und IL-17RE zusammensetzt. Nach der Bindung erfolgt über das Adaptermolekül Act1 die Aktivierung von NFκB und MAPK Signalwegen. Inwiefern während der Signaltransduktion die Moleküle TRAF6 (TNFR-associated factor 6), TAK1 (TGFβ-activated kinase 1) und MAP3K (mitogen

activated protein kinase kinase kinase) involviert sind, ist nicht vollständig geklärt. IL-17C aktiviert die beiden Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP1, welche die Transkription inflammatorischer Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide induziert.

Studien zeigen, dass die häufigen Krankheitserreger *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenza* und *C. rodentium* die IL-17C Transkription in Keratinozyten [141], Lungenepithelzellen [142, 143] und Darmepithelzellen [130] induzieren. Dies scheint über PRRs wie TLRs vermittelt zu werden. Zu den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP, Pathogen-associated molecular patterns), die die Expression von IL-17C in Lungenepithelzellen induzieren, gehören Lipopolysaccharide (LPS, TLR-4 Ligand), Flagellin (TLR-5 Ligand) und der synthetische TLR-3 Ligand pIC [1, 130, 131, 142, 143]. Auch entzündliche Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen [130, 131, 143, 144]. In humanen Keratinozyten obliegt die Transkription von IL-17C dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B [144].

IL-17C scheint bei der Schleimhautimmunität wichtig zu sein. So wird IL-17C im Dickdarmgewebe von Mäusen verstärkt gebildet, wenn diese mit *C. rodentium* infiziert sind [1, 130, 131, 145]. Während der Infektion mit *C. rodentium* ist IL-17C in Kolonepithelzellen hochreguliert und reguliert seinerseits synergistisch zusammen mit IL-22 die Expression antibakterieller Peptide [130, 146]. Der Verlust des IL-17C-vermittelten Signals in IL-17RE-defizienten Mäusen verringerte die Genexpression antibakterieller Moleküle, führte zu einer höheren bakteriellen Belastung und zu einer frühen Mortalität der IL-17RE Knockout Mäuse während der Infektion mit *C. rodentium* [130]. IL-17C wirkt einer durch Dextransulfat-Natrium (DSS) induzierte Colitis entgegen [1, 131, 145]. Studien von Patienten mit Psoriasis zeigten, dass deren Haut neben erhöhten IL-17A und IL-17F auch erhöhte IL-17C mRNA aufwies [1, 147, 148]. IL-17C induziert in humanen Keratinozyten entzündliche Zytokine, Chemokine und antibakterielle Peptide [1, 131, 148]. IL-17C kann in Synergie mit TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  Psoriasis-bezogene Genexpression in den epidermalen Keratinozyten induzieren [131, 148]. Nach IL-17C Stimulierung von Keratinozyten und humanen Endothelzellen produzierten diese verstärkt Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , G-CSF und IL-6 [148]. Dies geht mit einer weiteren Studie einher, wo die IL-17C Konzentration in Hautbiopsien von Psoriasis Patienten nach anti-TNF- $\alpha$  Therapie vermindert war [149]. Mäuse, die gentechnisch so verändert wurden, dass sie IL-17C in Keratinozyten



überexprimieren, entwickelten einen psoriasis-ähnlichen Hautphänotyp mit erhöhter dermaler Angiogenese, Rekrutierung von Immunzellen und psoriasis-assoziierte Gene wurden induziert [148]. Bei einem Imiquimod-induzierten Mausmodell der Psoriasis war IL-17C in der Haut dieser Mäuse ebenfalls hochreguliert [1, 131]. Einhergehend mit diesen Daten schützte eine Defizienz für IL-17C oder IL-17RE die Mäuse vor Imiquimod-induzierte epidermale Hyperplasie und neutrophile Infiltration [1, 131]. Mausstudien zeigten, dass IL-17C die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge vermittelt [150, 151]. Die Defizienz für IL-17C und IL-17RE führte in akuten *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* Pneumoniemodellen zu einer verminderten Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Lunge [143, 152]. Auch in experimentellen Lungenkrebsmodellen war die NTHi-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge und in die Tumormikroumgebung vermindert [151, 153]. Zellkulturstudien zeigten, dass Lungenpathogene wie Rhinoviren, NTHi und *P. aeruginosa*, aber auch Zytokine wie TNF- $\alpha$  die Expression von IL-17C in Pneumozyten und Atemwegsepithelzellen induzieren und IL-17C die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen, neutrophilen Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden verstärkt [142, 143, 154, 155].

## 2.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einblicke in die Funktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17C und seines spezifischen Rezeptors IL-17RE bei chronischen, entzündlichen Erkrankungen der Lunge zu erlangen. Hierfür sollte geprüft werden, inwiefern die Konzentrationen von IL-17C in humanen Sputumproben von akut exazerbierenden COPD-Patienten mit der Schwere der Erkrankung assoziieren. In akuten und chronischen COPD-Mausmodellen sollte die Funktion von IL-17C hinsichtlich der pulmonalen Entzündung und Destruktion von Lungenparenchym untersucht werden. Im experimentellen Asthma-Modell sollte die Funktion der IL-17RE-Achse geprüft werden. Insbesondere wurde die Rolle von IL-17RE bei einer induzierten Exazerbation mittels Zwei-Treffer-Hypothese untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.**

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Firma und Standort</b>
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin from chicken egg white	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EtOH, 100%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eukitt quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd, 37%	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Deutschland
Glycergel Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
H <sub>2</sub> O, RNase-frei	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	VWR, Darmstadt, Deutschland

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Imject™ Alum Adjuvant	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA
Isopropanol	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Deutschland
KCL	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Metacholin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PAPPENHEIM-Färbung (MAY GRÜNWALD & GIEMSA)	Morphisto, Hessen, Deutschland
Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland

SensiMix™ SYBR® & Fluorescein (2x)	Bioline, London, UK
Sputolysin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Bayer, Leverkusen, Deutschland

### 3.1.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Natriumacetat (pH 5,2)	246 g/L Natriumacetat
1 x TBS-T	50 mL 20 x TBS (pH 7,4) 2 mL Tween-20  auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen
10 x PBS (pH 7,2)	800,6 g NaCl 20,1 g KCl 15,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 20,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  in 10 L Aqua dest. lösen und den pH-Wert auf 7,2 - 7,4 einstellen

20 x TBS (pH 7,4)	152 g/L NaCl (2,6 M) 48,5 g/L Tris/HCL (0,4 M)
Waschpuffer ELISA	1 x PBS mit 0,05% Tween 20

### 3.1.3 Geräte

**Tabelle 5: Verwendete Geräte.**

<b>Geräte</b>	<b>Firma und Standort</b>
CFX96 Touch Real Time System	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
FinePointe RC units	Data Sciences International, New Brighton, Minnesota, USA
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop DM750	Leica, Wetzlar, Deutschland
MAGPIX System	Luminex corporation, Austin, USA
Mikroplattenleser FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
MyCycler	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Nano Drop 8000	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA
Pari MASTER® Vernebler	Pari GmbH, Starnberg, Deutschland
ULTRA-TURRAX Dispergiergerät	IKA, Staufen, Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchstiere

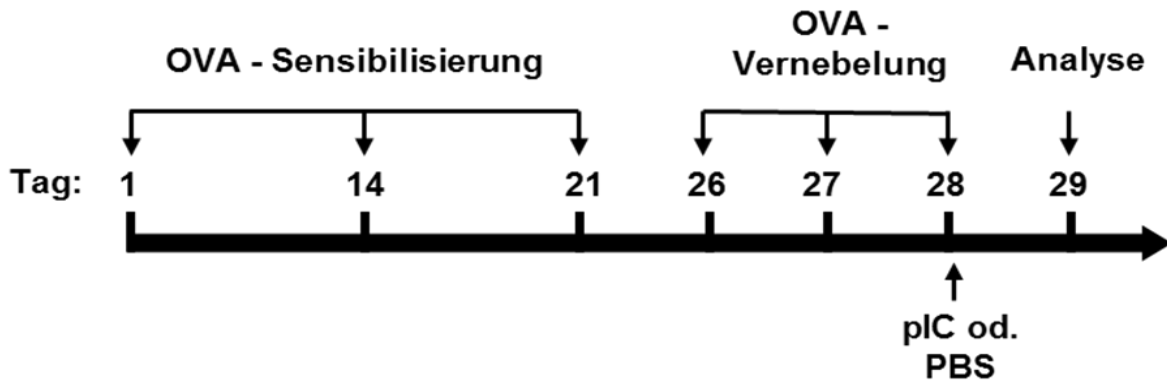
Die Tierversuche in der vorliegenden Arbeit wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt. Die invasive Lungenfunktion wurde am Forschungszentrum Borstel in der Gruppe von PD Dr. Michael Wegmann durchgeführt und durch MELUND (Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung Schleswig-Holstein) genehmigt. Die IL-17C-defizienten C57BL/6 Mäuse (*Il-17c<sup>-/-</sup>*) und die IL-17RE-defizienten C57BL/6 Mäuse (*Il-17re<sup>-/-</sup>*) haben einen vollständigen Knockout und stammen aus dem Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC, USA). Alle Versuche wurden mit weiblichen Mäusen des Stammes C57BL/6 durchgeführt. Die Tiere wurden unter 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, 22°C (+/-2°C) und 55% (+/-10%) Luftfeuchtigkeit in konventioneller Haltung in Gruppen gehalten. Der Zugang zu Futter und Wasser erfolgte *ad libitum*.

### 3.2.2 Versuchsmodelle

#### 3.2.2.1 Allergisches Asthma-Modell mit und ohne Exazerbation

Weibliche C57BL/6 Wildtyp (WT) und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden an den Tagen 1, 14, und 21 durch intraperitoneale Injektion des Allergens Ovalbumin (Albumin from chicken egg white, Sigma-Aldrich), welches an Aluminiumhydroxid (Imject™ Alum Adjuvant, ThermoFisher) gebunden war (20 µg Ovalbumin an 2 mg Aluminiumhydroxid), sensibilisiert [156]. Um eine akute allergische Atemwegsentzündung zu induzieren, wurden die Mäuse an den Tagen 26, 27 und 28 mit einem OVA-Aerosol (100 mg OVA in 10 mL PBS) in einer Plexi-Glasbox (30 x 20 x 15 cm) vernebelt. Die Exazerbation wurde hervorgerufen, indem den Mäusen an Tag 28 ca. 2 Stunden nach der OVA Vernebelung unter Narkose intranasal 100 µg Polyinosinic–polycytidylic acid sodium salt (pIC; Sigma-Aldrich) gelöst in 20 µL sterilem PBS verabreicht wurde. Die

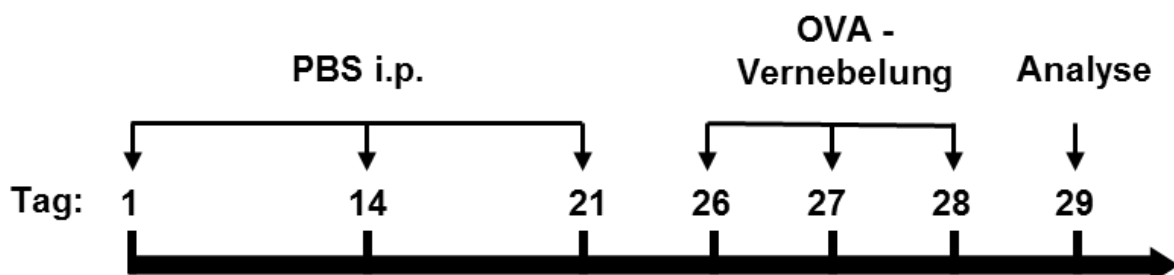
Kontrollgruppe erhielt 20  $\mu$ L PBS ohne pIC (Abb.5). Die Tiere wurden 4 - und 22 Stunden nach der pIC Gabe analysiert.



**Abbildung 5: Schema des experimentellen Versuchsablaufes im Asthma Modell mit und ohne pIC Gabe.** Versuchstiere wurden an den Tagen 1, 14, und 21 durch intraperitoneale Injektion des Allergens Ovalbumin sensibilisiert. An den Tagen 26, 27 und 28 wurden die Tiere mit einem OVA-Aerosol vernebelt, um eine allergische Atemwegsentzündung zu induzieren. Die Exazerbation wurde durch intranasale Gabe von 100  $\mu$ g pIC, welches in 20  $\mu$ L sterilem PBS gelöst war, ausgelöst. Die Kontrollgruppe erhielt 20  $\mu$ L PBS ohne pIC. Die Analyse erfolgte 4 - und 22 Stunden nach pIC Gabe.

### 3.2.2.2 PBS scheinsensibilisierte Mäuse und pIC behandelte Versuchstiere

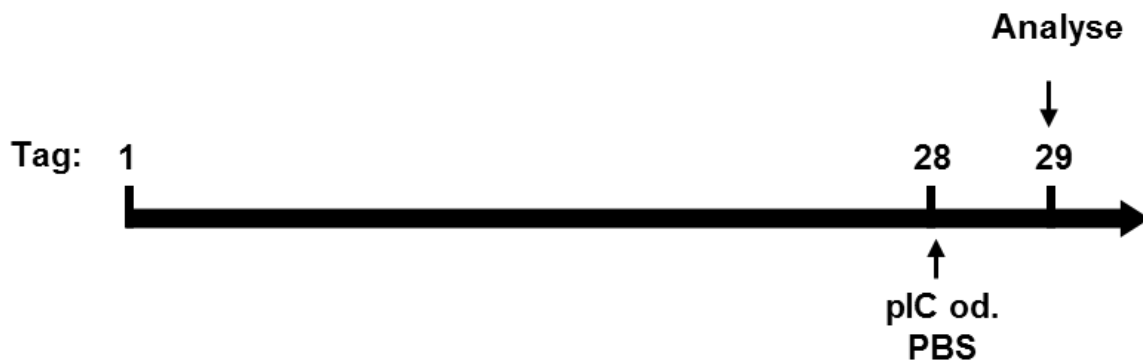
Weibliche WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden scheinsensibilisiert und erhielten hierfür an den Tagen 1, 14, und 21 PBS intraperitoneal. An den Tagen 26, 27 und 28 wurden die Mäuse anschließend mit einem OVA-Aerosol (100 mg OVA in 10 mL PBS) in einer Plexi-Glasbox (30 x 20 x 15 cm) vernebelt (Abb. 6). Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition analysiert.



**Abbildung 6: Schema des experimentellen Versuchsablaufes der PBS scheinsensibilisierten Mäuse.** Versuchstiere wurden an den Tagen 1, 14, und 21 durch intraperitoneale Injektion von PBS scheinsensibilisiert. An den Tagen 26, 27 und

28 wurden die Tiere mit einem OVA-Aerosol vernebelt und 24 Stunden nach der letzten Vernebelung analysiert.

Etwa 8-10 Wochen alte WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden unter Narkose intranasal 100 µg pIC, welches in 20 µL sterilem PBS gelöst war oder PBS ohne pIC (Kontrolltiere) verabreicht. Die Versuchstiere wurden nach 24 Stunden analysiert (Abb. 7).



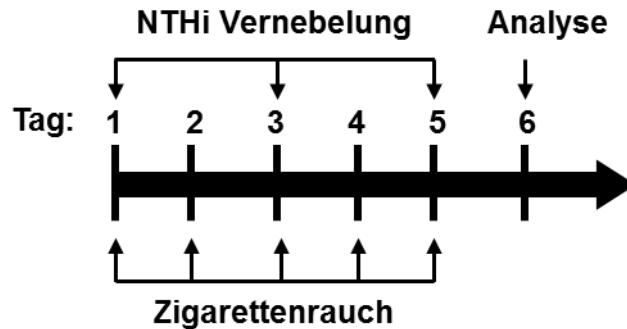
**Abbildung 7: Mäuse wurden intranasal mit pIC herausgefordert. Kontrolltiere erhielten PBS.** Etwa 8-10 Wochen alten Mäuse wurden an Tag 28 intranasal 100 µg pIC gelöst in 20 µL sterilem PBS verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt 20 µL PBS ohne pIC. Die Analyse erfolgte nach 24 Stunden an Tag 29.

### 3.2.2.3 Akutes COPD-Mausmodell

Weibliche 8-10 Wochen alte WT und *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden in einer Rauchexpositions-kammer (Teague Enterprise, TE-10, Woodland, Kalifornien, USA) mit Zigarettenrauch (3R4F, College of Agriculture, Reference Cigarette Program, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA) inkubiert. Die Mäuse wurden an 5 hintereinander folgenden Tagen für zweimal 50 Minuten am Tag Zigarettenrauch exponiert. Während der Inkubation hatten die Versuchstiere freien Zugang zu Wasser. Die Rauchphase wurde durch eine zweistündige Pause unterbrochen. Die Partikelkonzentration lag bei 500 mg/m<sup>3</sup> und die CO-Konzentration bei 350 ppm. Danach wurden die Tiere aus der Rauchmaschine genommen und in den üblichen Haltungskäfigen mit Futter und Wasser gehalten. Etwa 3 Stunden nach der Rauchexposition wurden die Mäuse an Tag 1, 3 und 5 für 40 Minuten am Tag hitzeinaktivierten NTHi (2,5 mg/mL Protein in PBS) exponiert (Abb. 8). Hierfür wurden die Mäuse in einer Plexi-Glasbox (30 × 20 × 15 cm) gesetzt, welche mit einem Pari MASTER® Vernebler (Pari GmbH, Starnberg, Deutschland) verbunden war. Die Tiere



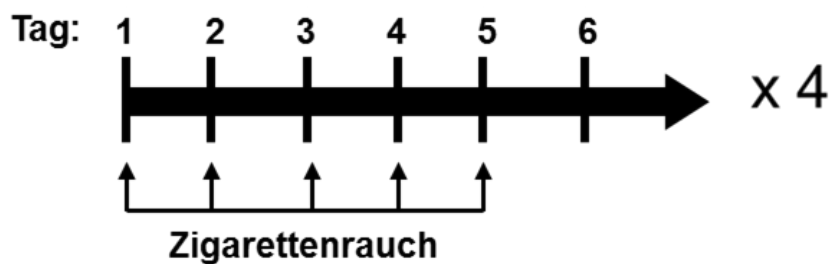
wurden 24 Stunden nach der letzten NTHi Exposition analysiert. Kontrolltiere wurden Raumluft exponiert.



**Abbildung 8: Akutes COPD Mausmodell.** Die Mäuse wurden an 5 hintereinander folgenden Tagen Zigarettenrauch ausgesetzt und zusätzlich an Tag 1, 3 und 5 hitzeinaktivierte NTHi exponiert. Die Analyse erfolgte 24 Stunden nach NTHi-Exposition an Tag 6.

### 3.2.2.4 Chronisches CS-Mausmodell

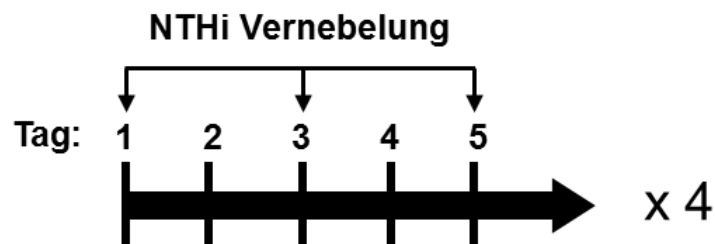
Weibliche WT und *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden für die Dauer von 4 Wochen an 5 hintereinander folgenden Tagen für zweimal 50 Minuten am Tag Zigarettenrauch exponiert (Abb. 9). Die Kontrolltiere wurden Raumluft exponiert. Die CS-Exposition erfolgte, wie in Punkt 3.2.2.3 beschrieben



**Abbildung 9: Chronisches CS- Mausmodell.** Die Mäuse wurden für die Dauer von 4 Wochen an 5 hintereinander folgenden Tagen Zigarettenrauch ausgesetzt Die Analyse erfolgte 24 Stunden nach CS-Exposition.

### 3.2.2.5 Chronisches NTHi-Mausmodell

Im chronischem NTHi Expositionsmodell wurden weibliche WT und *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäuse dreimal wöchentlich für die ersten 4 Wochen und einmal wöchentlich für die folgenden 8 Wochen hitzeinaktivierte NTHi exponiert (Abb. 10). Die Vernebelung erfolgte wie in Punkt 3.2.2.3 beschrieben. Als Kontrolle dienten Raumlufte exponierte Mäuse. Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach der letzten NTHi-Exposition analysiert.



**Abbildung 10: Chronisches NTHi Mausmodell.** Die Mäuse wurden dreimal wöchentlich für die ersten 4 Wochen und noch einmal wöchentlich für die folgenden 8 Wochen hitzeinaktivierte NTHi exponiert. Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach der letzten NTHi-Exposition analysiert.

### 3.2.3 Herstellung von nontypeable NTHi Lysat

NTHi wurde im Glycerolstock bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um NTHi Lysate herzustellen, wurden Bakterien aus dem Glycerolstock auf eine Kochblutagarplatte mit IsoVitale X (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dann wurden die Bakterien in 500 mL Brain Heart Infusion mit  $3,5\ \mu\text{g/mL}$  NAD und 2% Difco Supplement B (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Folgend wurden die Bakterien bei  $2500 \times g$  für 15 Minuten und bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und das Zellpellet mit 1x PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 45 Minuten hitzeinaktiviert und mittels Ultraschall für dreimal 30 Sekunden lysiert. Mit Hilfe des Pierce BCA Proteinassays (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) wurde der Proteingehalt auf  $2,5\ \text{mg/mL}$  eingestellt. Die Lysate wurden in 7 mL Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Inaktivierung wurde überprüft indem das Lysat auf Schokoladenagarplatten ausgestrichen wurde und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert wurde.

### **3.2.4 Invasive Lungenfunktionsmessung**

Die invasive Lungenfunktionsmessung wurde im Forschungszentrum Borstel in der Forschungsgruppe von Herrn PD Dr. Michael Wegmann durchgeführt. Die AHR wurde durch Provokation mit Methacholin (MCh, Acetyl-b-methylcholinchlorid; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) unter Verwendung der invasiven Lungenfunktionsmessung (FinePointe RC-Einheiten; Data Sciences International, New Brighton, MN, USA) wie zuvor beschrieben [118] analysiert. Die Mäuse wurden mit Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht; CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht; CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) anästhesiert, kanüliert und mit 150 mL/Atem mechanisch beatmet. Dann wurden die Mäuse mit ansteigenden Konzentrationen von MCh-Aerosolen (in PBS gelöst) provoziert (0 mg/mL, 3,125 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL). Jede Aerosol-Provokation dauerte 30 Sekunden, gefolgt von einer Inkubationszeit von 270 Sekunden.

### **3.2.5 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL) und Bestimmung der Anzahl der Gesamtleukozyten**

Die Tiere wurden mittels einer Dosis von Ketamin (105 mg/kg Körpergewicht; Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Xylazin (7 mg/kg Körpergewicht; Bayer, Leverkusen, Deutschland) euthanasiert. Bei reflexfreiem Verhalten der Tiere wurde der Thorax geöffnet und die Tötung durch Ausbluten vorgenommen. Die Trachea wurde mit einer 18 G Vasofix Braunüle (B.Braun, Melsungen, Deutschland) kanüliert und die Lunge mit 1 mL sterilem PBS lavagiert. Die BAL wurde bei 300 x g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert und das Zellpellet wurde in 1 mL sterilem PBS aufgenommen. Die Bestimmung der Gesamtanzahl der Leukozyten erfolgte lichtmikroskopisch (Leica ICC50, Nußloch, Deutschland) mittels einer Neubauer Zählkammer.

### **3.2.6 Erstellung und Auszählung der Cytospin-Präparate**

Die BAL Zellsuspension wurde in geeigneter Verdünnung mit sterilem PBS auf eine Cytospin-Vorrichtung pipettiert. Mittels Zentrifugation in einer Cytozentrifuge (Cellspin II, Tharmac, Waldsolms, Deutschland) bei 600 rpm für 6 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen auf die Objektträger aufgebracht. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen für 10 Minuten in Methanol bei -20°C fixiert. Für die Auswertung der Cytospin-Präparate wurde das Färbekit PAPPENHEIM-Färbung (MAY GRÜNWARD & GIEMSA) der Firma Morphisto verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Kombinationsfärbung der Färbelösungen Giemsa und May Grünwald Eosin. Die Farbgebung ist pH-abhängig. Dies führt dazu, dass basophile Granula durch die Anfärbung mit Methylenblau lichtmikroskopisch blau bis violett und azidophile Granula, die Eosin anreichern, rot erscheinen. So ist es möglich zwischen verschiedenen Zelltypen, zum Beispiel eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten etc. unterscheiden zu können. Die Cytospin-Präparate wurden für 5 Minuten in einer May-Grünwald Lösung gefärbt, kurz im Puffer nach Weise gewaschen und anschließend etwa 16 Minuten in der Giemsa Lösung gefärbt. Anschließend im Puffer nach Weise und destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit Deckgläschen und FLUKA Eukitt® eingedeckt. Mithilfe eines Lichtmikroskops war es möglich, die Anzahl der verschiedenen Immunzellen zu bestimmen und zu quantifizieren.

### **3.2.7 Verarbeitung der Lunge**

Die Tiere wurden mittels einer Dosis von Ketamin (105 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (7 mg/kg Körpergewicht) euthanasiert und nachdem sie reflexfrei waren, der Thorax geöffnet und die Tötung durch Ausbluten vorgenommen. Die Lunge wurde herauspräpariert und in den rechten und linken Lungenflügel aufgeteilt. Beide Lungenhälften wurden im flüssigen Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde nachfolgend für die RNA Isolation verwendet und der linke Lungenflügel zur Herstellung des Lungenhomogenisates.

### **3.2.7.1 Herstellung des Lungenhomogenisates**

Der linke Lungenflügel wurde in 1 mL 1x sterilem PBS bei 20.000 rpm mit dem ULTRA-TURRAX (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat bei 21.000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C weggefroren.

### **3.2.7.2 RNA Isolierung**

Die rechte Lungenhälfte wurde in 2 mL Trizol (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) mittels eines ULTRA-TURRAX Dispergiergerät (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 5.000 x g, für 4 Minuten bei 4°C wurde etwa 1,6 mL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,4 mL Chloroform vermischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten und anschließender Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 Minuten bei 4°C. Die wässrige Phase, die die RNA enthielt (ca. 1 mL), wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 mL 100% Isopropanol (Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Deutschland) vermischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dann folgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 Minuten bei 4°C, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 mL Ethanol gewaschen und bei 7.500 x g, für 5 Minuten, bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µL RNase-freiem Wasser (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) resuspendiert. Nachfolgend wurde die RNA-Konzentration mit einem Nanodrop-Spektralphotometer (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt und die Konzentration auf 0,5 µg/µL eingestellt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.7.3 cDNA Synthese**

Die complementary DNA (cDNA) – Synthese erfolgte mithilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA). Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA

eingesetzt und es wurden Oligo(dT)<sub>18</sub> primer verwendet. Anschließend wurde die synthetisierte cDNA 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

### 3.2.7.4 Quantitative RT-PCR

Mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) wurde die mRNA-Expression der Gene aus Tabelle 6 bestimmt. Für die RT-PCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Jeder Reaktionsansatz bestand aus 5 µL cDNA, 0,1 µL forward Primer, 0,1 µL reverse Primer, 12,5 µL SYBR Green Master Mix und 7,3 µL nuklease freiem Wasser. Die RT-PCR wurde in einem CFX96 Touch Real time PCR Detection System (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Das Programm setzte sich wie folgt zusammen: 10 Minuten bei 95°C und 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C. Als Kontrolle für die Spezifität der Amplifikation wurde bei jedem Lauf eine Schmelzkurve (65°C - 95°C in 0,5°C Schritten) mitgeführt und Gelelektrophoresen durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet [157].

**Tabelle 6: Auflistung der Primersequenzen [143, 151, 152, 158].** F=forward Primer, R=reverse Primer.

Gen		Primersequenz	Firma
Mouse IL-17C	F	5'-CTG GAA GCT GAC ACT CAC G-3'	Metabion, Planegg, Deutschland
	R	5'-GGT AGC GGT TCT CAT CTG TG-3'	
Mouse IL-6	F	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'	
	R	5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'	
Mouse IL-17RE	F	5'-CTG GCA GTC AAT ACG CTT CA-3'	
	R	5'-TTC TGA CTC CTG TGC TGT GG-3'	
Mouse G-CSF	F	5'-CAG CCC AGA TCA CCC AGA ATC-3'	
	R	5'-CTG CAG GGC CAT TAG CTT CAT-3'	
Mouse KC	F	5'-GCT GGG ATT CAC CTC AAG AA-3'	
	R	5'-AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT-3'	
Mouse MIP-2	F	5'-AAG TTT GCC TTG ACC CTG AA-3'	
	R	5'-AGG CAC ATC AGG TAC GAT CC-3'	

Mouse GAPDH	F R	5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG-3' 5'-CAT TCT CGG CCT TGA CTG-3'	
Mouse 18S	F R	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'	

### 3.2.8 Messung der Zytokine

In den Mausversuchen wurde die Zytokinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit und im Lungenhomogenisat gemessen. In der Patientenstudie wurden die verschiedenen Zytokine im Sputum gemessen.

#### 3.2.8.1 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Duo Set ELISA Development-Kits wurden von der Firma R&D (Tab. 7) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden, wenn nötig, im vorgesehenem Reagent Diluent verdünnt und die Verdünnung bei der Auswertung mit einberechnet.

**Tabelle 7: Verwendete ELISA Kits.**

Duo Set ELISA Development-Kits	Bestellnummer	Firma
Mouse CXCL1/KC	DY453	R&D (Minneapolis, Minnesota, USA)
Mouse G-CSF	DY414	
Mouse IL-6	DY406	
Mouse CXCL2/MIP-2	DY452	
Mouse CCL5/RANTES	DY478	
Mouse IL-5	DY405	
Mouse IL-13	DY413	

Mouse TNF- $\alpha$	DY410	
Mouse IL-17A	DY421	

### 3.2.8.2 Luminex Multiplex Assay

In den Sputumproben der AECOPD-Patienten wurden die Zytokine mittels Luminex Multiplex Assay (R&D, Minneapolis, Minnesota, USA) gemessen. So konnte in einem Ansatz, die Konzentration mehrerer Zytokine mittels MAGPIX System (Luminex corporation, Austin, USA) gemessen werden. Der Assay wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.9 Präparation der Lunge für histologische Färbungen

Für die Herstellung von histologischen Schnitten der Lunge wurde die Maus euthanasiert und die Trachea freipräpariert. Dann wurde eine Verweilkanüle in die Trachea eingeführt und die Lunge mit einem Bindfaden an der Verweilkanüle fixiert. Die Lunge wurde an der Kanüle befestigt, mit 4% gepufferter Formaldehydlösung (Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Deutschland) für 15 Minuten unter konstantem Druck von 30 cmH<sub>2</sub>O fixiert. Dann wurde die Trachea mit einem weiteren Bindfaden abgebunden, in ein Falcon Tube mit 4% gepufferter Formaldehydlösung überführt und für weitere 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Lungen dreimal je 2 Stunden mit 1x PBS gewaschen und nach dem letzten Waschgang bei 60°C für 2 Stunden inkubiert. Folgend wurden die vorgewärmten Lungen mit 1,5% Agarose überflutet und über Nacht bei 60°C aufbewahrt. Nachdem die Agarose mit eingeschlossener Lunge bei Raumtemperatur fest geworden war, wurden 5 mm dicke Gewebestücke geschnitten und überflüssiges Agarose ohne Gewebe entfernt. Die Gewebestücke wurden in Vinyl Schälchen so orientiert, dass sich keine Lungenabschnitte der gleichen Schnittebene nebeneinander befanden. Dies erlaubte drei Schnittebenen gleichzeitig zu analysieren. Die Proben wurden mit 1,5% Agarose überschichtet und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die abgekühlten Blöcke wurden in die Einbettkassetten (Rotilabo-Einbettkassette Makro) überführt und bis zur



Paraffineinbettung in gepuffertem 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden 2  $\mu$ M Paraffin-Lungenschnitte angefertigt. Dann wurden die Lungenschnitte Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt oder für immunhistochemische Färbungen verwendet.

### **3.2.9.1 Immunhistochemische Färbung**

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der in Paraffin eingebetteten Lungenschnitte in Xylol (Roth) und absteigender Ethanolreihe (von 100-70%). Dann folgte die Demaskierung der Antigene. Hierfür wurden die Lungenschnitte in 1 mM EDTA-Puffer (pH 8.0) für 45 Minuten in einer Mikrowelle gekocht. Mittels einer  $H_2O_2$  Lösung wurden unspezifische Peroxidasen inaktiviert und anschließend in einer 2% BSA in TBS-T Lösung nichtspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden die Lungenschnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit primären Antikörpern inkubiert (Tab. 8). Die sekundäre Antikörperinkubation erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Sekundarantikörpern, die von der Firma Nichirei Biosciences bezogen wurden (Tab. 8). Die Farbreaktion (rotbraune Färbung) erfolgte, indem die Lungenschnitte mit einer 3-Amino-9-Ethylkarbazol (AEC) Substratlösung inkubiert wurden. Durch TBS-T (pH 7,4) wurde die Farbreaktion beendet. Anschließend mit der Hämatoxylinlösung nach Mayer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegengefärbt und eingedeckt. Mittels dem Olympus BX51-Mikroskop wurden geblindet Bilder der gefärbten Lungenschnitte aufgenommen. Dann wurde die Anzahl positiv gefärbter Zellen in zufällig und randomisierten Lichtbildern bestimmt und gemittelt oder die Bilder wurden anschließend mittels dem Programm GIMP weiter analysiert. GIMP ermöglichte die Hintergrundfärbung auszublenden, was dazu, führte, dass die spezifische immunhistochemische Färbung ausgewertet werden konnte. Diese Bilder wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet und letztlich konnte die Intensität der Färbung pro Fläche analysiert werden.

**Tabelle 8: Liste der Antikörper die für die immunhistochemische Färbung verwendet wurden.**

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma und Standort</b>	<b>Sekundärer Antikörper</b>
CD3	ab5690	Abcam, Cambridge, UK	Kaninchen (414341F, Nichirei Biosciences, Tokio, Japan)
CD4	ab183685	Abcam, Cambridge, UK	Kaninchen (414341F, Nichirei Biosciences, Tokio, Japan)
Ly6B	MCA771GA	BioRad, München, Deutschland	Ratte (414311F, Nichirei Biosciences, Tokio, Japan)

### 3.2.10 Inflammatorischer Score

Nachdem die in Paraffin eingebetteten Lungenschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung gefärbt worden waren, wurde histologisch der inflammatorische Lungenschaden lichtmikroskopisch bewertet [159]. Die Lungenschnitte wurden geblindet ausgewertet und das Ausmaß der Inflammation betrachtet. Die Beurteilung des inflammatorischen Lungenschadens erfolgte nach Tabelle 9.

**Tabelle 9: Beurteilung des inflammatorischen Lungenschadens.**

<b>Punktzahl</b>	<b>Infiltrate</b>
<b>0</b>	Nicht vorhanden
<b>1</b>	Gering
<b>2</b>	Stark
<b>3</b>	Sehr stark

### **3.2.11 Stereologische Auswertung**

Die stereologische Untersuchung erfolgte nach Fehrenbach [160]. Die Lungenschnitte wurden mittels HE gefärbt und mithilfe eines Mikroskops (Olympus BX51, Hamburg, Deutschland) und der Software Visiopharm Integrator System (VIS, Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) stereologisch ausgewertet. Mit einer 1,25-fachen Vergrößerung wurden Übersichtsbilder der Lunge erstellt. Dann erfolgte die detaillierte Aufnahme der Lunge bei 20-facher Vergrößerung. Mittels der Software wurde ein zufälliges Raster aus Linien auf die zu analysierenden Bilder gelegt. Für die Berechnung des mean chord length (MCL, Einheit:  $\mu\text{m}$ ) durch die Software wurden die alveolaren Septen an den Schnittpunkten mit dem Raster markiert.

### **3.2.12 Sputum-Gewinnung bei akut exazerbierten COPD-Patienten**

Das Protokoll für die Sputum Gewinnung bei Patienten mit AECOPD wurde von der Ethikkommission (Institutional Review Board) der Landesärztekammer des Saarlandes genehmigt und die Einwilligungserklärung der Patienten eingeholt. Die Sputumproben wurden gesammelt, gewogen und mit 2 mL Sputolysin (0,1% DTT in RNA-freiem Wasser) pro Gramm Sputumprobe versetzt. Nach anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten wurde PBS in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben und die Proben 15 Sekunden gevortext. Die Proben wurden 10 Minuten bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentrationen verschiedener Zytokine wurden mittels Luminex Multiplex Assay bestimmt.

## **3.3 Statistische Analysen**

Die statistische Auswertung der nachfolgenden Experimente erfolgte mittels der Software GraphPad Prism (San Diego, Kalifornien, USA). Dabei wurden die p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Die Korrelationsanalysen der humanen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Spearman Korrelationstest durchgeführt. Bei zwei Subgruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mittels dem Student's t-

Test, bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Analyse zwischen mehreren Gruppen erfolgte mittels Varianzanalysen (analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem post-hoc Turkey Test bei statistischer Normalverteilung. Die Berechnung erfolgte mittels der Verwendung der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse von Entzündungsmediatoren im Sputum von COPD-Patienten während einer AECOPD

Zellkulturstudien zeigten, dass Keime wie Rhinoviren und NTHi akute Exazerbationen der COPD auslösen können und die Expression von IL-17C sowohl in Atemwegsepithelzellen als auch in Pneumozyten induzieren können [142, 155]. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass Atemwegsepithelzellen von COPD-Patienten bei Stimulation mit Rhinoviren beziehungsweise NTHi verstärkt IL-17C bilden und dass IL-17C die Bildung von Zytokinen und Chemokinen fördert [155]. Es stellte sich daher die Frage, inwiefern IL-17C im Sputum von COPD-Patienten während einer AECOPD vorhanden ist und wie es mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert.

#### 4.1.1 Stammdaten des untersuchten Patientenkollektivs

In der Klinik für Innere Medizin V - Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des Uniklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals wurden Sputumproben von COPD-Patienten während einer AECOPD gesammelt. Die Patienten sind aufgrund von Lungenfunktionsmessungen und anderen Untersuchungen gemäß den GOLD Richtlinien eingeteilt worden. Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit einer moderaten COPD (GOLD Status I und II) und Patienten mit einer fortgeschrittenen COPD (GOLD Status III und IV). Die Stammdaten der Patienten befinden sich in Tabelle 10. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Alter der Patienten zwischen den beiden Gruppen. Patienten mit fortgeschrittener COPD wiesen signifikant mehr Packungsjahre als Patienten mit moderater COPD auf. Es zeigte sich auch, dass die Patienten mit GOLD III/IV Status einen signifikant geringeren FEV<sub>1</sub> (% soll) Wert in der Lungenfunktion aufwiesen.

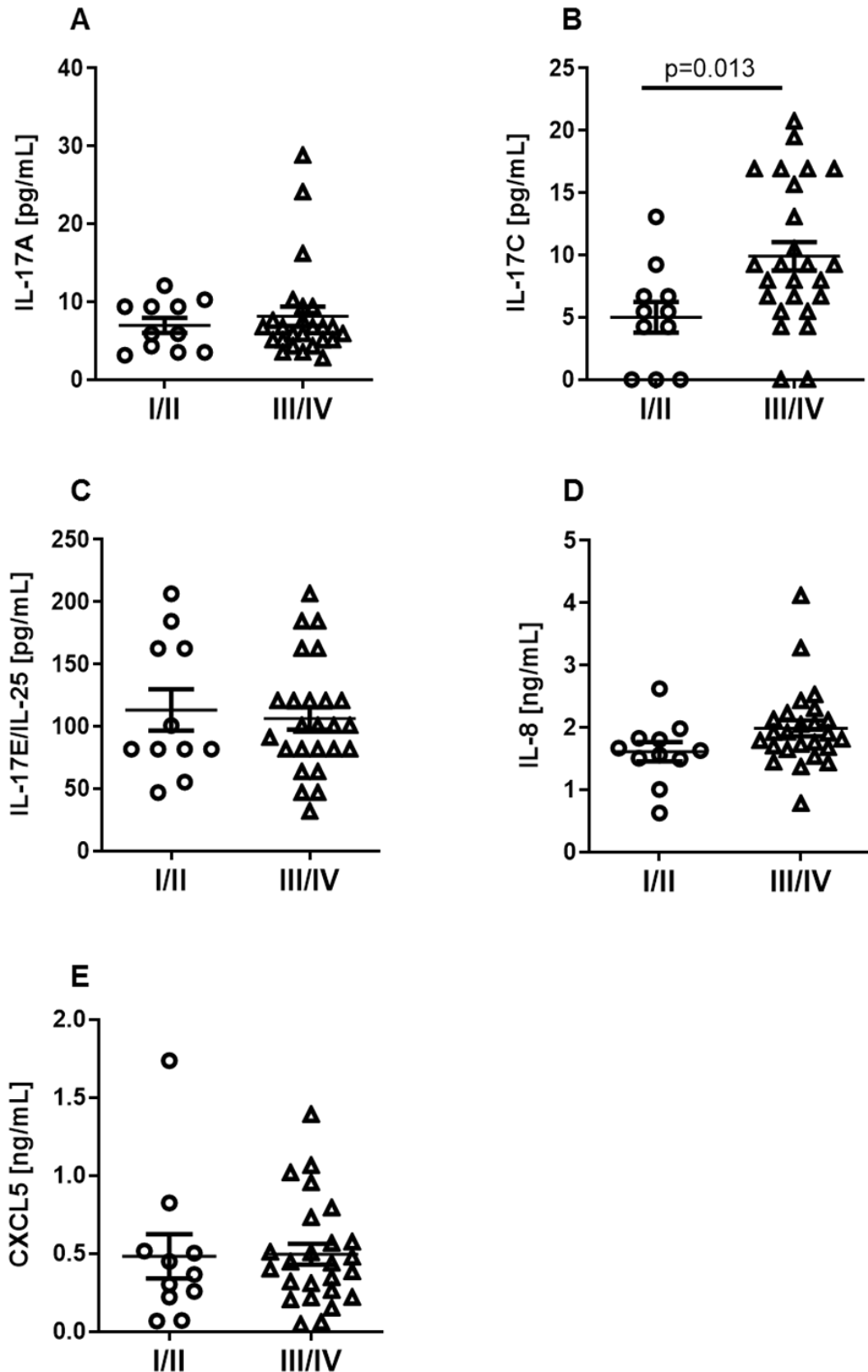
**Tabelle 10: Stammdaten des untersuchten COPD Patientenkollektivs.**

Parameter	GOLD I/II	GOLD III/IV	p-Wert
Patienten	11	25	-
Geschlecht (W/M)	5/6	8/17	-
Alter (Jahre)	70,27 ± 10,23	69,2 ± 11,95	ns
Derzeitige Raucher	3/11	10/25	-
Packungsjahr	19,00 ± 19,34	48,88 ± 35,98	0,014
FEV <sub>1</sub> (% soll)	63,45 ± 9,44	38,17 ± 8,95	<0,0001

Statistik: Mann-Whitney-Test; Mean±SD; ns = nicht signifikant.

#### 4.1.2 IL-17C ist im Sputum bei fortgeschrittener COPD erhöht

In den Sputumproben wurden die Konzentrationen der IL-17 Zytokine IL-17A, IL-17C und IL-17E sowie die Konzentrationen der neutrophilen-rekrutierenden Chemokinen IL-8 und CXCL5 mittels Luminex Multiplex Assays gemessen. Es zeigte sich, dass IL-17C bei fortgeschrittener COPD signifikant erhöht war (Abb. 11B), während IL-17A und IL-17E nicht mit dem Schweregrad der COPD assoziierten (Abb. 11A und C). Es ergab sich zudem kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der COPD und den Konzentrationen von IL-8 und CXCL5 (Abb. 11D und E, Tab. 11).



**Abbildung 11: IL-17C ist bei fortgeschrittener COPD erhöht.** Konzentrationen von (A) IL-17A, (B) IL-17C, (C) IL-17E/IL-25, (D) IL-8 und (E) CXCL5 im Sputum von GOLD I/II (n=11) und GOLD III/IV (n=25) COPD-Patienten während der AECOPD. Horizontale Linien geben die Mittelwerte an. Statistik: Mann-Whitney-Test.

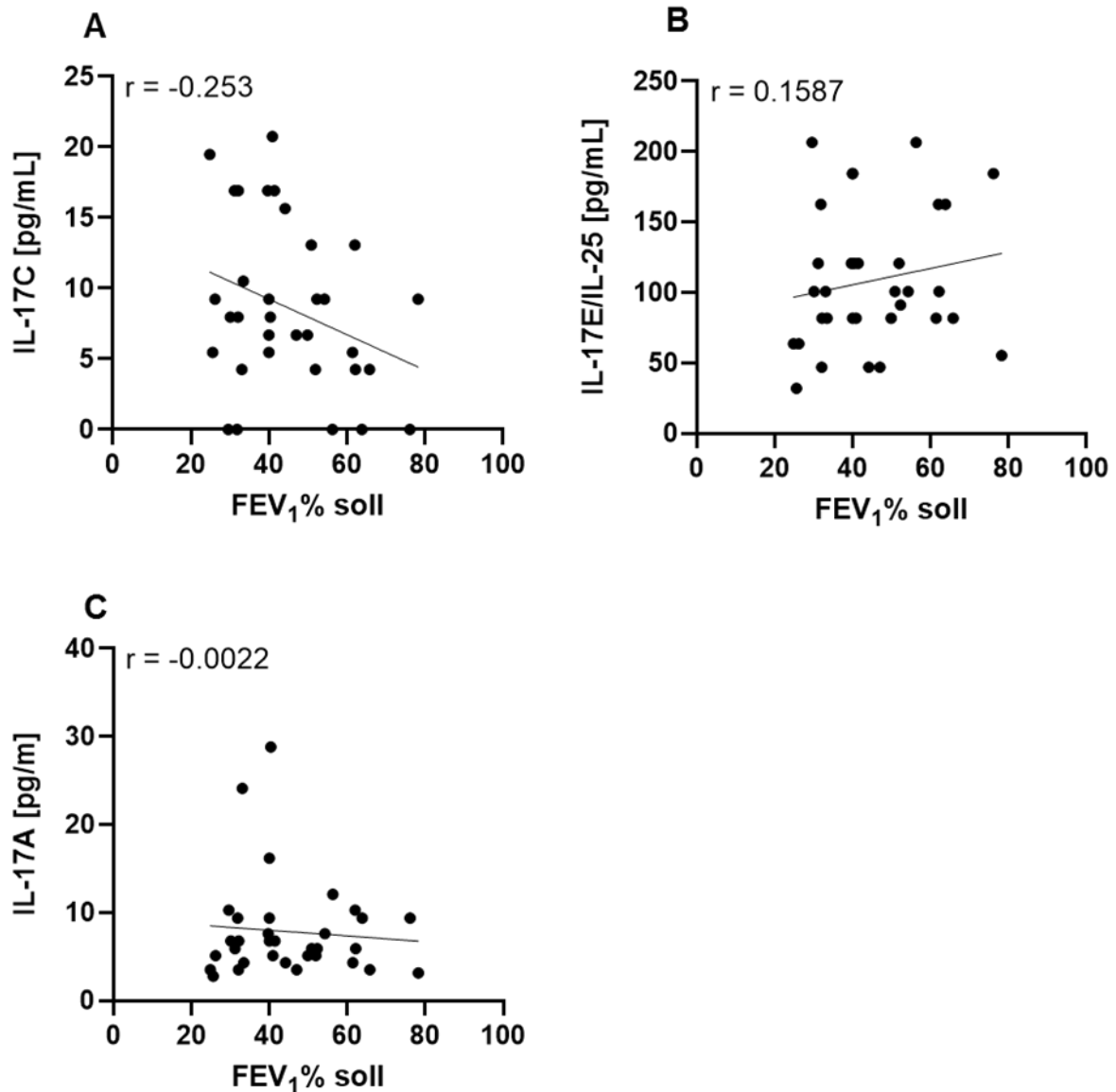
**Tabelle 11: Konzentrationen der Zytokine IL-17A, IL-17C, IL-17E, IL-8 und CXCL5 im Sputum von COPD-Patienten im GOLD Status I/II (n=11) und III/IV (n=25) während der AECOPD.**

Parameter	GOLD I/II	GOLD III/IV	p-Wert
IL-17A [pg/mL]	6,99 (3,19)	8,16 (6,18)	0,9002
IL-17C [pg/mL]	5,01 (4,07)	9,90 (5,75)	<b>0,013</b>
IL-17E [pg/mL])	113,31 (55,26)	106,4 (45,26)	>0,9999
IL-8 [ng/mL]	1,61 (0,51)	1,99 (0,64)	0,079
CXCL5 [ng/mL]	0,48 (0,47)	0,49 (0,33)	0,68

GOLD=Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; Mean±SD

Es wurde die Korrelation zwischen den Interleukinen der IL-17 Zytokin-Familie und der Lungenfunktionsmessung analysiert. Der nicht-parametrische Spearman-Korrelationstest ergab keine signifikante Korrelation der IL-17A, IL-17C und IL-17E/IL-25 Konzentrationen (Abb.12A - C) mit der Lungenfunktion (FEV<sub>1</sub> % soll).



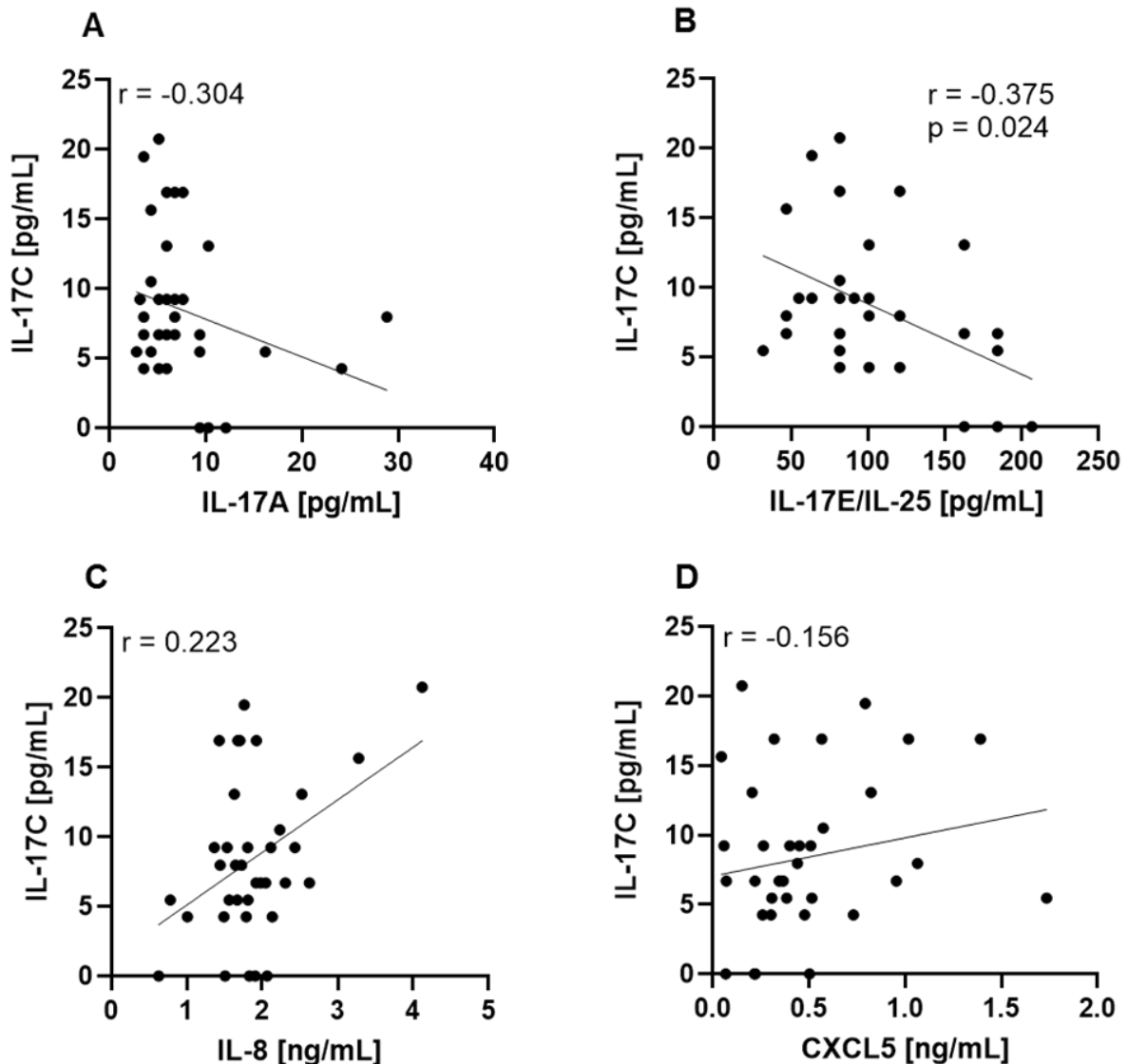


**Abbildung 12: Korrelationsanalysen zwischen den Konzentrationen der IL-17 Zytokine und der Lungenfunktion.** Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Konzentrationen von (A) IL-17C, (B) IL-17E/IL-25 und (C) IL-17A mit dem FEV<sub>1</sub> (% soll) Wert aus der Lungenfunktionsmessung. Die Konzentrationen der angegebenen Zytokine wurde in den Sputumproben von COPD-Patienten während der AECOPD (n=36) mittels Luminex Multiplex Assays gemessen. Die Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des nichtparametrischen Spearman-Korrelationstests durchgeführt.

#### 4.1.3 IL-17C korreliert negativ mit IL-17E/IL-25

Weitere Korrelationsanalysen zeigten, dass die Konzentrationen von IL-17C und IL-17A nicht signifikant korrelieren, während sich eine signifikant negative Korrelation zwischen IL-17C und IL-17E/IL-25 ergab (Abb. 13A und B). Zudem ist die IL-17C

Konzentration mit steigender IL-8 Konzentration assoziiert, allerdings ohne eine Signifikanz zu erreichen (Abb. 13C). Eine Korrelation zwischen IL-17C mit CXCL5 ist nicht vorhanden (Abb. 13D).

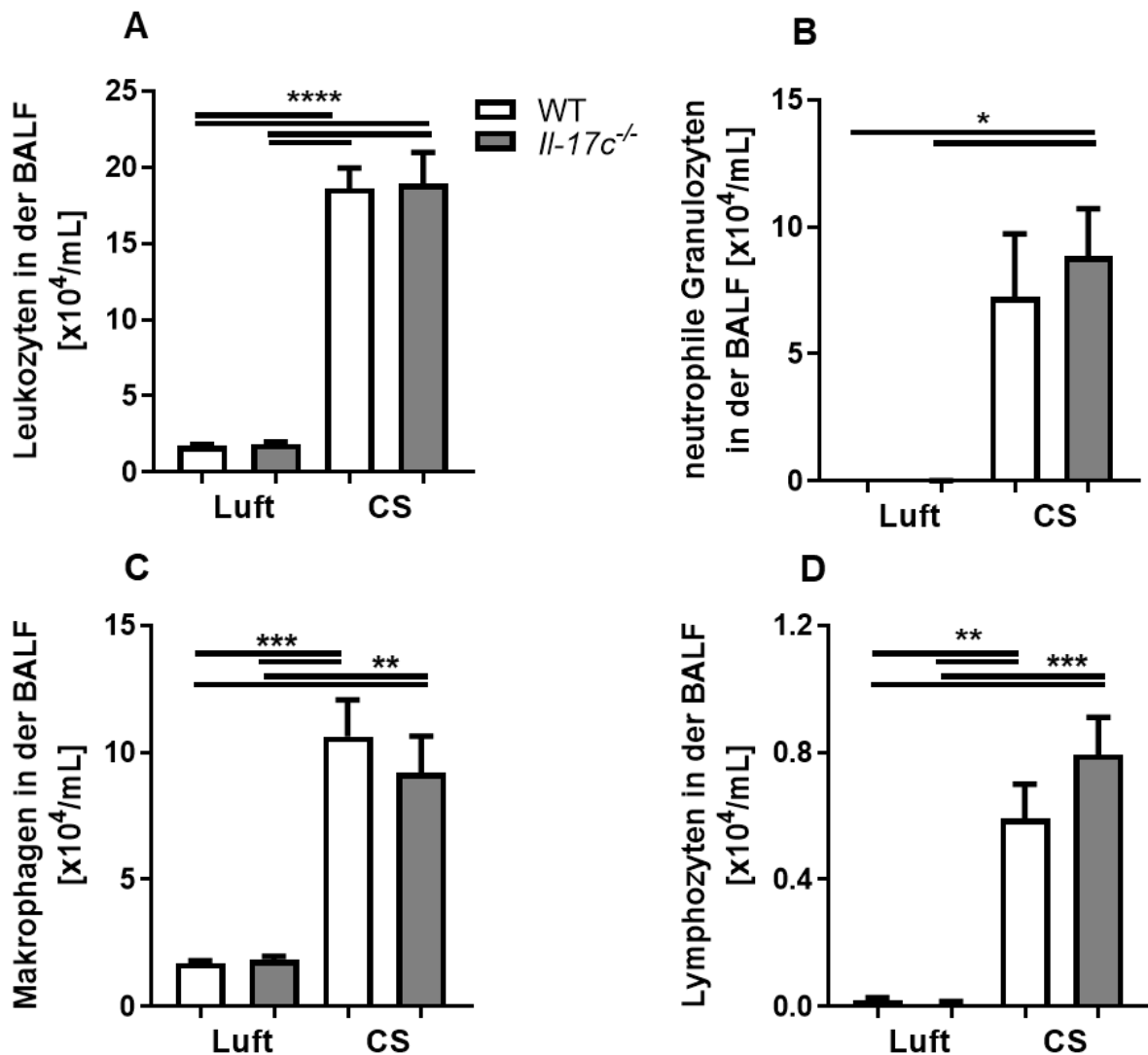


**Abbildung 13: IL-17C korreliert negativ mit IL-17E/IL-25.** Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Konzentrationen von (A) IL-17A, (B) IL-17E/IL-25, (C) IL-8, (D) CXCL5 und der IL-17C Konzentration. Die Konzentrationen der angegebenen Zytokine wurden in den Sputumproben von COPD-Patienten während der AECOPD (n=36) mittels Luminex Multiplex Assays gemessen. Die Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des nichtparametrischen Spearman-Korrelationstests durchgeführt.

## 4.2 Funktion von IL-17C in COPD-Mausmodellen

### 4.2.1 IL-17C hat keinen Einfluss auf den CS-induzierten Anstieg der Anzahl der Entzündungszellen

CS erhöht das Risiko für Infektionskrankheiten und ist die Hauptursache für COPD. Daher wurde zunächst untersucht, ob IL-17C eine CS-induzierte Entzündung der Lunge vermittelt. Dazu wurden WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse 4 Wochen lang für 5 Tage die Woche CS exponiert. Um die Auswirkung von CS auf die Immunantwort der Lunge zu bestimmen, wurden die Entzündungszellen in den BAL-Flüssigkeiten 24 Stunden nach der letzten CS-Exposition ermittelt. Die Gesamtzellzahl der Leukozyten in den BAL-Flüssigkeiten war nach der CS-Exposition sowohl in den WT Mäusen, als auch in den IL-17C-defizienten Tieren signifikant erhöht (Abb. 14A). Das Differentialzellbild ergab, dass WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse nach der CS-Exposition eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in den BAL-Flüssigkeiten aufwiesen (Abb. 14B - D). Demnach hatte eine Defizienz von IL-17C keinen Einfluss auf den CS-induzierten Anstieg der Anzahl der Entzündungszellen in der Lunge der Mäuse.



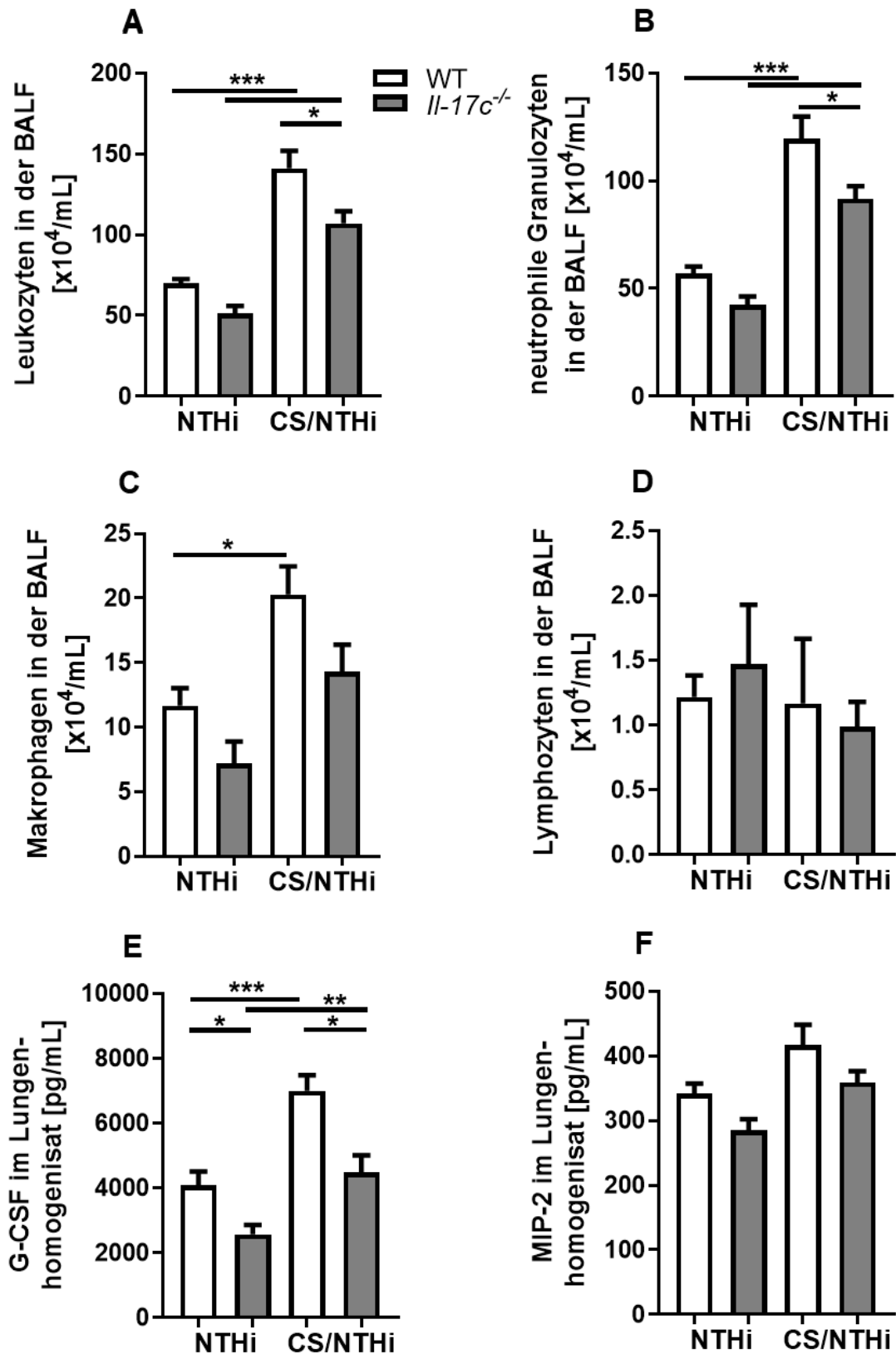
**Abbildung 14: IL-17C hat keinen Einfluss auf den CS-induzierten Anstieg der Anzahl der Entzündungszellen.** WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 4 Wochen lang CS oder Raumluft ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Mauslungen lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Anfertigung der Cytospin-Präparate und Färbung wurden die verschiedenen Subtypen der Immunzellen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Die Gesamtzellzahl der Leukozyten, die Anzahl der (B) neutrophilen Granulozyten, (C) Makrophagen und (D) Lymphozyten in den BAL-Flüssigkeiten (BALF) sind dargestellt. Statistik: One-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (n = 4-5); Mean±SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 und \*\*\*\* p<0,0001.

#### 4.2.2 IL-17C vermittelt eine akute Entzündung der Lunge

Gramnegative Bakterien wie NTHi lösen nicht nur akute Exazerbationen aus, sondern infizieren und besiedeln auch häufig die Lunge von stabilen COPD-Patienten. Dies verstärkt die chronische Entzündung der Lunge und führt zum Verlust der

Lungenfunktion [22, 161]. Auch ist bekannt, dass die AECOPD häufig mit einer erhöhten neutrophilen Entzündung der Lunge einhergeht [162, 163]. Im Folgenden wurde daher die Funktion von IL-17C bei einer akuten Entzündung der Lunge untersucht. Hierfür wurden WT und IL-17C-defiziente Mäuse an 3 Tagen NTHi (Tag 1, 3 und 5) oder der Kombination aus NTHi und CS (Tag 1-5) ausgesetzt. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten NTHi-Exposition analysiert.

Die Exposition gegenüber der Kombination von CS/NTHi führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Leukozyten in WT Mäusen, im Vergleich zu nur NTHi-exponierten WT Mäusen (Abb. 15A). Eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl wurde auch bei den CS/NTHi-exponierten *Il-17c*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den nur NTHi-exponierten *Il-17c*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet. Die Gesamtzellzahl der Leukozyten in den BAL-Flüssigkeiten von CS/NTHi-exponierten *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen war jedoch signifikant niedriger, als die Leukozytenzahl die in CS/NTHi-exponierten WT Mäusen gefunden wurde (Abb. 15A). Das Differentialzellbild ergab, dass die Unterschiede in der Anzahl der BAL-Zellen zwischen den CS/NTHi-exponierten WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen auf eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen zurückzuführen sind (Abb. 15B und C). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war bei CS/NTHi-exponierten *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger, im Vergleich zu den gleichbehandelten WT Mäusen. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Lymphozyten zwischen WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 15D). Ferner wurden die Konzentrationen von Chemokinen mittels ELISA gemessen, von denen bekannt ist, dass sie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermitteln. Die Konzentrationen von G-CSF im Lungenhomogenisat waren sowohl bei den NTHi- als auch bei der Kombination von CS/NTHi-exponierten *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant verringert (Abb. 15E). Hingegen waren die Konzentrationen von MIP-2 im Lungenhomogenisat zum gemessenen Zeitpunkt nicht signifikant, von der IL-17C Defizienz betroffen (Abb. 15F).

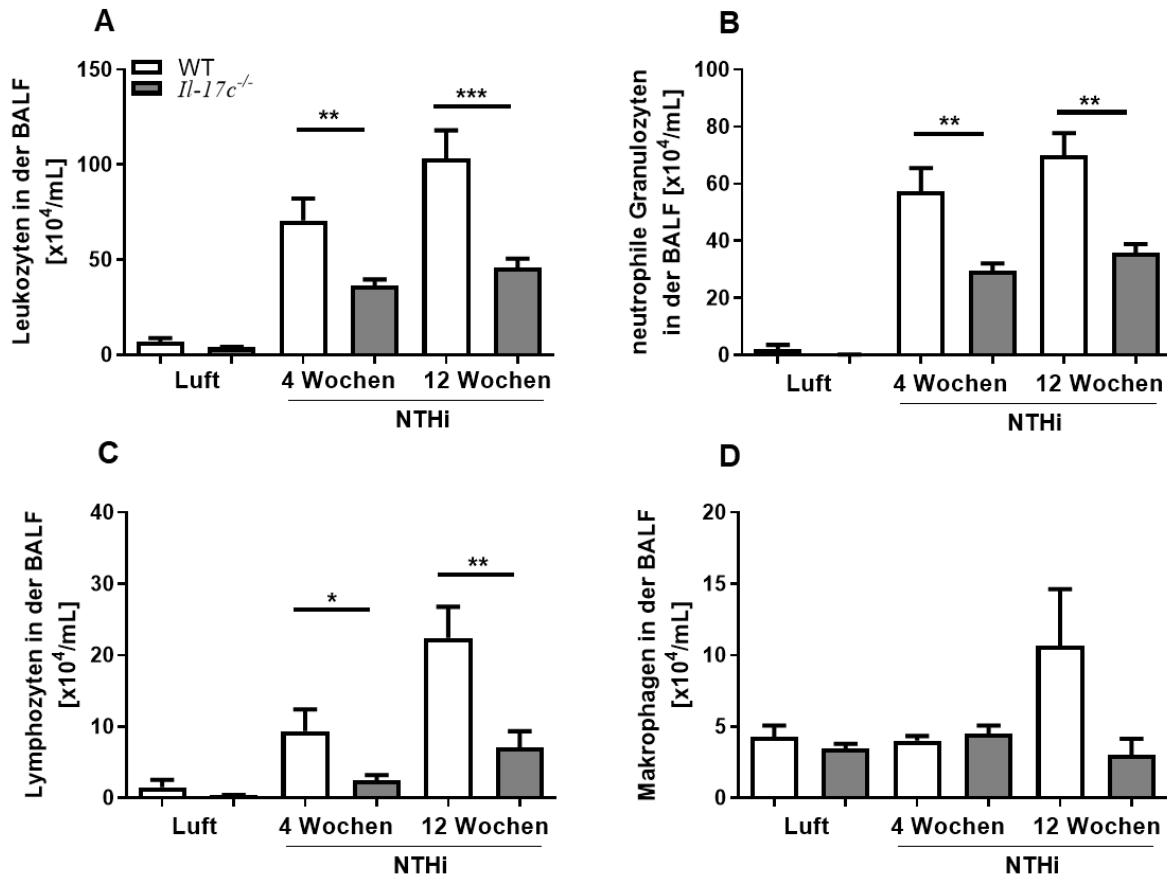


**Abbildung 15: IL-17C trägt zur COPD-ähnlichen pulmonalen Entzündung bei.** WT und IL-17C-defiziente Mäuse wurden an 3 Tagen NTHi (Tag 1, 3 und 5) oder der Kombination aus NTHi und CS (Tag 1-5) ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Mauslungen lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Anfertigung der Cytospin-Präparate und Färbung wurden

die verschiedenen Subtypen der Immunzellen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Die Gesamtzellzahl der Leukozyten, die Anzahl der (B) neutrophilen Granulozyten, (C) Makrophagen und (D) Lymphozyten in den BAL-Flüssigkeiten (BALF) sind dargestellt. Die Konzentrationen von (E) G-CSF und (F) MIP-2 wurden im Lungenhomogenisat mittels ELISA gemessen. Statistik: One-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (n=4-7); Mean±SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01 und \*\*\* p<0,001.

#### 4.2.3 IL-17C vermittelt chronische neutrophile Entzündung der Lunge

Im Folgenden wurde die Funktion von IL-17C bei einer chronischen, COPD-ähnlichen Entzündung der Lunge untersucht. Hierzu wurden WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse dreimal wöchentlich für die ersten 4 Wochen und einmal wöchentlich für die folgenden 8 Wochen hitzeinaktivierten NTHi-exponiert. Als Kontrolle dienten Raumluft exponierte Mäuse. Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der letzten Exposition auf verschiedene Entzündungsparameter analysiert. Die WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Kontrollmäuse zeigten in ihren Lungen keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl und Zusammensetzung der Immunzellen (Abb. 16A). Die NTHi-Exposition führte zu einer stark erhöhten Anzahl der Leukozyten in den BAL-Flüssigkeiten. Bei den *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen war sowohl nach 4- als auch nach 12-wöchiger NTHi-Exposition die Gesamtzellzahl der Leukozyten in den BAL-Flüssigkeiten, verglichen mit den NTHi-exponierten WT Mäusen, signifikant vermindert (Abb. 16A). Das Differentialzellbild ergab, dass die NTHi-Exposition zu einer neutrophilen Granulozyten-dominierten Entzündung führte, wobei die Anzahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten in den Mauslungen von *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nach 4- und 12-wöchiger NTHi-Exposition signifikant geringer war (Abb. 16B). Auch die Anzahl der Lymphozyten war in den BAL-Flüssigkeiten von *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nach NTHi-Exposition signifikant vermindert (Abb. 16C). Bei der Anzahl der Makrophagen zeigte sich nach NTHi-Exposition kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 16D).

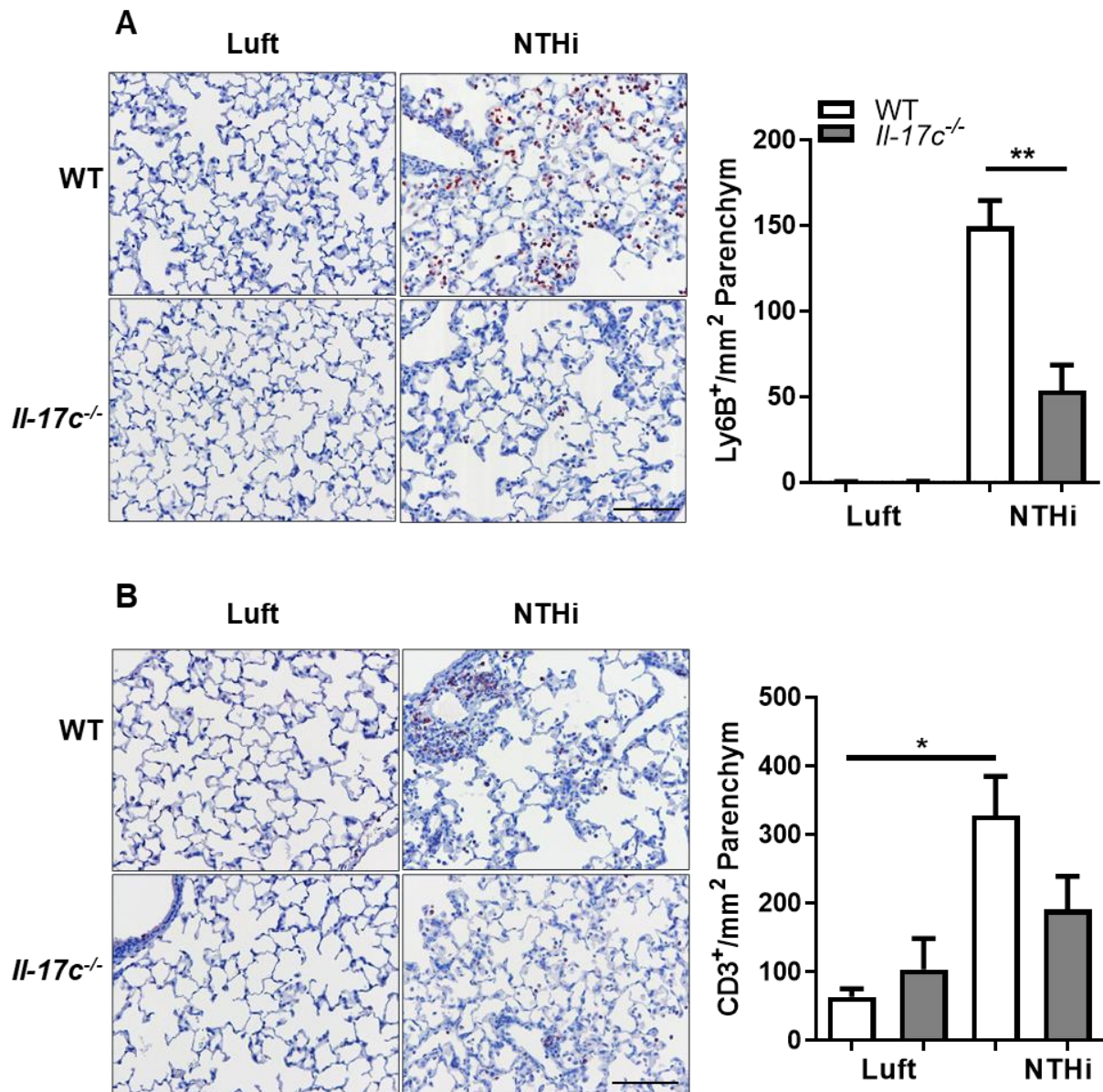


**Abbildung 16: Anzahl der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit nach 4- und 12-wöchiger NTHi Exposition.** WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 4 oder 12 Wochen NTHi- oder Raumluft (Kontrollgruppe) exponiert. Anschließend wurden die Mauslungen lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Anfertigung der Cytospin-Präparate und Färbung wurden die verschiedenen Subtypen der Immunzellen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Die Gesamtzellzahl der Leukozyten, die Anzahl der (B) neutrophilen Granulozyten, (C) Lymphozyten und (D) Makrophagen in den BAL-Flüssigkeiten (BALF) sind dargestellt. Statistik: Student's t-Test; zweiseitig (Luft: n=6-8; 4 Wochen: n=6-7; 12 Wochen: n=3-4); Mean±SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01 und \*\*\* p<0,001.

Darüber hinaus wurden nicht-lavagierte Mauslungen nach 4-wöchiger NTHi-Exposition in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden für immunhistochemische Analysen verwendet. Die Gewebeschnitte wurden hinsichtlich Ly6B<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen analysiert. Im Parenchym der WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Kontrollmäuse waren wenige Ly6B<sup>+</sup> Zellen vorhanden. Hingegen führte die chronische Entzündung zu einer erhöhten Anzahl von segmentkernigen Ly6B<sup>+</sup> Zellen im Parenchym der Mauslungen, wobei die NTHi-exponierten *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant weniger Ly6B<sup>+</sup> Zellen im Parenchym aufwiesen, als die NTHi-exponierten WT Mäuse (Abb. 17A). Die chronische NTHi-induzierte Entzündung führte zu einer signifikant

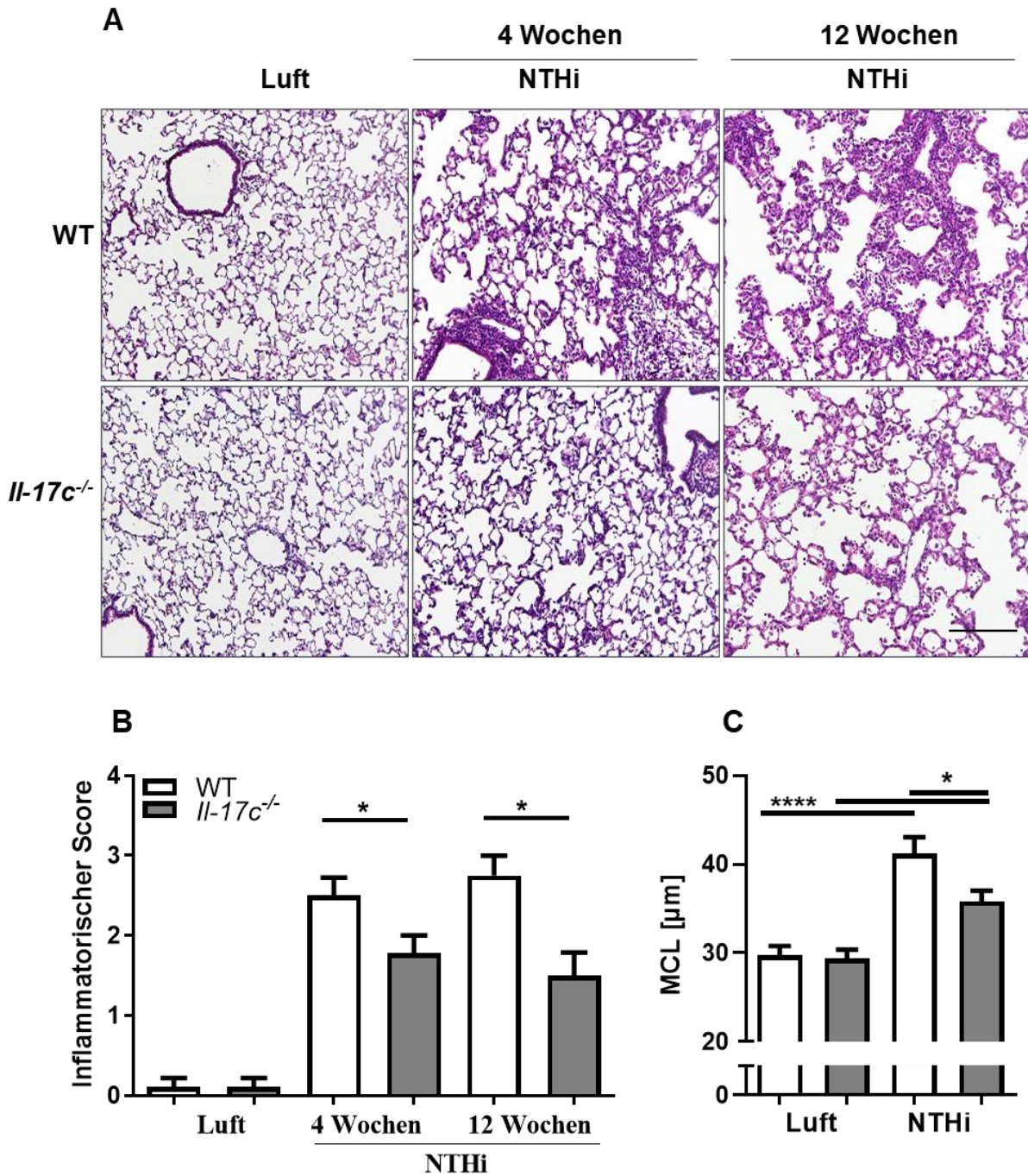


erhöhten Anzahl von CD3<sup>+</sup> Zellen im Parenchym von WT Mäusen. Hingegen war die Anzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen bei *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht signifikant erhöht (Abb. 17B).



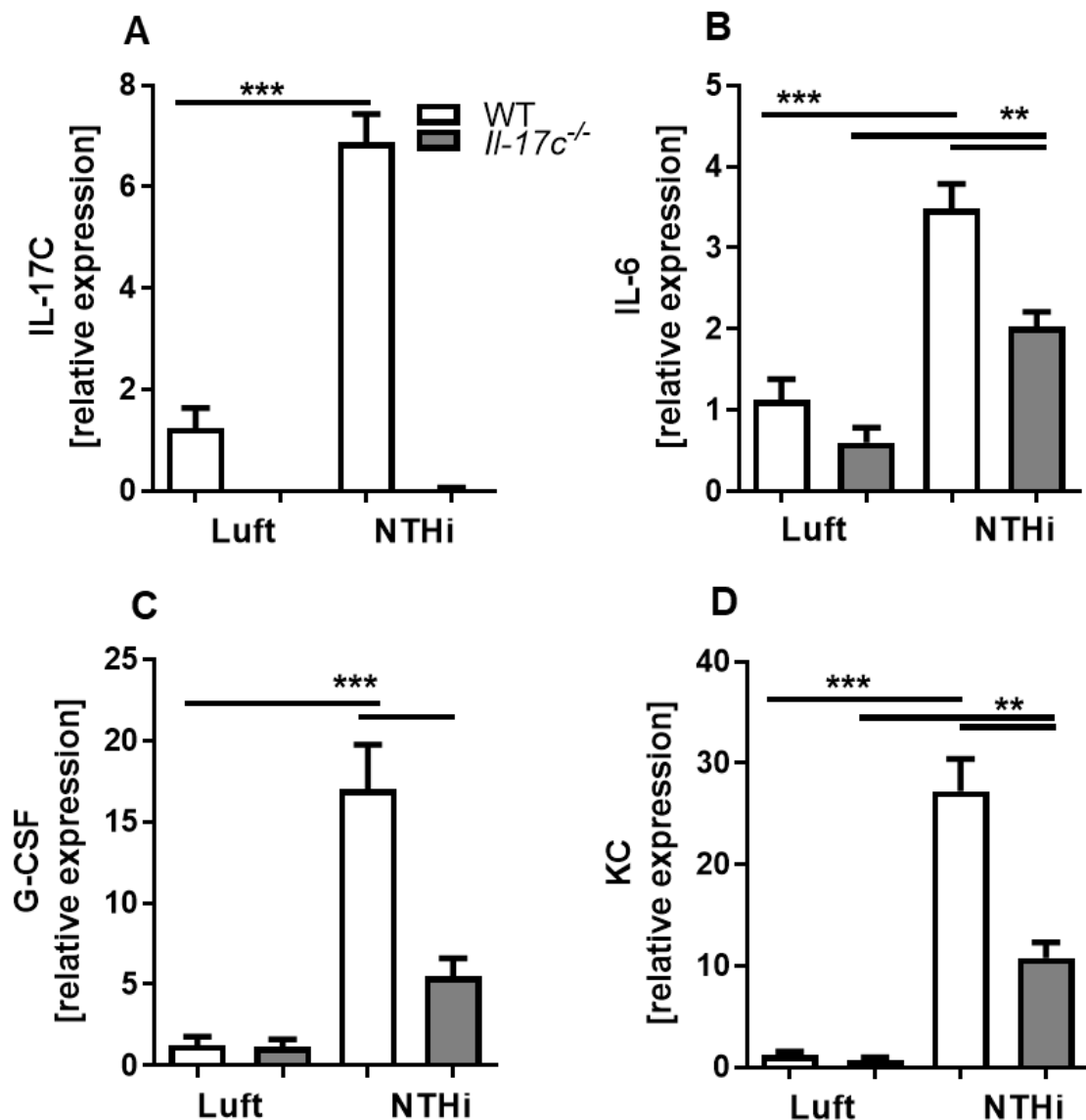
**Abbildung 17: Repräsentative immunhistochemische Färbung von Ly6B und CD3 nach 4-wöchiger NTHi Exposition.** WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden dreimal die Woche für insgesamt 4 Wochen NTHi- oder Raumluft exponiert. Die Mauslungen wurden in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Lungenschnitte wurden immunhistochemisch für (A) Ly6B und (B) CD3 gefärbt und die positiv gefärbten Zellen im Lungenparenchym der Mäuse quantifiziert. Statistik: Student's t-Test; zweiseitig (n=6); Skala: 100 µm; Mean±SEM; \*p<0,05 und \*\* p<0,01.

Die histologische Bewertung der Lungenschnitte zeigte, dass der entzündungsinduzierte Lungenschaden bei *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen vermindert war (Abb. 18A). Die semiquantitative Bewertung des Lungengewebes ergab, dass das Zellinfiltrat nach 4- und 12-wöchiger Exposition mit NTHi bei den IL-17C-defizienten Mäusen im Vergleich zu den NTHi-exponierten WT Mäusen signifikant vermindert ausfiel (Abb. 18B). Der MCL, welcher die Distanz innerhalb der distalen Lufträume anzeigt, war sowohl bei den WT als auch bei den *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen nach 4-wöchiger NTHi Exposition im Vergleich mit jeweiliger Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 18C). Die *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäuse wiesen nach Exposition mit NTHi, im Vergleich zu den NTHi-exponierten WT Tieren, einen signifikant verminderten MCL auf (Abb. 18C).



**Abbildung 18: WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 4 und 12 Wochen NTHi exponiert oder als Kontrolle Raumluft exponiert.** Für die Lungenhistologie und zur inflammatorischen Bewertung wurden die Mauslungen in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte HE gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. (A) Repräsentative Lungenhistologie und (B) der inflammatorische Score für die 4 und 12 Wochen NTHi-exponierten Mäuse. (C) Der MCL für die 4 Wochen NTHi behandelten Mäuse. Statistik: Student's t-Test; zweiseitig (4 Wochen n=9-10, 12 Wochen n=4); Skala: 200 µm; Mean±SEM; \*p<0,05 und \*\*\*\*p<0,001.

Darüber hinaus wurde die Expression von Entzündungsmediatoren in Lungen von Mäusen, die für 4 Wochen NTHi exponiert wurden, mittels qRT-PCR analysiert. Die relative mRNA-Expression von IL-17C war in der Lunge von WT Mäusen nach Exposition mit NTHi signifikant erhöht (Abb. 19A). Wie erwartet war keine IL-17C mRNA bei den *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisbar (Abb. 19A). Die nach Exposition mit NTHi gesteigerte mRNA-Expression der Zytokine IL-6, G-CSF und KC wurde durch die Defizienz für IL-17C signifikant vermindert (Abb. 19B - D).



**Abbildung 19: Expression von IL-17C, IL-6, G-CSF und KC in der Mauslunge von WT und *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nach 4-wöchiger NTHi Exposition.** 24 Stunden nach der letzten NTHi Exposition wurden die Lungen der Mäuse entnommen, die Gesamt-RNA isoliert, hieraus wurde die cDNA synthetisiert und anschließend die Expression von (A) IL-17C, (B) IL-6, (C) G-CSF und (D) KC analysiert. One-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: n=5; NTHi: n=6); Mean±SEM; \*\* p<0,01 und \*\*\* p<0,001

Nachfolgend wurden die Konzentrationen verschiedener proinflammatorischer Entzündungsmarker in den BAL-Flüssigkeiten der Mäuse mittels ELISA bestimmt (Abb. 20A - C). Die NTHi Exposition führte zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 und G-CSF Konzentrationen in den BAL-Flüssigkeiten von WT und IL-17C-defizienten Mäusen (Abb. 20A und B). Zudem waren die Konzentrationen von IL-6 und G-CSF nach Exposition mit NTHi in den BAL-Flüssigkeiten von *Il-17c*<sup>-/-</sup> im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant vermindert. Die Konzentration von KC war in den BAL-Flüssigkeiten nach NTHi Exposition in beiden Mausstämmen signifikant erhöht (Abb. 20C).

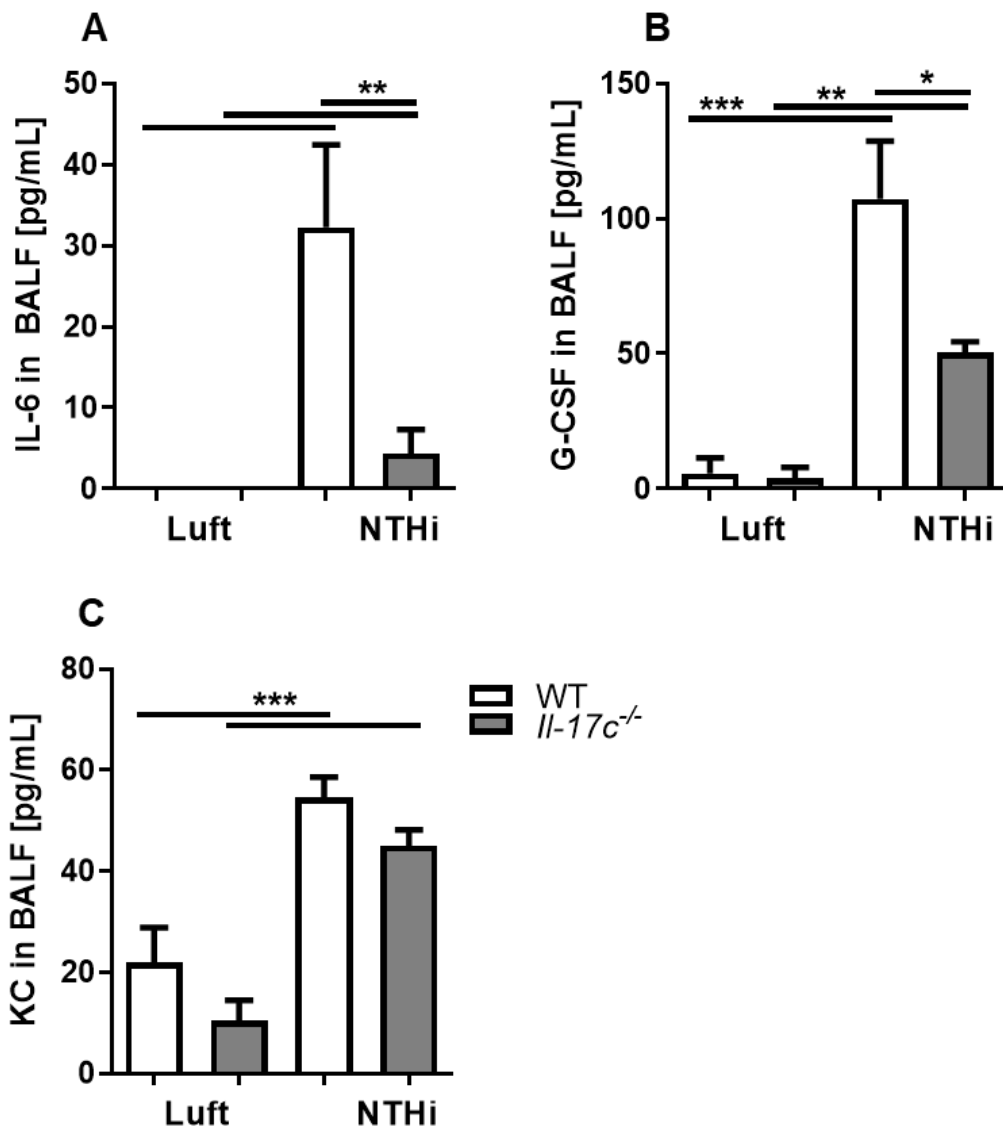


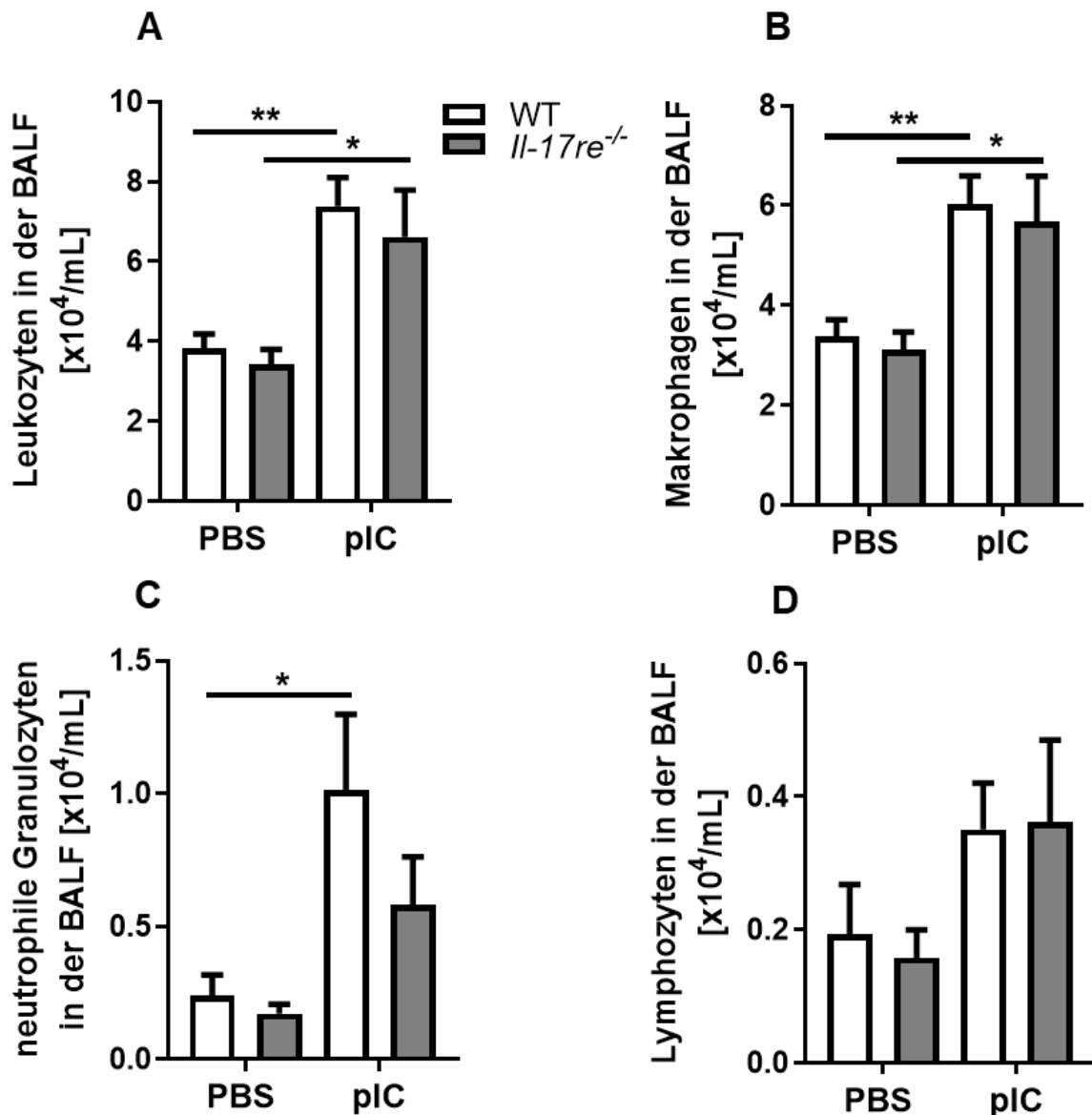
Abbildung 20: Konzentrationen der proinflammatorischen Entzündungsmediatoren IL-6, G-CSF und KC in der BAL-Flüssigkeit von WT und

***Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nach 4-wöchiger NTHi Exposition.** 24 Stunden nach der NTHi Exposition wurden die Mauslungen lavagiert. Im zellfreien Überstand (BALF) wurden die Konzentrationen an (A) IL-6, (B) G-CSF und (C) KC mittels ELISA bestimmt. Statistik: One-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (Luft: n=6-7; NTHi: n=7); Mean±SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01 und \*\*\* p<0,001.

### **4.3 pIC induziert eine akute Entzündungsreaktion in der Lunge unabhängig von dem IL-17C Rezeptor IL-17RE**

Rezeptoren der angeborenen Immunantwort wie TLR spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung einer durch Pathogene ausgelösten Entzündung der Lunge. TLR-3 erkennt doppelsträngige virale RNA sowie das pIC, was synthetisch analog dazu ist [117, 119, 164]. Studien zeigten, dass pIC und Viren die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen induzieren [142, 154, 155].

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich im Mausmodell die Defizienz für den IL-17C Rezeptor IL-17RE auf die pIC-induzierte akute Entzündung der Lunge auswirkt. Hierfür wurde WT und IL-17RE-defizienten Mäusen 100 µg pIC intranasal verabreicht. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der Gabe von pIC analysiert. Die intranasale Gabe von pIC führte sowohl bei den WT als auch bei den *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen, verglichen mit scheininfizierten Kontrolltieren, zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Entzündungszellen in den BAL-Flüssigkeiten (Abb. 21A). Das Differentialzellbild ergab, dass die Anzahl der Makrophagen nach der Gabe von pIC bei WT und *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht war (Abb. 21B), wohingegen der Anstieg der neutrophilen Granulozyten nur bei WT Mäusen signifikant ausfiel (Abb. 21C). Die Anzahl der Lymphozyten war in den BAL-Flüssigkeiten von WT und *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen nach der Gabe von pIC leicht erhöht (Abb. 21D).

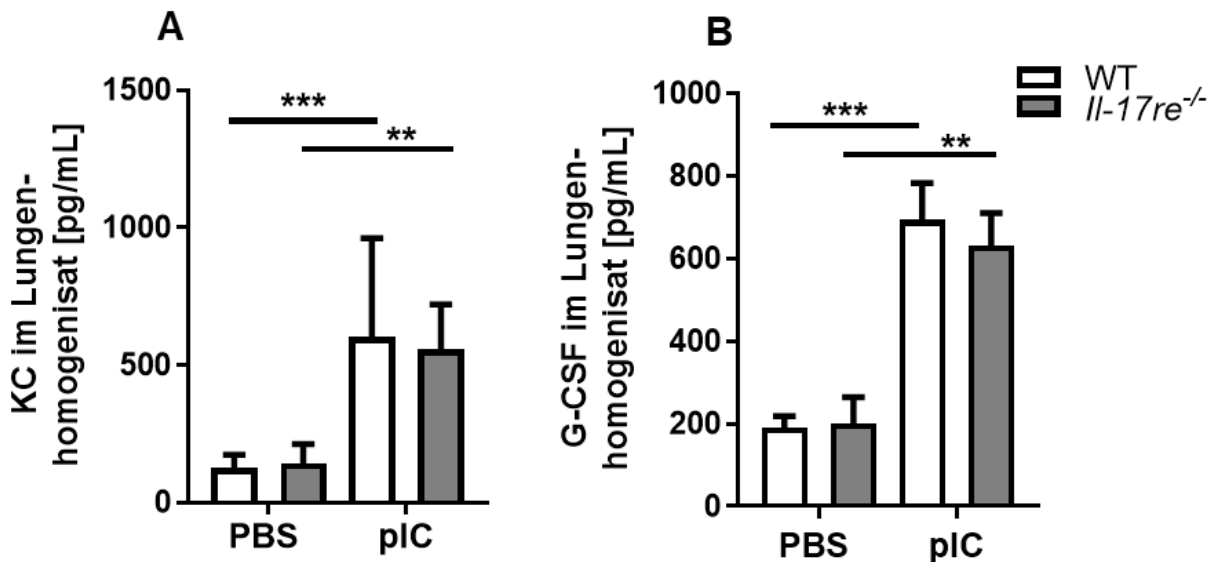


**Abbildung 21: Intranasale Gabe von pIC induziert den Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge unabhängig von IL-17RE.** WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen wurde intranasal 100  $\mu$ g pIC oder PBS als Kontrolle verabreicht. 24 h nach der pIC oder PBS Gabe wurden die Mäuse euthanasiert, die Mauslungen lavagiert und die Anzahl der gewonnenen Leukozyten mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Anfertigung der Cytospin-Präparate und Färbung wurden die verschiedenen Subtypen der Immunzellen lichtmikroskopisch differenziert. (A) Die Gesamtzellzahl der Leukozyten, die Anzahl der (B) Makrophagen (C) neutrophile Granulozyten und (D) Lymphozyten in den BAL-Flüssigkeiten (BALF) sind dargestellt. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (WT PBS: n=11, IL-17RE PBS: n=9-10; WT pIC: n=10, IL-17RE pIC: n=7); Mean $\pm$ SEM; \* p<0,05 und \*\* p<0,01.

Die pIC Gabe führte zu erhöhten Konzentrationen von Chemokinen in der Mauslunge. So waren die Konzentrationen von KC und GCSF nach Verabreichung von pIC im Vergleich zu den PBS behandelten Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abb. 22A und



B). Diese Daten zeigen, dass eine einmalige Verabreichung von pIC zu einer moderaten Entzündung in den Lungen von WT und IL-17RE-defizienten Tieren führt, wobei die Rekrutierung der Immunzellen und die Expression und Sekretion proinflammatorischer Chemokine unabhängig von dem Rezeptor IL-17RE war.



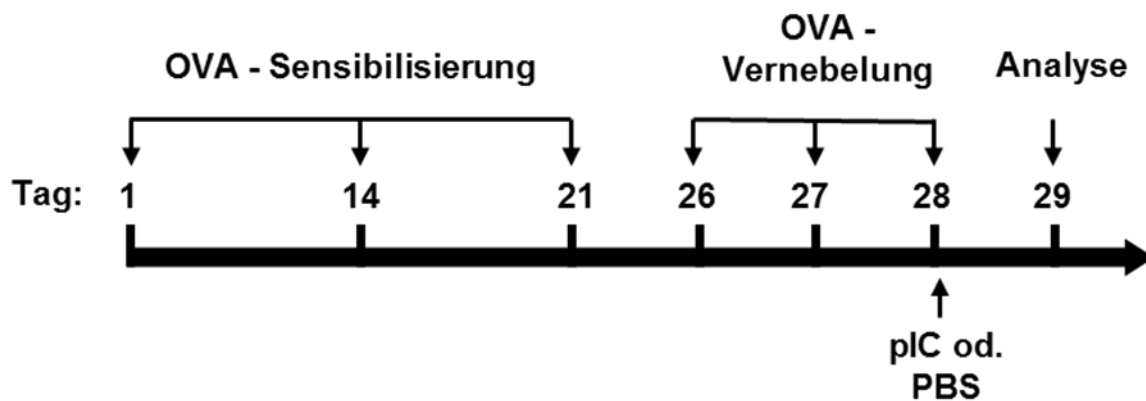
**Abbildung 22: Intranasale Gabe von pIC führt zu erhöhten Konzentrationen von Chemokinen in der Lunge unabhängig von IL-17RE.** WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen wurde intranasal 100 µg pIC oder PBS als Kontrolle verabreicht. 24 h nach der Gabe von pIC wurden die Lungen entnommen und im Lungenhomogenisat mittels ELISA die Konzentrationen von (A) KC und (B) G-CSF gemessen. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (WT PBS: n=9-10, IL-17RE PBS: n=9; WT pIC: n=10, IL-17RE pIC: n=7); Mean±SEM; \*\* p<0,01 und \*\*\* p<0,001.

#### 4.4 Funktion von IL-17RE bei der allergischen Entzündung der Lunge

Studien zeigen, dass sowohl IL-17A als auch die IL-17A Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC die Entzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas vermitteln [118, 121, 165]. So zeigte sich, dass die pIC-induzierte Exazerbation im experimentellen Asthma-Modell IL-17A abhängig ist [118]. Da die Funktion von IL-17RE bei der Entwicklung einer allergischen Entzündung der Atemwege unbekannt ist, wurden WT und IL-17RE-defiziente Mäuse in einem etablierten allergischen Asthma-Modell [118, 156, 166, 167] analysiert. WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen wurden durch dreimalige intraperitoneale Injektion einer 100 µg/mL OVA-Lösung an den Tagen 1, 14 und 21



immunisiert. Um eine akute allergische Atemwegsentzündung auszulösen, wurden die Mäuse an den Tagen 26, 27 und 28 einem Aerosol aus 1% OVA in PBS in einer luftdichten Kammer ausgesetzt. Darüber hinaus wurde eine akute Exazerbation der bestehenden allergischen Entzündung der Atemwege durch die einmalige intranasale Applikation von 100 µg pIC 2 Stunden nach der letzten OVA Exposition hervorgerufen (Abb. 23). Der Kontrollgruppe wurde PBS appliziert (Abb. 23).

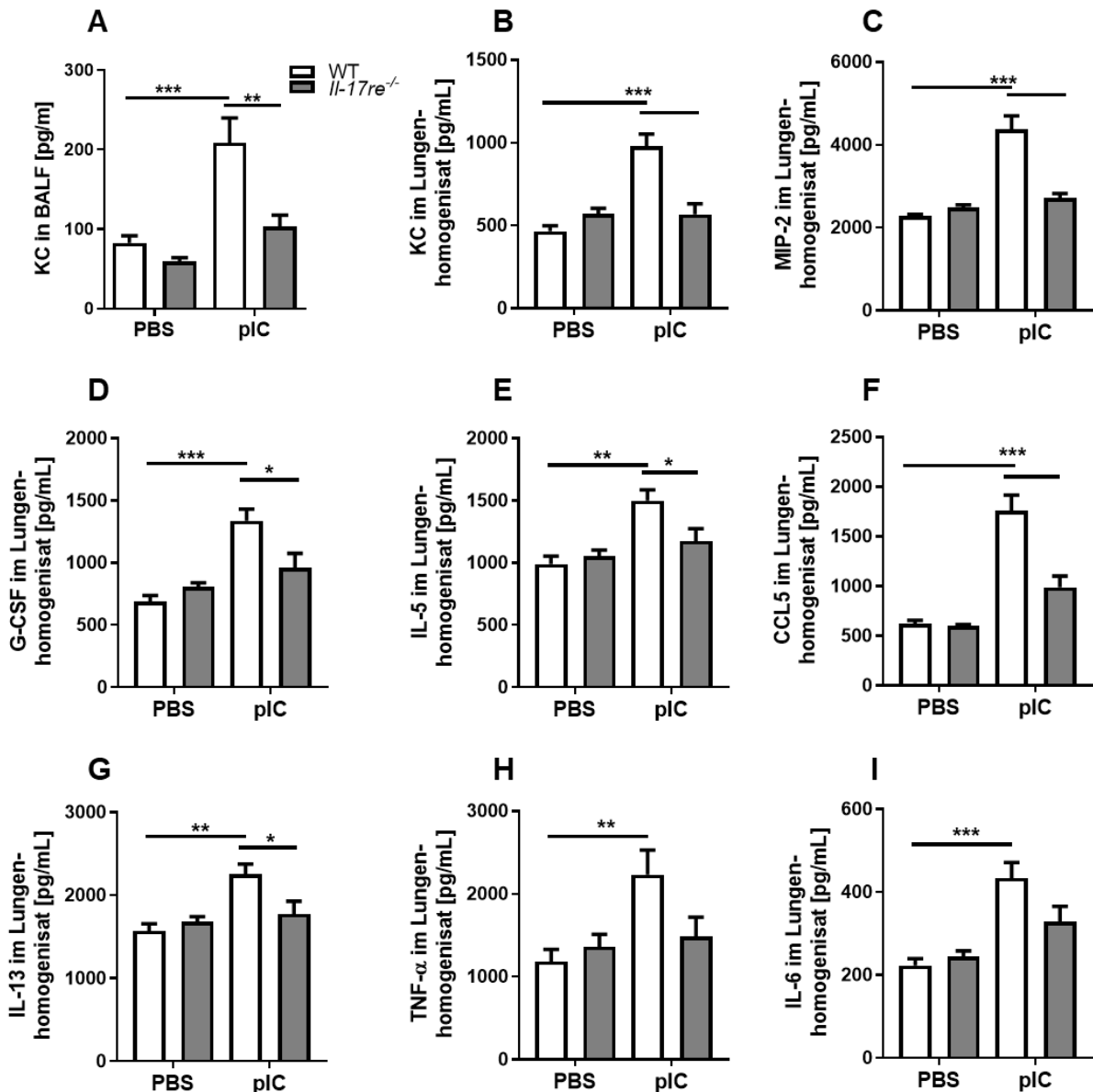


**Abbildung 23: Versuchsablauf der pIC-induzierten Exazerbation im experimentellen Asthma.** WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen wurde durch dreimalige intraperitoneale Injektion einer 100 µg/mL OVA-Lösung (adsorbiert an 10 mg/mL Aluminiumhydroxid) an den Tagen 1, 14 und 21 immunisiert. Die allergische Reaktion wurde durch repetitive Antigenexposition induziert und erfolgte an den Tagen 26, 27 und 28. Hierzu wurden die Mäuse einem Aerosol aus 1% OVA in PBS in einer luftdichten Kammer ausgesetzt. Um eine Exazerbation des allergischen Asthmas auszulösen, wurden die Mäuse anästhesiert und pIC (100 µg) 2 Stunden nach der letzten OVA-Aerosol Exposition am Tag 29 intranasal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt intranasal PBS. Die Analyse erfolgte 22 h nach der intranasalen Gabe.

#### 4.4.1 IL-17RE reguliert die Expression von Zytokinen und Chemokinen bei der pIC-induzierten Exazerbation des experimentellen Asthmas

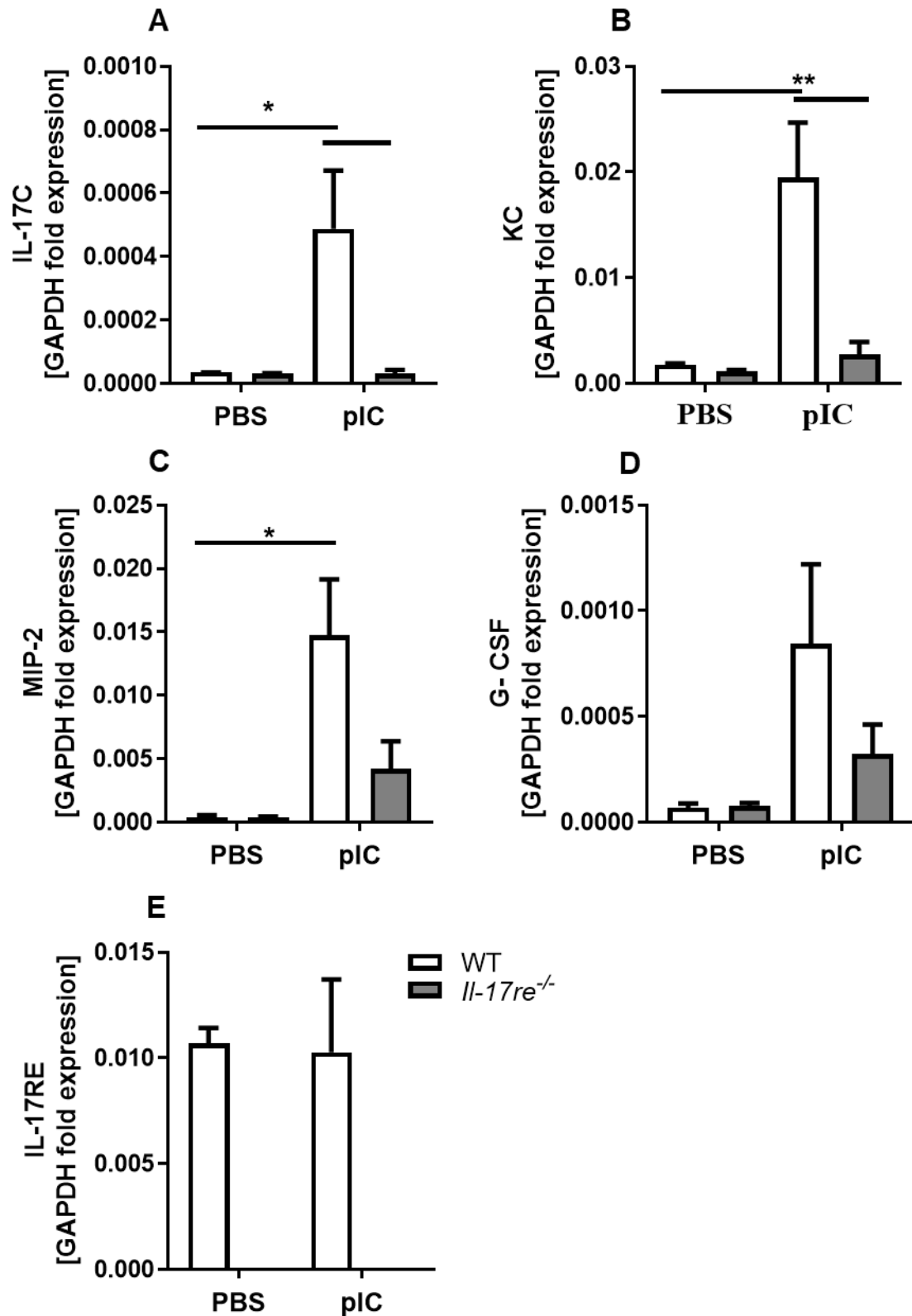
Es wurden die pulmonalen Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine mittels ELISA gemessen. 22 Stunden nach der intranasalen Gabe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Kontrolltieren, denen intranasal PBS verabreicht wurde, in allen gemessenen Zytokinen (Abb. 24A - I). Die Applikation von pIC bei einer bereits vorhandenen allergischen Entzündung führte bei WT Mäusen, nicht aber bei *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen, zu signifikant erhöhten pulmonalen Konzentrationen aller gemessenen Zytokine und Chemokine. Zudem waren die pulmonalen Konzentrationen von KC, MIP-2, G-CSF, CCL5, IL-5 und IL-13 bei pIC-

behandelten WT Mäusen verglichen mit pIC-behandelten *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen signifikant erhöht (Abb. 24A -I), während sich für TNF- $\alpha$  und IL-6 keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ergaben (Abb. 24A -I).



**Abbildung 24: IL-17RE reguliert die Bildung von Zytokinen und Chemokinen bei der pIC-induzierten Exazerbation im experimentellen Asthma.** WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen mit bestehendem allergischem Asthma wurde intranasal PBS (Kontrolle) oder 100  $\mu$ g pIC appliziert. 22 h nach der intranasalen Gabe wurden die Konzentrationen von (A) KC in der BALF und (B) im Lungenhomogenisat, sowie die Konzentrationen im Lungenhomogenisat von (C) MIP-2, (D) G-CSF, (E) IL-5, (F) CCL5, (G) IL-13 (G), (H) TNF- $\alpha$  und (I) IL-6 mittels ELISA gemessen. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (WT PBS: n=10, *Il-17RE* PBS: n=8; WT pIC: n=10, *Il-17RE* pIC: n=8-9); Mean $\pm$ SEM; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001.

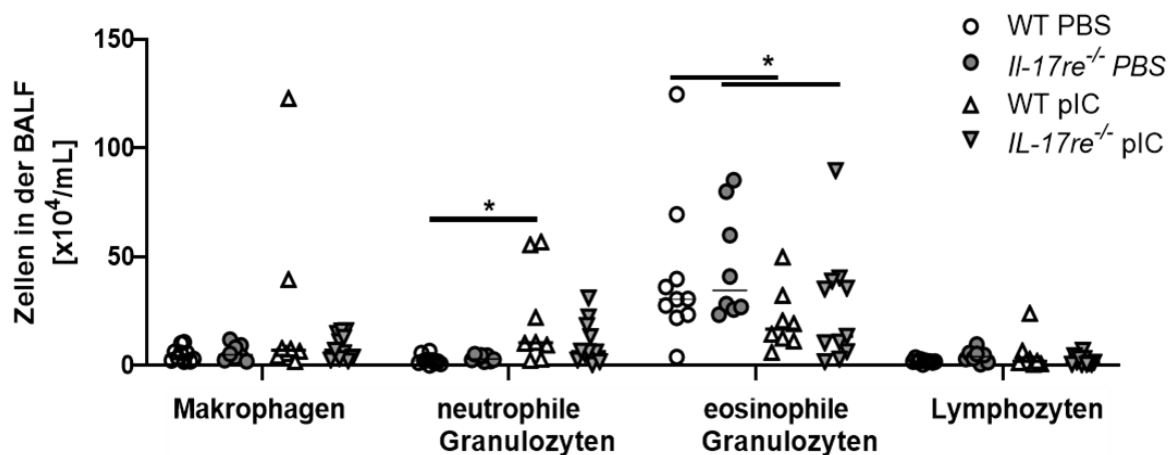
Es wurde die mRNA Expression verschiedener Zytokine über semiquantitative RT-PCR ermittelt. Die Tiere wurden 4 h nach pIC oder PBS Gabe analysiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen OVA-vernebelten WT und *Il-17re*<sup>-/-</sup> Kontrolltieren, denen intranasal PBS verabreicht wurde, in allen gemessenen Zytokinen (Abb. 25A - E). Die Applikation von pIC führte bei WT, nicht aber bei *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer signifikant erhöhten Expression von IL-17C, KC, MIP-2 und G-CSF (Abb. 25A - E). Die Expression von IL-17C und KC war bei pIC-behandelten WT Mäusen verglichen mit pIC-behandelten *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht (Abb. 25A - E). Die IL-17RE mRNA war, wie erwartet, bei *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht nachweisbar, was den Knockout des Gens bei diesen Mäusen bestätigte (Abb. 25E).



**Abbildung 25: IL-17RE reguliert die pIC-induzierte transkriptionelle Expression von Zytokinen im experimentellen Asthma.** WT und *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen mit bestehendem allergischem Asthma wurde intranasal PBS (Kontrolle) oder 100 µg pIC appliziert. 4 h nach der intranasalen Gabe wurde die mRNA-Expression von (A) IL-17C, (B) KC, (C) MIP-2, (D) G-CSF und (E) IL-17RE gemessen. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (n=3); Mean±SEM; \* p<0,05 und \*\* p<0,01.

#### 4.4.2 IL-17RE vermittelt die pIC-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im experimentellen Asthma

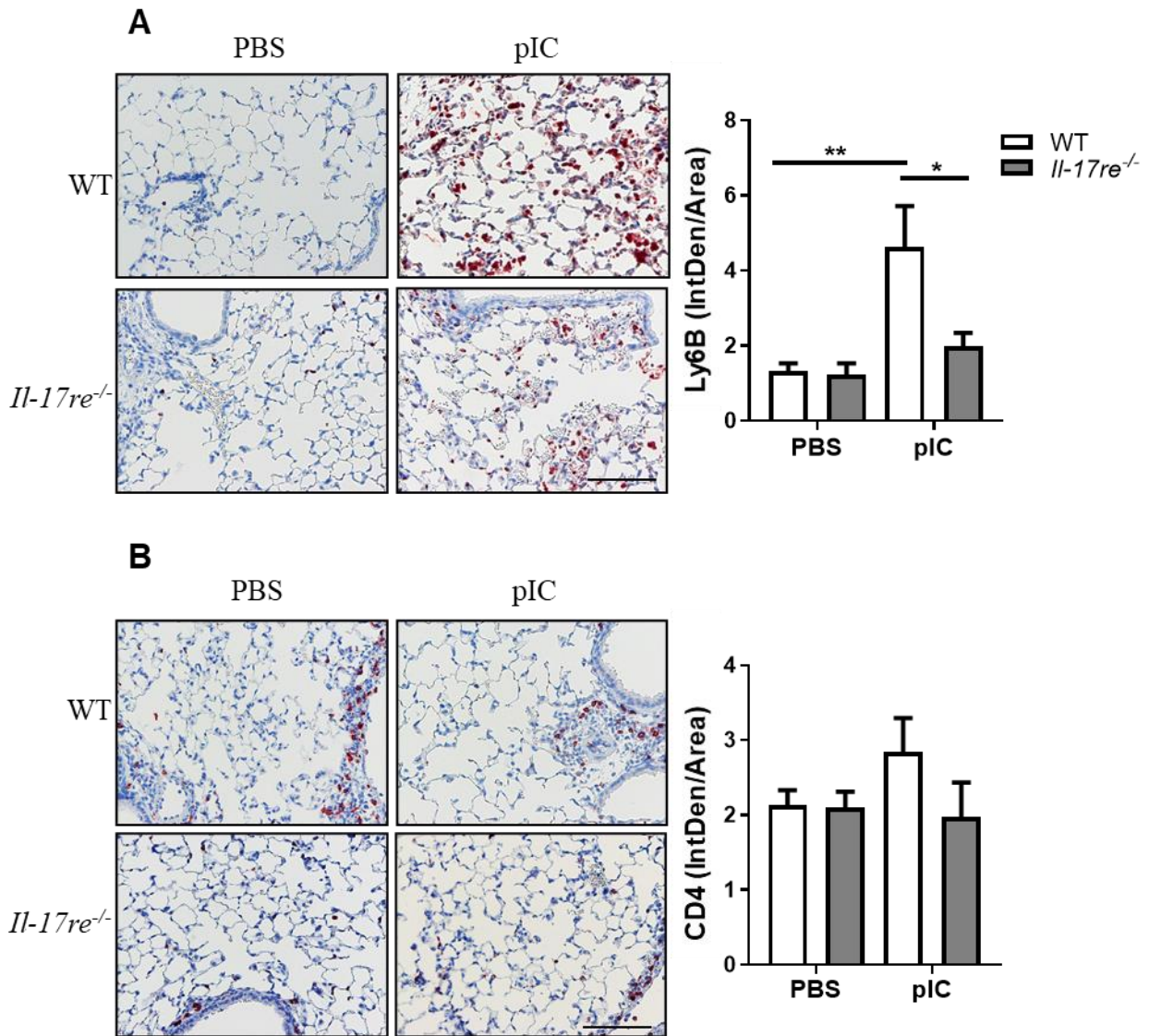
Das Differentialzellbild der BAL-Flüssigkeiten ergab keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten zwischen OVA-vernebelten WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Kontrolltieren, denen intranasal PBS verabreicht wurde (Abb. 26). 22 Stunden nach der pIC-Applikation zeigte sich zudem kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Makrophagen in den BAL-Flüssigkeiten zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 26). Hingegen war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei WT, nicht aber bei *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen, verglichen mit PBS-behandelten Kontrollmäusen nach pIC-Applikation signifikant erhöht (Abb. 26). Das Differentialzellbild ergab zudem, dass das experimentelle Asthma, wie erwartet, mit einer eosinophilen Granulozyten-dominierten Entzündung einherging, wobei sich die Anzahl der rekrutierten eosinophilen Granulozyten in den Mauslungen zwischen asthmatischen WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen nicht unterscheidet (Abb. 26). Nach pIC Gabe war die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in beiden Mausstämmen verringert. Dagegen gab es in der Anzahl der Lymphozyten in den BAL-Flüssigkeiten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 26).



**Abbildung 26: Die Defizienz für IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der Entzündungszellen in der BAL-Flüssigkeit im experimentellen Asthma.** OVA-sensibilisierte und OVA vernebelte WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden intranasal mit 100 µg pIC oder PBS als Kontrolle behandelt. 22 Stunden nach intranasaler pIC oder PBS Gabe wurden die Mäuse euthanasiert, die Mauslungen lavagiert und Cytospin-Präparate angefertigt. Nach Anfertigung der Cytospin-Präparate und Färbung wurden die verschiedenen Subtypen der

Immunzellen lichtmikroskopisch differenziert. Die Anzahl der Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten wurden in den BAL-Flüssigkeiten bestimmt. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (WT PBS: n=10, IL-17RE PBS: n=8; WT pIC: n=8, IL-17RE pIC: n=11); Mean±SEM; \* p<0,05.

Folgend wurden immunhistochemische Färbungen für Ly6B und CD4 durchgeführt. Hierfür wurden Lungen, die nicht lavagiert wurden, in Paraffin eingebettet. Ly6B wird von neutrophilen Granulozyten und aktivierten Monozyten gebildet [168]. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Ly6B<sup>+</sup> Zellen zwischen OVA-vernebelten und mit PBS-inokulierten WT und *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen. Nach pIC Gabe war die Anzahl an granulären Ly6B<sup>+</sup> Zellen im Lungenparenchym beider Mausstämme erhöht. Dabei führte die pIC Gabe bei den WT Mäusen, verglichen mit PBS-behandelten Kontrollmäusen und pIC-behandelten *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mäusen, zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Ly6B<sup>+</sup> Zellen (Abb. 27A). Die immunhistochemische Färbung für CD4 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 27B).

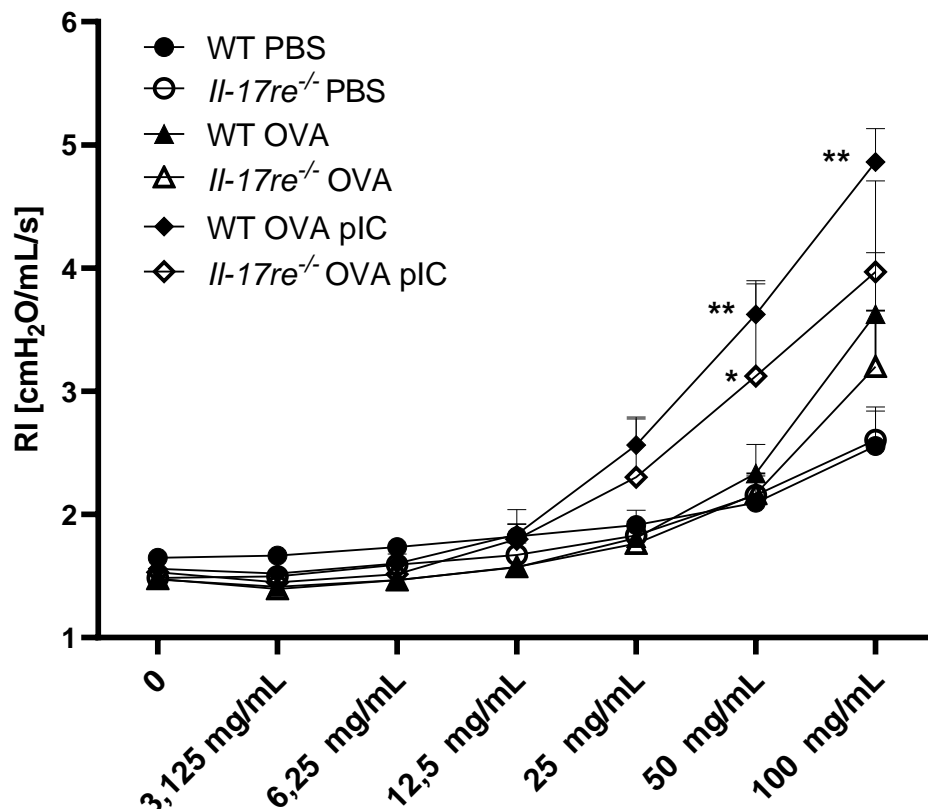


**Abbildung 27: Die Defizienz für IL-17RE führt zu einer verringerten Anzahl an Ly6B<sup>+</sup> Zellen nach pIC Applikation.** OVA-sensibilisierte und OVA vernebelte WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden intranasal mit 100 µg pIC oder PBS als Kontrolle behandelt und nach 22 Stunden analysiert. Anschließend wurden die Mauslungen in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Lungenschnitte wurden immunhistochemisch für (A) Ly6B und (B) CD4 gefärbt und die positiv gefärbten Zellen im Lungenparenchym der Mäuse quantifiziert. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (PBS: n=4-5; pIC n=5); Mean±SEM; \* p<0,05 und \*\* p<0,01.

#### 4.4.3 Die Defizienz von IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die Atemwegs-Hyperreaktivität

Es wurde eine invasive Lungenfunktionsmessung mit steigenden MCh Konzentrationen durchgeführt. Zusätzlich zu den asthmatischen Mäusen wurden

Kontrollmäuse schein-immunisiert. Dies erfolgte, in dem die Mäuse an den Tagen 1, 14 und 21 intraperitoneal PBS injiziert wurde. Anschließend wurden die Mäuse an den Tagen 26, 27 und 28 einem OVA-Aerosol exponiert. Die Lungenfunktion ergab, dass die schein-immunisierten Kontrollmäuse die niedrigste Atemwegs-Hyperreaktivität gegenüber MCh aufwiesen (Abb. 28). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Atemwegs-Hyperreaktivität zwischen immunisierten WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>*, sowie zwischen immunisierten und mit pIC-behandelten WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen. Der Widerstand der Atemwege fiel jedoch bei WT Mäusen mit steigenden MCh Konzentrationen etwas erhöht aus (Abb. 28). Die exazerbierten WT Mäuse zeigten bei einer MCh Konzentration von 50 mg/mL und 100 ng/mL eine signifikant erhöhte Atemwegs-Hyperreaktivität gegenüber den nicht exazerbierten WT Tieren. Die *Il-17re<sup>-/-</sup>* Exazerbationsgruppe zeigte nur bei einer MCh Konzentration von 50 mg/mL eine signifikant erhöhte Atemwegs-Hyperreaktivität gegenüber der nicht exazerbierten *Il-17re<sup>-/-</sup>* Versuchsgruppe.



**Abbildung 28: Die Defizienz für IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die invasive Lungenfunktionsmessung.** Es wurde die Atemwegs-Hyperreaktivität von schein-immunisierten (PBS), immunisierten (OVA) und immunisierten pIC-behandelten (OVA pIC) WT und IL-17RE-defizienten Mäusen mittels invasiver Lungenfunktion gemessen. Die Mäuse wurden zunehmender MCh Konzentration



ausgesetzt. Statistik: Two-way ANOVA mit post-hoc Tukey's Test (WT PBS: n=5, IL-17RE PBS: n=6; WT OVA: n=5, IL-17RE OVA: n=7; WT OVA pIC: n=6, IL-17RE OVA pIC: n=5); Mean±SEM; \* p<0,05 und \*\* p<0,01 zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu entsprechenden OVA-sensibilisierten und OVA vernebelten Mäusen an.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle des epithelialen Zytokins IL-17C und dessen spezifischen Rezeptors IL-17RE bei den chronischen Lungenerkrankungen COPD und Asthma untersucht. IL-17C wurde im Spontansputum von COPD-Patienten, das während einer AECOPD gesammelt wurde, nachgewiesen, wobei die IL-17C Konzentrationen mit der Schwere der Erkrankung assoziierten. Im Mausmodell der akuten und chronischen Entzündung der Lunge zeigte sich, dass IL-17C eine NTHi-induzierte neutrophile Entzündung der Lunge und den hiermit einhergehenden Verlust an Lungenstruktur vermittelt. Bei der rauchinduzierten Entzündung der Lunge konnte für IL-17C jedoch keine Funktion nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass IL-17RE für die Entwicklung einer OVA-induzierten allergischen Entzündung der Lunge und AHR nicht erforderlich ist. Zudem konnte keine Funktion von IL-17RE bei einer akuten pIC-induzierten Entzündung der Lunge in Abwesenheit einer allergischen Entzündung nachgewiesen werden. Im pIC-induzierten Exazerbationsmodell vermittelte IL-17RE bei vorhandener allergischer Entzündung eine durch pIC- ausgelöste akute Entzündung der Lunge.

### 5.1 IL-17C assoziiert mit der Schwere der Erkrankung bei AECOPD

Neutrophile Granulozyten sind die am häufigsten vorkommenden Entzündungszellen in der Bronchienwand und im Lumen der Lunge von COPD-Patienten [8, 169-172]. Sie gehören zu den ersten Immunzellen, die an den Infektionsherden rekrutiert werden, wo sie eindringende Mikroorganismen durch Phagozytose aufnehmen und eliminieren. Bei akuten und chronischen Lungenerkrankungen kommt es jedoch häufig zu einer deregulierten und übermäßigen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, was zum Lungenschaden und Verlust der Lungenfunktion führen kann. Die Neutrophilie ist zentral in der Pathogenese der COPD [8]. Neutrophile Granulozyten treiben das Fortschreiten der COPD durch vielfältige Mechanismen, wie die Freisetzung von Proteasen, Exosomen und reaktiven Sauerstoffspezies an [8, 173]. Es ist daher von besonderem Interesse Entzündungsmediatoren zu identifizieren, die die neutrophile Entzündung bei stabiler Erkrankung und während einer AECOPD

fördern und sich somit als therapeutische Ziele eignen. Da die Lungen stabiler COPD-Patienten häufig mit Bakterien infiziert sind und Infektionen, die durch Bakterien und Viren ausgelöst werden, mit AECOPD assoziieren, ist anzunehmen, dass Immunantworten und Mechanismen, die für die Eliminierung von Mikroben erforderlich sind, in den Lungen von COPD-Patienten aktiviert sind [27]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das inflammatorische Zytokin IL-22, welches bei der Eliminierung bakterieller und viraler Pathogene eine Rolle spielt, in Lungen von Rauchern mit COPD im Vergleich zu Rauchern ohne COPD vermehrt gebildet wird [174]. Thulborn et al. zeigten, dass die Konzentration der neutrophilen Elastase im Sputum von COPD-Patienten bei akuten Exazerbationen erhöht ist [175]. Zudem assoziierten neutrophil extracellular traps (NETs) im Sputum mit der Schwere der Erkrankung und der Bakterien Spezies *Haemophilus* [176]. Auch war IL-8 im Sputum von COPD-Patienten erhöht und assoziierte negativ mit der Lungenfunktion [64]. Studien von Roos et al. zeigten, dass die Konzentrationen von IL-17A und IL-8 im Sputum während der NTHi-assoziierten AECOPD erhöht sind und dass IL-17A im Endstadium der COPD vorhanden ist [177, 178]. Sowohl IL-17A als auch IL-8 vermitteln die Eliminierung extrazellulärer Pathogene durch die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten [179]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von IL-17C, einem Zytokin, von dem bekannt ist, dass es die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermittelt [131, 150, 151, 155, 180] im Spontansputum von Patienten während einer AECOPD gemessen. Diese Arbeit zeigt erstmals, dass IL-17C im Sputum von COPD-Patienten vorhanden ist und liefert Hinweise darauf, dass die Konzentration von IL-17C im Sputum mit der Schwere der Erkrankung assoziiert (GOLD I/II vs. GOLDIII/V). Ferner zeigten die Ergebnisse, dass es eine negative Assoziation der IL-17C Konzentration mit der Lungenfunktion ( $FEV_1$  % vorhergesagt) gibt, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Auch wurden die Konzentrationen der Interleukine IL-17A und IL-17E, sowie die Konzentrationen der neutrophilen Chemokine IL-8 und CXCL5 gemessen. Die IL-17A und IL-8 Konzentrationen waren vergleichbar mit den gemessenen Konzentrationen von Roos et al. [177]. Es gab jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen gemessenen Zytokinen und Chemokinen mit der Schwere der Erkrankung. Es deutete sich eine positive Assoziation zwischen der IL-17C- und IL-8 Konzentration an, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass IL-17C bei Exazerbationen Chemokine an der Mukosa reguliert und sich als ein therapeutisches Ziel eignet. Die hier präsentierte Patientenstudie hat allerdings Einschränkungen. So wurde die Konzentration von IL-17C nicht in stabilen COPD-Patienten analysiert. Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Konzentration von IL-17C im Sputum von akut exazerbierenden Patienten verglichen mit stabilen Patienten erhöht sind. Darüber hinaus wurde in dieser Studie die Ursache der Exazerbation, sowie das Vorhandensein einer bakteriellen oder viralen Infektion nicht betrachtet. Demnach geben die Daten keinen Hinweis darauf, ob die IL-17C Konzentration im Sputum mit einer spezifischen viralen oder bakteriellen Infektion assoziiert ist. Weitere Analysen sind notwendig, um zu überprüfen, ob die IL-17C Konzentration mit bestimmten respiratorischen Pathogenen (wie zum Beispiel NTHi), mit der Expression von neutrophilen Chemokinen oder mit der Lungenfunktion korreliert. Die hier gezeigten Ergebnisse müssen dafür in einer zweiten und signifikant größeren Kohorte verifiziert werden.

## **5.2 IL-17C vermittelt NTHi-induzierten Lungenschaden**

Vorherige Studien mit IL-17C- und IL-17RE-defizienten Mäusen zeigen, dass IL-17C die Expression von Chemokinen vermittelt und an der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten beteiligt ist [130, 131, 143, 152, 155, 181]. In diesem Zusammenhang zeigten jüngere Studien, dass eine akute NTHi-induzierte Entzündung die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym und in die Tumormikroumgebung in eine IL-17C-abhängige Weise fördert [150, 151]. Jungnickel et al. zeigten im metastatischen Tumormodell, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge der *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nach dreimaliger Exposition mit NTHi signifikant vermindert war [150]. Ritzmann et al. demonstrierten eine verminderte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung nach einmaliger NTHi Exposition [151]. In Übereinstimmung mit den vorherigen Studien zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass IL-17C zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Lungenparenchym nach akuter NTHi Exposition beiträgt. Die Anzahl der pulmonalen neutrophilen Granulozyten war in *Il-17c*<sup>-/-</sup> Mäusen nach der akuten Exposition gegenüber der Kombination von CS und NTHi signifikant reduziert,

während sich die Defizienz für IL-17C nicht auf die rauchinduzierte pulmonale Entzündung auswirkte. Somit trägt IL-17C möglicherweise zur pulmonalen Entzündung während der AECOPD bei, die durch Bakterien wie NTHi ausgelöst wird. In den Lungen von NTHi-exponierten *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen war die Konzentration von G-CSF im Vergleich zu gleichbehandelten WT Mäusen signifikant vermindert. G-CSF ist ein Zytokin, das entscheidend zur Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, sowie zur Rekrutierung und Langlebigkeit von neutrophilen Granulozyten in entzündeten Geweben beiträgt [182]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse legen daher nahe, dass IL-17C unter anderem über G-CSF die neutrophile Entzündung der Lunge im akuten NTHi-Modell vermittelt.

In der präklinischen COPD-Forschung werden unterschiedliche murine Modelle genutzt. In zahlreichen Studien werden Mäuse über einen längeren Zeitraum, d.h. häufig bis zu acht Monaten, Zigarettenrauch exponiert, was zu einem Verlust der Lungenstruktur und Lungenfunktion führt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Funktion von IL-17C bei der rauchinduzierten Entzündung der Lunge nachgewiesen werden. In anderen gängigen experimentellen COPD-Modellen wird Mäusen intranasal neutrophile Elastase, LPS oder die Kombination von neutrophiler Elastase und LPS verabreicht. Dies führt innerhalb von vier Wochen meist zu einem Lungenemphysem [183-185]. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die 4-wöchige Exposition von Mäusen mit NTHi zu einer neutrophilen Entzündung der Lunge und zu einem Lungenemphysem führt. Diesbezüglich ist das hier gezeigte NTHi-Modell vergleichbar mit gängigen Elastase- und LPS-Modellen.

Ritzmann et al. zeigten im chronischen, Kras-abhängigen Lungenkrebsmodell, dass die pulmonale Entzündung nach 4-wöchiger NTHi Exposition in *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen vermindert ausfällt [151]. In diesem Modell kommt es jedoch zu einem massiven Krebswachstum in der Lunge, so dass eine aussagekräftige stereologische Analyse hinsichtlich des Verlusts an Lungenparenchym kaum möglich ist. Zudem wird in diesem Modell die pulmonale Entzündung auch durch die Lungentumore hervorgerufen, sodass die verminderte pulmonale Entzündung in *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen teilweise auch auf ein vermindertes Tumorwachstum zurückzuführen sein könnte. Um die Funktion von IL-17C bei der Gewebeerstörung im Zusammenhang mit chronischer neutrophiler Entzündung zu untersuchen, wurden für die vorliegende Arbeit WT und *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäuse bis zu 12 Wochen NTHi exponiert und der Entzündungsscore und der MCL bestimmt. Die Exposition mit NTHi führte zu einer

neutrophilen Entzündung und Gewebeerstörung, die bei *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen signifikant vermindert war. Wie auch im akuten NTHi-Modell waren die Konzentrationen von G-CSF in *Il-17c<sup>-/-</sup>* Mäusen signifikant vermindert. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass IL-17C das Fortschreiten der COPD durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge fördert. Da sich die Defizienz für IL-17C nach 4-wöchiger Rauchexposition nicht auf die pulmonale Entzündung auswirkte, legen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nahe, dass IL-17C bei stabilen COPD-Patienten die bakteriell-induzierte Entzündung vermittelt. Dies ist von Interesse, da auch nach Rauchentwöhnung die Symptome der COPD nicht abklingen und die Lungen der COPD-Patienten häufig mit Pathogenen wie NTHi infiziert und kolonisiert sind. Eine aktuelle Studie wies mittels Einzelzell-Sequenzierung (Single cell sequencing) und Klonierung einen Cluster von pathogenen Stammzellen nach, der pulmonale Entzündung vermittelt und in dem IL-17C zu den am stärksten exprimierten pro-inflammatorischen Genen gehört [186]. Eine dauerhafte bakterielle Last bei COPD-Patienten könnte für diese Zellen ursächlich sein.

Mit der Funktion von IL-17C beschäftigten sich, wie in der Einleitung dargelegt, auch andere Arbeiten. Jamieson et al. zeigten in einer kürzlich durchgeführten Studie, dass die Freisetzung von IL-17C aus kultivierten Atemwegsepithelzellen synergistisch durch Krankheitserreger induziert wird, von denen bekannt ist, dass sie an der AECOPD beteiligt sind beziehungsweise diese auslösen (zum Beispiel Rhinovirus und gramnegative Bakterien) und dass die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen von COPD-Patienten erhöht ist [155]. Darüber hinaus wurde IL-17C in humanen paraffin-eingebetteten Bronchialgeweben von COPD-Patienten mittels immunhistochemischer Färbungen nachgewiesen [142]. Zellkulturstudien zeigten, dass die durch siRNA-verminderte Expression von IL-17C oder seinem Rezeptor IL-17RE in Epithelzellen der Atemwege die Expression von Entzündungsmediatoren einschließlich neutrophiler Chemokine und antimikrobielle Peptide als Reaktion auf eine Infektion reduziert [142, 154, 155]. Darüber hinaus verringerte der Knockdown von IL-17C die neutrophile Chemotaxis *in vitro* [155]. All diese Studien weisen auf eine Funktion von IL-17C bei der akuten und chronischen neutrophilen Entzündung der Lunge hin, die durch COPD-Erreger ausgelöst wird.

Zusammenfassend bieten die Ergebnisse einen weiteren Einblick in den Beitrag von IL-17C bei der Entstehung der COPD. IL-17C ist während der AECOPD im Sputum vorhanden und möglicherweise mit der Schwere der Erkrankung assoziiert. IL-17C

fördert die Neutrophilie in Mausmodellen der akuten und chronischen COPD-ähnlichen Entzündung. Die vorgestellten Ergebnisse deuten daher auf IL-17C als therapeutisches Ziel bei der COPD hin, insbesondere während der AECOPD. Therapeutische Anti-IL-17C-Antikörper, die derzeit für die Behandlung der atopischen Dermatitis entwickelt werden [187], könnten in klinischen Studien eingesetzt werden. Es ist jedoch auch zu beachten, dass IL-17C eine Funktion bei der Prävention und Beseitigung von Infektionen hat [130, 131, 145]. So ist IL-17C an der Expression antimikrobieller Peptide beteiligt. Die IL-17C-vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Eliminierung von Bakterien an der Mukosa [131, 154, 155]. Darüber hinaus ist IL-17C an der Rekrutierung und Regulation von Lymphozyten beteiligt. IL-17C reguliert zum Beispiel nachweislich Th17-Zellen [140, 188, 189]. IL-17A exprimierende Immunzellen wie Th17-Zellen sind an der Eliminierung extrazellulärer Lungenerreger wie *S. pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae* beteiligt [190]. Daher hat IL-17C eine potenziell schützende Wirkung auf Epitheloberflächen und seine Neutralisierung kann zu einem erhöhten Risiko für Lungeninfektionen führen.

### **5.3 Funktion von IL-17RE bei der Entwicklung einer OVA-induzierten allergischen Entzündung**

Präklinische Studien zeigten, dass sowohl IL-17A als auch IL-17RA die Entwicklung einer allergischen Entzündung der Atemwege und der AHR durch die Rekrutierung von Entzündungszellen vermitteln, sowie die Kontraktion der glatten Muskulatur induzieren [120-123]. Auch wurde gezeigt, dass sowohl IL-17A als auch IL-17C über IL-17RA die Induktion von Entzündungsmediatoren in den Zielzellen vermitteln und IL-17C die Th17-Zellreaktionen fördert [140, 188, 191], wurde in dieser Arbeit geprüft, ob der spezifische IL-17C-Rezeptor IL-17RE eine Funktion im OVA-induziertem experimentellen Asthma-Modell hat. Hierfür wurden WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>*-Mäuse durch die Injektion einer OVA-Lösung immunisiert und für die Auslösung einer akuten allergischen Atemwegsentzündung einem OVA enthaltendem Aerosol exponiert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben keinen Hinweis darauf, dass IL-17RE eine Funktion bei der Ausbildung einer allergischen Entzündung im OVA-Modell hat. Es

waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Entzündungszellen, wie zum Beispiel der eosinophilen Granulozyten in den Lungen von WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen feststellbar. Die Defizienz für IL-17RE hatte auch keinen signifikanten Einfluss auf die pulmonalen Konzentrationen von Entzündungsmediatoren wie IL-5 und IL-13. Zudem zeigten sich keine Unterschiede in der AHR zwischen WT und *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen in Anwesenheit oder Abwesenheit einer allergischen Entzündung. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher nicht darauf hin, dass IL-17RE bei der Entwicklung der OVA-induzierten allergischen Entzündung der Lunge und AHR eine Rolle spielt. Dies lässt sich durch die relativ geringe Expression des IL-17RE-Liganden IL-17C in Abwesenheit zusätzlicher Stimuli, wie zum Beispiel Liganden für Mustererkennungsrezeptoren, die eine hemmende Wirkung von Th2-Zytokinen auf die IL-17C-Expression und einen möglichen Mangel an IL-17RE-Expression in der glatten Muskulatur der Atemwege erklären [142, 155, 192]. Auch wenn das OVA-Modell nur in Teilen die Situation im Menschen abbildet, zeigen die Ergebnisse, dass sich eine allergische Entzündung der Lunge und AHR vollkommen unabhängig von IL-17RE ausbilden kann.

#### **5.4 Funktion von IL-17RE bei der pIC-induzierten Exazerbation im experimentellen Asthma-Modell**

Viren verursachen sehr häufig Exazerbationen des Asthma bronchiale. Über die intranasale Inokulation von pIC können gängige Virusinfektionen nachgeahmt werden. Verschiedene Zellkulturstudien zeigten, dass pIC die Expression von IL-17C in Atemwegsepithelzellen induziert [142, 154]. In dieser Arbeit wurde daher die Funktion von IL-17RE bei einer pIC-ausgelösten Exazerbation im experimentellen Asthma-Modell untersucht. In einem etablierten Exazerbationsmodell des Asthma bronchiale [118] wurde geprüft, inwiefern IL-17RE die pIC-ausgelöste Entzündung der Lunge bei bereits bestehender allergischer Entzündung vermittelt [117-119].

Die gewählte pIC-Konzentration führte nach intranasaler Applikation bei Abwesenheit einer allergischen Entzündung der Lunge zu einer moderaten pulmonalen Entzündungsreaktion, die bei *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen leicht, aber nicht signifikant reduziert war. Bei Vorhandensein einer allergischen Entzündung der Lunge führte die Gabe von



pIC zu einer verstärkten Entzündung in einer IL-17RE-abhängigen Weise. Die pulmonalen Konzentrationen entzündlicher Zytokine, die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den BAL-Flüssigkeiten und die Anzahl von Ly6B<sup>+</sup> Zellen im Lungenparenchym waren bei *Il-17re<sup>-/-</sup>* Mäusen verringert.

Es gibt Hinweise darauf, dass IL-17RE die T-Zellaktivierung vermittelt, einschließlich der Expression von Effektorzytokinen, wie zum Beispiel IL-17A [140, 188, 189]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17RE in Th17-Zellen stark exprimiert wird und dass die IL-17C/IL-17RE-Achse die Expression von IL-17A durch Effektor-T17-Zellen in einem Modell einer Autoimmunerkrankung verstärkt [140]. IL-17RE wird auch von leberresidenten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und natürlichen Killer-T-Zellen exprimiert und steigert zusammen mit IL-17C die T-Zellfunktion bei Autoimmunhepatitis [193]. Die Defizienz von IL-17RE bot auch Schutz in einem Modell der nephrotoxischen Nephritis, die mit einer verminderten Th17-Reaktion assoziiert war [188]. So könnte die erhöhte Expression von Entzündungsmediatoren durch CD4<sup>+</sup> und natürliche Killer-T-Zellen, die bereits in asthmatischen Mäusen vorhanden sind, ein Mechanismus sein, durch den IL-17RE die pulmonale Entzündung in pIC-behandelten Mäusen verstärkt.

Die Defizienz von IL-17RE führte zu einer teilweisen Reduktion der AHR in pIC-behandelten Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung von neutrophilen Granulozyten die AHR bei experimentellem Asthma teilweise vermindert [120]. Darüber hinaus zeigten Toussaint et al., dass die von neutrophilen Granulozyten freigesetzte DNA die Rhinovirus-induzierte Exazerbation von allergischem Asthma des Typ 2 fördert [194]. In dem hier verwendeten Versuchsaufbau könnten pulmonale neutrophile Granulozyten die MCh-induzierte AHR beeinflussen, während IL-17RE keine direkte Funktion bei der Induktion der Kontraktion der glatten Muskulatur zu haben scheint.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass IL-17RE die durch virale Infekte hervorgerufene Entzündung der Lunge bei vorhandenem Asthma bronchiale vermittelt. Weitere Studien müssen zeigen, ob sich IL-17C als therapeutisches Ziel bei Exazerbationen des Asthmas eignet.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Song X, Qian Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cellular signalling*. 2013;25(12):2335-47.
2. Vestbo J, Lange P. COPD drugs: the urgent need for innovation. *Lancet Respir Med*. 2014;2(1):14-5.
3. Ferrarotti I, Luisetti M. COPD: no gene left unturned. *Lancet Respir Med*. 2014;2(3):171-2.
4. Calverley PM. New treatments for COPD: many miles still to go. *Lancet Respir Med*. 2014;2(1):6-7.
5. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(6):532-55.
6. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 2007;370(9589):741-50.
7. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012;379(9823):1341-51.
8. Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(5):531-9.
9. Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294(4):L612-31.
10. Tudor RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2749-55.
11. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*. 2009;374(9691):733-43.

12. Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, et al. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(5):787-97.
13. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, Committee GS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(5):1256-76.
14. Franciosi AN, McCarthy C, McElvaney NG. The efficacy and safety of inhaled human alpha-1 antitrypsin in people with alpha-1 antitrypsin deficiency-related emphysema. *Expert Rev Respir Med*. 2015;9(2):143-51.
15. Galdston M, Melnick EL, Goldring RM, Levytska V, Curasi CA, Davis AL. Interactions of neutrophil elastase, serum trypsin inhibitory activity, and smoking history as risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in patients with MM, MZ, and ZZ phenotypes for alpha-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis*. 1977;116(5):837-46.
16. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One*. 2011;6(2):e16384.
17. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(10):1073-80.
18. Zakharkina T, Heinzl E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, et al. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PLoS One*. 2013;8(7):e68302.
19. Dickson RP, Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1004923.

20. Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest*. 2008;118(2):394-402.
21. Herr C, Beisswenger C, Hess C, Kandler K, Suttorp N, Welte T, et al. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax*. 2009;64(2):144-9.
22. Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J*. 2010;35(6):1209-15.
23. Gaschler GJ, Skrtic M, Zavitz CC, Lindahl M, Onnervik PO, Murphy TF, et al. Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(8):666-75.
24. Gaschler GJ, Zavitz CC, Bauer CM, Stampfli MR. Mechanisms of clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from cigarette smoke-exposed mouse lungs. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1131-42.
25. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(9):991-8.
26. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clinical microbiology reviews*. 2001;14(2):336-63.
27. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2355-65.
28. Hiraiwa K, van Eeden SF. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:619523.
29. Pappas K, Papaioannou AI, Kostikas K, Tzanakis N. The role of macrophages in obstructive airways disease: chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Cytokine*. 2013;64(3):613-25.
30. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(5):403-11.
31. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(2):81-93.

32. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
33. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
34. Maus UA, Janzen S, Wall G, Srivastava M, Blackwell TS, Christman JW, et al. Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(2):227-35.
35. Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*. 2006;24(4):366-8.
36. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *Journal of immunology*. 2003;170(8):4226-36.
37. Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M, Aubier M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(2):731-40.
38. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):515-48.
39. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000;405(6782):85-90.
40. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, et al. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):661-70.

41. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(3):469-73.
42. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152(5 Pt 1):1666-72.
43. Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD, et al. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(1):52-7.
44. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(4):1277-85.
45. Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, et al. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(6):789-99.
46. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(4):L867-73.
47. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(4 Pt 1):1355-60.
48. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive

pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(5):602-9.

49. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.

50. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.

51. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(6):427-39.

52. Werner JL, Steele C. Innate receptors and cellular defense against pulmonary infections. *Journal of immunology*. 2014;193(8):3842-50.

53. Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;149(3 Pt 1):803-10.

54. Kalfopoulos M, Wetmore K, ElMallah MK. Pathophysiology of Alpha-1 Antitrypsin Lung Disease. *Methods Mol Biol*. 2017;1639:9-19.

55. Chapman KR, Chorostowska-Wynimko J, Koczulla AR, Ferrarotti I, McElvaney NG. Alpha 1 antitrypsin to treat lung disease in alpha 1 antitrypsin deficiency: recent developments and clinical implications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;13:419-32.

56. Santangelo S, Scarlata S, Poeta ML, Bialas AJ, Paone G, Incalzi RA. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Perspective from Genetics to Diagnosis and Therapeutic Approaches. *Curr Med Chem*. 2017;24(1):65-90.

57. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1993;92(4):537-48.

58. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):530-4.
59. Sparrow D, Glynn RJ, Cohen M, Weiss ST. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest*. 1984;86(3):383-6.
60. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 1996;51(3):267-71.
61. Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, van Eeden SF. Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(4):1441-7.
62. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(2):449-53.
63. Peleman RA, Ryttila PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 1999;13(4):839-43.
64. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*. 1997;112(2):505-10.
65. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *The New England journal of medicine*. 1989;321(14):924-8.
66. Richards GA, Theron AJ, Van der Merwe CA, Anderson R. Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminescence



responses of activated blood phagocytes. *The American review of respiratory disease*. 1989;139(1):181-7.

67. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clinical science*. 1998;94(5):461-71.

68. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15025.

69. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *The New England journal of medicine*. 1998;339(17):1194-200.

70. Porsbjerg C, Lange P, Ulrik CS. Lung function impairment increases with age of diagnosis in adult onset asthma. *Respiratory medicine*. 2015;109(7):821-7.

71. Larsen GL, Colasurdo GN. Neural control mechanisms within airways: disruption by respiratory syncytial virus. *The Journal of pediatrics*. 1999;135(2 Pt 2):21-7.

72. Holt PG, Sly PD. Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma prevention and treatment. *Nature medicine*. 2012;18(5):726-35.

73. Soto-Martinez M, Sly PD. Relationship between environmental exposures in children and adult lung disease: the case for outdoor exposures. *Chronic respiratory disease*. 2010;7(3):173-86.

74. Sly PD, Flack F. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1140:163-83.

75. Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol Rev*. 2017;278(1):145-61.

76. Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol*. 2011;23(7):415-20.

77. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3546-56.

78. Kumar RK, Webb DC, Herbert C, Foster PS. Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006;5(4):253-6.
79. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):183-92.
80. Ho IC, Pai SY. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(1):15-29.
81. Caramori G, Lim S, Ito K, Tomita K, Oates T, Jazrawi E, et al. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur Respir J*. 2001;18(3):466-73.
82. Maneechotesuwan K, Xin Y, Ito K, Jazrawi E, Lee KY, Usmani OS, et al. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol*. 2007;178(4):2491-8.
83. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):282-7.
84. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(10):2779-86.
85. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*. 2004;202:175-90.
86. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med*. 2002;8(8):885-9.
87. Boutten A, Bonay M, Laribe S, Leseche G, Castier Y, Lecon-Malas V, et al. Decreased expression of interleukin 13 in human lung emphysema. *Thorax*. 2004;59(10):850-4.
88. Kroegel C, Julius P, Matthys H, Virchow JC, Jr., Luttmann W. Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts. *Eur Respir J*. 1996;9(5):899-904.

89. Stirling RG, van Rensen EL, Barnes PJ, Chung KF. Interleukin-5 induces CD34(+) eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(8 Pt 1):1403-9.
90. Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(2):199-204.
91. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol.* 2008;180(11):7423-30.
92. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet.* 2006;368(9537):804-13.
93. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(3):256-9.
94. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(5):709-50.
95. Newcomb DC, Peebles RS, Jr. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(6):755-60.
96. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol.* 2008;9(6):641-9.
97. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008;9(6):650-7.
98. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res.* 2006;7:135.

99. Dragon S, Rahman MS, Yang J, Unruh H, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(4):L1023-9.
100. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):247-54.
101. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(1):59-99.
102. Fuhlbrigge A, Peden D, Apter AJ, Boushey HA, Camargo CA, Jr., Gern J, et al. Asthma outcomes: exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3 Suppl):S34-48.
103. Moore WC, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Ameredes BT, Bacharier L, et al. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(2):405-13.
104. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(4):843-52.
105. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3 Pt 1):769-74.
106. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):394-402.
107. Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Bricchet A, et al. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(2):487-94.

108. Carlsen KH, Orstavik I, Leegaard J, Hoeg H. Respiratory virus infections and aeroallergens in acute bronchial asthma. *Arch Dis Child*. 1984;59(4):310-15.
109. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 1995;310(6989):1225-9.
110. Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, et al. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(3):785-90.
111. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*. 1993;307(6910):982-6.
112. Jartti T, Gern JE. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(4):895-906.
113. Ritchie AI, Farne HA, Singanayagam A, Jackson DJ, Mallia P, Johnston SL. Pathogenesis of Viral Infection in Exacerbations of Airway Disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2015;12 Suppl 2:S115-32.
114. Pavord ID, Birring SS, Berry M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ. Multiple inflammatory hits and the pathogenesis of severe airway disease. *The European respiratory journal*. 2006;27(5):884-8.
115. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
116. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*. 2004;5(7):730-7.
117. Torres D, Dieudonne A, Ryffel B, Vilain E, Si-Tahar M, Pichavant M, et al. Double-stranded RNA exacerbates pulmonary allergic reaction through TLR3: implication of airway epithelium and dendritic cells. *J Immunol*. 2010;185(1):451-9.

118. Lunding LP, Webering S, Vock C, Behrends J, Wagner C, Holscher C, et al. Poly(inosinic-cytidylic) acid-triggered exacerbation of experimental asthma depends on IL-17A produced by NK cells. *J Immunol*. 2015;194(12):5615-25.
119. Mahmutovic-Persson I, Akbarshahi H, Bartlett NW, Glanville N, Johnston SL, Brandelius A, et al. Inhaled dsRNA and rhinovirus evoke neutrophilic exacerbation and lung expression of thymic stromal lymphopoietin in allergic mice with established experimental asthma. *Allergy*. 2014;69(3):348-58.
120. Chesne J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant MA, Loy J, et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(6):1643- e3.
121. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by alphabeta T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med*. 2012;18(4):547-54.
122. Chenuet P, Fauconnier L, Madouri F, Marchiol T, Rouxel N, Ledru A, et al. Neutralization of either IL-17A or IL-17F is sufficient to inhibit house dust mite induced allergic asthma in mice. *Clinical science*. 2017;131(20):2533-48.
123. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(12):2715-25.
124. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(9):585-600.
125. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011;34(2):149-62.
126. Nies JF, Panzer J. IL-17C/IL-17RE: Emergence of a Unique Axis in TH17 Biology. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:341.
127. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):556-67.

128. Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubuser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28(5):226-9.
129. Li TS, Li XN, Chang ZJ, Fu XY, Liu L. Identification and functional characterization of a novel interleukin 17 receptor: a possible mitogenic activation through ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cellular signalling*. 2006;18(8):1287-98.
130. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, et al. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol*. 2011;12(12):1151-8.
131. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol*. 2011;12(12):1159-66.
132. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):479-89.
133. Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical science*. 2012;122(11):487-511.
134. Hartupée J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *Journal of immunology*. 2007;179(6):4135-41.
135. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(10):2271-9.
136. Li X, Bechara R, Zhao J, McGeachy MJ, Gaffen SL. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nat Immunol*. 2019;20(12):1594-602.
137. Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature immunology*. 2007;8(3):247-56.

138. Chang SH, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(47):35603-7.
139. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*. 2013;62(2):175-82.
140. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity*. 2011;35(4):611-21.
141. Holland DB, Bojar RA, Farrar MD, Holland KT. Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*. 2009;290(2):149-55.
142. Pfeifer P, Voss M, Wonenberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, et al. IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(4):415-21.
143. Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M, et al. IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;311(5):L1015-L22.
144. Johansen C, Riis JL, Gedebjerg A, Kragballe K, Iversen L. Tumor necrosis factor alpha-mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25487-94.
145. Reynolds JM, Martinez GJ, Nallaparaju KC, Chang SH, Wang YH, Dong C. Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *Journal of immunology*. 2012;189(9):4226-30.
146. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine*. 2008;14(3):282-9.



147. Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2009;160(2):319-24.
148. Johnston A, Fritz Y, Dawes SM, Diaconu D, Al-Attar PM, Guzman AM, et al. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *Journal of immunology*. 2013;190(5):2252-62.
149. Johansen C, Vinter H, Soegaard-Madsen L, Olsen LR, Steiniche T, Iversen L, et al. Preferential inhibition of the mRNA expression of p38 mitogen-activated protein kinase regulated cytokines in psoriatic skin by anti-TNFalpha therapy. *The British journal of dermatology*. 2010;163(6):1194-204.
150. Jungnickel C, Schmidt LH, Bittigkoffer L, Wolf L, Wolf A, Ritzmann F, et al. IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth. *Oncogene*. 2017;36(29):4182-90.
151. Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, Kamyschnikow A, Herr C, Li D, et al. IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):10353.
152. Steck P, Ritzmann F, Honecker A, Vella G, Herr C, Gaupp R, et al. Interleukin 17 Receptor E (IL-17RE) and IL-17C Mediate the Recruitment of Neutrophils during Acute Streptococcus pneumoniae Pneumonia. *Infect Immun*. 2019;87(11).
153. Jungnickel C, Schnabel PA, Bohle R, Wiewrodt R, Herr C, Bals R, et al. Nontypeable Haemophilus influenzae-Promoted Proliferation of Kras-Induced Early Adenomatous Lesions Is Completely Dependent on Toll-Like Receptor Signaling. *Am J Pathol*. 2017;187(5):973-9.
154. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, et al. Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):30-9.
155. Jamieson KC, Traves SL, Kooi C, Wiehler S, Dumonceaux CJ, Maciejewski BA, et al. Rhinovirus and Bacteria Synergistically Induce IL-17C Release from Human

Airway Epithelial Cells To Promote Neutrophil Recruitment. *J Immunol.* 2019;202(1):160-70.

156. Omlor AJ, Le DD, Schlicker J, Hannig M, Ewen R, Heck S, et al. Local Effects on Airway Inflammation and Systemic Uptake of 5 nm PEGylated and Citrated Gold Nanoparticles in Asthmatic Mice. *Small.* 2017;13(10).

157. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.

158. Yamaguchi S, Nambu A, Numata T, Yoshizaki T, Narushima S, Shimura E, et al. The roles of IL-17C in T cell-dependent and -independent inflammatory diseases. *Sci Rep.* 2018;8(1):15750.

159. Reppe K, Radunzel P, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S, et al. Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. *Infect Immun.* 2015;83(12):4617-29.

160. Fehrenbach H. Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective. *EUROPEAN RESPIRATORY REVIEW.* 2006;15(101):136–47

161. Moghaddam SJ, Ochoa CE, Sethi S, Dickey BF. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2011;6:113-23.

162. Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest.* 2000;118(6):1557-65.

163. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med.* 2000;109(4):288-95.

164. Clarke DL, Davis NH, Majithiya JB, Piper SC, Lewis A, Sleeman MA, et al. Development of a mouse model mimicking key aspects of a viral asthma exacerbation. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(8):567-80.

165. De Luca A, Pariano M, Cellini B, Costantini C, Vilella VR, Jose SS, et al. The IL-17F/IL-17RC Axis Promotes Respiratory Allergy in the Proximal Airways. *Cell Rep.* 2017;20(7):1667-80.
166. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science.* 2002;295(5553):336-8.
167. Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, et al. Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J Immunol.* 2006;177(3):1833-7.
168. Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol.* 2013;94(4):585-94.
169. Ludwig PW, Schwartz BA, Hoidal JR, Niewoehner DE. Cigarette smoking causes accumulation of polymorphonuclear leukocytes in alveolar septum. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131(6):828-30.
170. Pesci A, Majori M, Cuomo A, Borciani N, Bertacco S, Cacciani G, et al. Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 1998;92(6):863-70.
171. Pilette C, Colinet B, Kiss R, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, et al. Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *Eur Respir J.* 2007;29(5):914-22.
172. Martin TR, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effects of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132(2):254-60.
173. Genschmer KR, Russell DW, Lal C, Szul T, Bratcher PE, Noerager BD, et al. Activated PMN Exosomes: Pathogenic Entities Causing Matrix Destruction and Disease in the Lung. *Cell.* 2019;176(1-2):113-26 e15.
174. Starkey MR, Plank MW, Casolari P, Papi A, Pavlidis S, Guo Y, et al. IL-22 and its receptors are increased in human and experimental COPD and contribute to pathogenesis. *The European respiratory journal.* 2019;54(1).

175. Thulborn SJ, Mistry V, Brightling CE, Moffitt KL, Ribeiro D, Bafadhel M. Neutrophil elastase as a biomarker for bacterial infection in COPD. *Respir Res.* 2019;20(1):170.
176. Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, Cassidy AJ, Suarez-Cuartin G, Sibila O, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2018;141(1):117-27.
177. Roos AB, Sethi S, Nikota J, Wrona CT, Dorrington MG, Sanden C, et al. IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(4):428-37.
178. Roos AB, Sanden C, Mori M, Bjermer L, Stampfli MR, Erjefalt JS. IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(11):1232-41.
179. Tan HL, Rosenthal M. IL-17 in lung disease: friend or foe? *Thorax.* 2013;68(8):788-90.
180. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):773-8.
181. Friedrich M, Diegelmann J, Schaubert J, Auernhammer CJ, Brand S. Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):943-58.
182. Balamayooran G, Batra S, Theivanthiran B, Cai S, Pacher P, Jeyaseelan S. Intrapulmonary G-CSF rescues neutrophil recruitment to the lung and neutrophil release to blood in Gram-negative bacterial infection in MCP-1<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol.* 2012;189(12):5849-59.

183. Mebratu YA, Tesfaigzi Y. IL-17 Plays a Role in Respiratory Syncytial Virus-induced Lung Inflammation and Emphysema in Elastase and LPS-injured Mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2018;58(6):717-26.
184. Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, Kianmeher M. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis*. 2017;15:25.
185. Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2004;5:18.
186. Rao W, Wang S, Duleba M, Niroula S, Goller K, Xie J, et al. Regenerative Metaplastic Clones in COPD Lung Drive Inflammation and Fibrosis. *Cell*. 2020.
187. Vandeghinste N, Klattig J, Jagerschmidt C, Lavazais S, Marsais F, Haas JD, et al. Neutralization of IL-17C Reduces Skin Inflammation in Mouse Models of Psoriasis and Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2018;138(7):1555-63.
188. Krohn S, Nies JF, Kapffer S, Schmidt T, Riedel JH, Kaffke A, et al. IL-17C/IL-17 Receptor E Signaling in CD4(+) T Cells Promotes TH17 Cell-Driven Glomerular Inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(4):1210-22.
189. Butcher MJ, Waseem TC, Galkina EV. Smooth Muscle Cell-Derived Interleukin-17C Plays an Atherogenic Role via the Recruitment of Proinflammatory Interleukin-17A+ T Cells to the Aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(8):1496-506.
190. Tsai HC, Velichko S, Hung LY, Wu R. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:267971.
191. Chen K, Eddens T, Trevejo-Nunez G, Way EE, Elsegeiny W, Ricks DM, et al. IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against *K. pneumoniae*. *Cell Host Microbe*. 2016;20(5):596-605.
192. Yamanaka K, Fujisawa T, Kusagaya H, Mori K, Niwa M, Furuhashi K, et al. IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF-kappaB-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):1534-40.

193. Huang J, Yuan Q, Zhu H, Yin L, Hong S, Dong Z, et al. IL-17C/IL-17RE Augments T Cell Function in Autoimmune Hepatitis. *J Immunol.* 2017;198(2):669-80.
194. Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedan A, Tsourouktsoglou TD, Ching YM, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med.* 2017;23(6):681-91.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Act1	NF- $\kappa$ B Aktivator 1
AECOPD	Akute Exazerbation der COPD
AHR	Atemwegs-Hyperreaktivität
BAL	bronchoalveoläre Lavage
C57BL/6	C57 black 6
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine
CCL5	CC-Chemokin-Ligand-5, auch bekannt als RANTES
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CS	Zigarettenrauch
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
dest.	destilliert
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
FEV <sub>1</sub>	forciertes Expirationsvolumen in 1 Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität; Lungenvolumen, welches nach maximaler Einatmung mit maximaler Geschwindigkeit ausgeatmet werden kann
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA3	trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA3
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor

GINA	Globale Initiative für Asthma
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GOLD	Globale Initiative für chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
KC	Keratinocyte chemoattractant
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leukotriene B4
Ly6B	Lymphocyte antigen 6 complex, locus B
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCh	Methacholin
MCL	mean chord length
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein 2
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPO	Myeloperoxidase
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor-kappa B
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zelle
NTHi	Nontypeable Haemophilus influenzae
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pIC	Polyinosinic-polycytidylic acid



PRR	Pattern recognition receptor
P Wert	Wahrscheinlichkeitswert
RI	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
ROR $\gamma$ t	RAR-related orphan receptor gamma t
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEFIR	similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R
SEM	Standardfehler
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TLR	Toll-like-Rezeptor
WT	Wildtyp

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dargestellt ist der Entzündungszyklus in der Asthma-Pathogenese (nach [72]).	10
Abbildung 2: Dargestellt ist die Lungenstruktur/Lungenfunktion in einem Zeitdiagramm bei anhaltenden Entzündungen in der Asthma-Pathogenese (nach [72]).	11
Abbildung 3: Übersicht über die IL-17- Zytokine und Rezeptoren (nach [1]).	17
Abbildung 4: Der Signalweg von IL-17C (nach [1]).	18
Abbildung 5: Schema des experimentellen Versuchsablaufes im Asthma Model mit und ohne pIC Gabe.	26
Abbildung 6: Schema des experimentellen Versuchsablaufes der PBS scheinsensibilisierten Mäuse.	26
Abbildung 7: Mäuse wurden intranasal mit pIC herausgefordert. Kontrolltiere erhielten PBS.	27
Abbildung 8: Akutes COPD Mausmodell.	28
Abbildung 9: Chronisches CS- Mausmodell.	28
Abbildung 10: Chronisches NTHi Mausmodell.	29
Abbildung 11: IL-17C ist bei fortgeschrittener COPD erhöht.	42
Abbildung 12: Korrelationsanalysen zwischen den Konzentrationen der IL-17 Zytokine und der Lungenfunktion.	44
Abbildung 13: IL-17C korreliert negativ mit IL-17E/IL-25.	45

Abbildung 14: IL-17C hat keinen Einfluss auf den CS-induzierten Anstieg der Anzahl der Entzündungszellen. ....	47
Abbildung 15: IL-17C trägt zur COPD-ähnlichen pulmonalen Entzündung bei.....	49
Abbildung 16: Anzahl der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit nach 4- und 12-wöchiger NTHi Exposition.....	51
Abbildung 17: Repräsentative immunhistochemische Färbung von Ly6B und CD3 nach 4-wöchiger NTHi Exposition. ....	52
Abbildung 18: WT und <i>Il-17c</i> <sup>-/-</sup> Mäuse wurden 4 und 12 Wochen NTHi exponiert oder als Kontrolle Raumluft exponiert.....	54
Abbildung 19:: Expression von IL-17C, IL-6, G-CSF und KC in der Mauslunge von WT und <i>Il-17c</i> <sup>-/-</sup> Mäusen nach 4-wöchiger NTHi Exposition. ....	55
Abbildung 20: Konzentrationen der proinflammatorischen Entzündungsmediatoren IL-6, G-CSF und KC in der BAL-Flüssigkeit von WT und <i>Il-17c</i> <sup>-/-</sup> Mäusen nach 4-wöchiger NTHi Exposition.....	56
Abbildung 21: Intranasale Gabe von pIC induziert den Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge unabhängig von IL-17RE. ....	58
Abbildung 22: Intranasale Gabe von pIC führt zu erhöhten Konzentrationen von Chemokinen in der Lunge unabhängig von IL-17RE. ....	59
Abbildung 23: Versuchsablauf der pIC-induzierten Exazerbation im experimentellen Asthma. ....	60
Abbildung 24: IL-17RE reguliert die Bildung von Zytokinen und Chemokinen bei der pIC-induzierten Exazerbation im experimentellen Asthma. ....	61
Abbildung 25: IL-17RE reguliert die pIC-induzierte transkriptionelle Expression von Zytokinen im experimentellen Asthma.....	63

Abbildung 26: Die Defizienz für IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der Entzündungszellen in der BAL-Flüssigkeit im experimentellen Asthma. .... 64

Abbildung 27: Die Defizienz für IL-17RE führt zu einer verringerten Anzahl an Ly6B<sup>+</sup> Zellen nach pIC Applikation. .... 66

Abbildung 28: Die Defizienz für IL-17RE hat einen geringen Einfluss auf die invasive Lungenfunktionsmessung..... 67

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: COPD Klassifizierung nach GOLD (nach [5, 7]).....	2
Tabelle 2: Bakterienpathogene, die bei Exazerbationen und stabiler COPD beteiligt sind (nach [22]).....	4
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien. ....	21
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 6: Auflistung der Primersequenzen [143, 151, 152, 158]. ....	33
Tabelle 7: Verwendete ELISA Kits.....	34
Tabelle 8: Liste der Antikörper die für die IHC Färbung verwendet wurden.....	37
Tabelle 9: Beurteilung des inflammatorischen Lungenschadens.....	37
Tabelle 10: Stammdaten des untersuchten COPD Patientenkollektivs. ....	41
Tabelle 11: Konzentrationen der Zytokine IL-17A, IL-17C, IL-17E, IL-8 und CXCL5 im Sputum von COPD Patienten im GOLD Status I/II (n=11) und III/IV (n=25 während der AECOPD. ....	43

## 7.4 Publikationen

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

**Vella G**, Lunding L, Ritzmann F, Honecker A, Herr C, Wegmann M, Bals R, Beisswenger C. The IL-17 receptor IL-17RE mediates polyIC-induced exacerbation of experimental allergic asthma. *Respir Res.* 2020.

**Vella G**, Ritzmann F, Wolf L, Kamyschnikow A, Stodden H, Herr C, Hortense S, Bals R, Beisswenger C. IL-17C associates with disease severity during acute exacerbation of COPD and promotes inflammation-induced lung damage. Zur Publikation eingereicht.

Becker A\*, **Vella G\***, Galata V, Rentz K, Beisswenger C, Herr C, Walter J, Tierling S, Slevogt H, Keller A, Bals R. The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study. *Respir Res.* 2019 Feb 28;20(1):46. doi: 10.1186/s12931-019-1013-2.

\* **contributed equally**

Ritzmann F, Jungnickel C, **Vella G**, Kamyschnikow A, Herr C, Li D, Menger MM, Angenendt A, Hoth M, Lis A, Bals R, Beisswenger C. IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer. *Sci Rep.* 2019 Jul 17;9(1):10353. doi: 10.1038/s41598-019-46759-8.

Steck P, Ritzmann F, Honecker A, **Vella G**, Herr C, Gaupp R, Bischoff M, Speer T, Tschernig T, Bals R, Beisswenger C. Interleukin 17 Receptor E (IL-17RE) and IL-17C Mediate the Recruitment of Neutrophils during Acute *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia. *Infect Immun.* 2019 Oct 18;87(11):e00329-19. doi: 10.1128/IAI.00329-19.

Ritzmann F, Borchardt K, **Vella G**, Chitirala P, Angenendt A, Herr C, Menger M, Hoth M, Lis A, Bohle R, Bals R, Beisswenger C. Blockade of PD-1 decreases neutrophilic inflammation and lung damage in experimental COPD. Zur Publikation eingereicht.

## 7.5 Kongressbeiträge

Kongress „Lung Science Conference“ in Estoril, Portugal 2019; Posterpräsentation „Interleukin 17 receptor E (IL-17RE) mediates Poly(inosinic-cytidylic) acid-induced inflammation in a mouse model of allergic lung inflammation ”

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., in Essen 2018; Vortrag „The IL-17 receptor IL-17RE mediates Poly(inosinic-cytidylic) acid-induced inflammation in a mouse model of allergic lung inflammation“

Kongress der European Respiratory Society (ERS) „Cross-talk in the lung microenvironment: implications for understanding chronic lung disease“ in Berlin 2018, Posterpräsentation „Epithelial IL-17C regulates chronic neutrophilic inflammation of the lung“

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., in Gießen 2017; Posterpräsentation „Epithelzellen regulieren chronische neutrophile Entzündung über das Zytokin IL-17C“



## 7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Anfertigung meiner Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals bedanken, der mir durch die Aufnahme in seine Forschungsgruppe den Weg für meine Dissertationsarbeit eröffnet hat und seine stetige Unterstützung während dieser Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christoph Beisswenger für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, für alle technischen und wissenschaftlichen Ratschläge und stetige Unterstützung bei meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Michael Wegmann und Herrn Dr. Lars Lunding aus dem Forschungszentrum Borstel danke ich für die Zusammenarbeit bei den Asthmaversuchen.

Herzlichen Dank auch an meine ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Bals für die nette und entspannte Arbeitsatmosphäre. Auch für die großartige Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen, die Hilfestellungen bei meinen Projekten und die motivierenden Gespräche. Herrn Andreas Kamyschnikow, Frau Anja Honecker und Frau Victoria Weinhold möchte ich darüber hinaus für die hervorragende technische Unterstützung danken. Bedanken möchte ich mich auch bei Shaza Harfoush für die freundschaftliche Unterstützung, sei es wissenschaftlich oder privat.

Zuletzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir am Nächsten stehen: meiner Familie, besonders meinen Eltern und Sascha. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich ermutigt und unterstützt habt.

## **7.7 Lebenslauf**

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