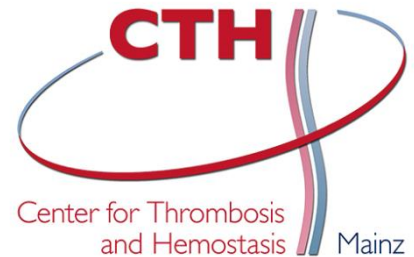




JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ



# **Untersuchungen zu zellspezifischen Aspekten der Interleukin-27 vermittelten Immunantwort**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Johannes Platten  
geb. am 25.04.1992 in Bensheim

Mainz, 2021

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

## **Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und alle Hilfsmittel – wie etwa Literatur, Apparaturen oder Materialien – angegeben habe. Die Arbeit wurde nicht, auch nicht Teile hiervon, bei einer anderen Fakultät oder in einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

---

Johannes Platten

---

Ort, Datum



## Zusammenfassung

Interleukin-27 (IL-27) ist ein immunmodulatorisches Zytokin mit sowohl proinflammatorischen als auch anti-inflammatorischen Eigenschaften. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zellspezifische Funktionen von IL-27 untersucht. Die Expression der Zytokin-spezifischen Rezeptorkette IL-27R $\alpha$  konnte in C57BL/6 Mäusen nahezu ausschließlich auf Immunzellen der lymphozytären Linie und hierbei insbesondere auf T Zellen und NK Zellen detektiert werden. Darüber hinaus resultierte die Stimulation des IL-27 Rezeptors auf T Zellen und unreifen CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> NK Zellen in einer robusten Aktivierung von STAT1 und STAT3. Die funktionelle Relevanz von IL-27 und IL-27R $\alpha$  wurde im Rahmen der pulmonalen Infektion mit Legionellen untersucht. Legionellen sind gramnegative Bakterien, die insbesondere bei älteren oder immunsupprimierten Menschen eine lebensbedrohliche, atypische Pneumonie (Legionärskrankheit) verursachen können. In der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Patienten mit Legionärskrankheit konnten signifikant erhöhte IL-27 Konzentrationen im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv detektiert werden. Auch im etablierten Mausmodell induzierten Legionellen die Freisetzung von IL-27 lokal in der Lunge und im Blutplasma. Neben globalen IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen und Wildtyp Kontrollmäusen wurde erstmals ein neuer IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Stamm für eine zellspezifische Deletion von IL-27R $\alpha$  in NK Zellen oder zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T Zellen verwendet. IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse wiesen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* einen milderen Gewichtsverlust einhergehend mit einer gesteigerten Aktivität von NK und T Zellen sowie erhöhte, protektive IFN $\gamma$  Konzentrationen im Plasma auf. In Überlebensstudien mit hochgradig virulenten *Legionella longbeachae* zeigten IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Letalität und einen reduzierten Lungenschaden. Eine NK Zell-spezifische Deletion von IL-27R $\alpha$  führte dagegen zu einem schwereren Krankheitsverlauf mit einem erhöhten Gewichtsverlust, verstärkten Krankheitszeichen, reduzierter NK Zell-Aktivierung und verminderten IFN $\gamma$  Konzentrationen in der BALF. Mäuse mit einer Defizienz von IL-27R $\alpha$  in CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen wiesen nach Legionellen-Infektion keine signifikanten Unterschiede im Schweregrad des Krankheitsbildes auf, was auf eine funktionelle Redundanz von IL-27R $\alpha$  bei CD8<sup>+</sup> T Zell-Antworten hindeutet. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass Zelltyp-spezifische Modulationen der IL-27R $\alpha$  Aktivität einen neuen Therapieansatz zur supportiven, immunmodulatorischen Behandlung der Legionärskrankheit darstellen könnten.

## Abstract

Interleukin-27 (IL-27) is an immunomodulatory cytokine with both proinflammatory and anti-inflammatory characteristics. Here, the cell-specific functions of IL-27 were investigated. Expression of the specific receptor chain IL-27R $\alpha$  was confined to immune cells of the lymphoid lineage. In particular T cells and NK cells showed high IL-27R $\alpha$  expression. In addition, stimulation of the IL-27 receptor on T cells and immature CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> NK cells resulted in the activation of STAT1 and STAT3. The functional relevance of IL-27 and IL-27R $\alpha$  was analyzed during pulmonary *Legionella* infection. *Legionella* are gram-negative bacteria which can cause atypical, life-threatening pneumonia (Legionnaires' disease) especially in elderly or immunosuppressed patients. IL-27 concentrations were significantly increased in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from patients with Legionnaires' disease compared to healthy controls. Furthermore, *Legionella* induced IL-27 release locally in the lung and in the plasma of mice. Besides global IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice and wildtype controls, a newly generated IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> strain was used to breed mice with cell-specific deletions of IL-27R $\alpha$  in NK cells or cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice lost less body weight as a surrogate of infection severity and showed increased activity of NK and T cells as well as higher, protective plasma IFN $\gamma$  concentrations during *Legionella pneumophila* infection. In survival studies with highly virulent *Legionella longbeachae*, IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice showed improved survival and signs for reduced lung injury. In contrast, NK cell-specific deletion of IL-27R $\alpha$  resulted in a more severe course of disease characterized by aggravated weight loss, higher disease scores, reduced NK cell activation and less IFN $\gamma$  in BALF. Mice with a deficiency of IL-27R $\alpha$  in CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells exhibited no significant differences in disease severity following *Legionella* infection, indicating a functional redundancy of IL-27R $\alpha$  for CD8<sup>+</sup> T cell responses. In conclusion, the data suggest that cell type-specific manipulations of IL-27R $\alpha$  activity could evolve as a new, immunomodulatory concept for the treatment of Legionnaires' disease.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XIV</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Interleukin 27 – ein Mitglied der IL-12 Zytokin-Familie.....	1
1.1.1 Struktureller Aufbau von Zytokinen der IL-12 Familie.....	1
1.1.2 Regulation von IL-27 Expression.....	3
1.1.3 IL-27 Rezeptor und induzierte Signalwege.....	5
1.1.4 IL-27 vermittelte Regulierung von T und B Zell-Antworten .....	6
1.1.5 IL-27 in Immunantworten der angeborenen Immunität.....	9
1.1.6 Die Rolle von IL-27 bei Infektionskrankheiten .....	10
1.1.7 Die Rolle von IL-27 bei Autoimmunerkrankungen .....	12
1.1.8 Herausforderungen bei der Untersuchung von IL-27 Funktionen.....	13
1.2 <i>Legionella pneumophila</i> – Erreger der Legionärskrankheit.....	14
1.2.1 Infektionsweg und molekulare Pathogenese .....	14
1.2.2 Immunerkennung und Immunantwort des Wirts .....	17
1.3 GNB2 – eine $\beta$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen .....	19
1.4 Arbeitshypothese .....	21
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Material.....	22
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.3 Puffer und Medien .....	25
2.1.4 Kommerzielle Kits und Assays .....	26
2.1.5 Agonisten und Inhibitoren.....	26
2.1.6 Antikörper .....	27
2.1.7 Primer.....	29
2.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme .....	30
2.1.9 Mausstämme.....	30
2.1.10 Geräte .....	31
2.1.11 Software .....	32

---

2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	33
2.2.2	<i>In vivo</i> Experimente und Isolation von Primärzellen .....	35
2.2.3	Zellkulturtechniken .....	40
2.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	42
2.2.5	Proteinbiochemische und immunologische Methoden .....	45
2.2.6	Statistische Auswertung und grafische Darstellung.....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1	Untersuchung der Expression von IL-27R $\alpha$ in naiven C57BL/6 Mäusen .....	49
3.1.1	Lymphozyten in Knochenmark, Milz und peripheren Lymphknoten exprimieren IL-27R $\alpha$ .....	49
3.1.2	Myeloide Zellen weisen keine/kaum detektierbare Expression von IL-27R $\alpha$ auf .....	52
3.1.3	IL-27R $\alpha$ wird auf Lungenepithel- und Lungenendothelzellen von unbehandelten C57BL/6 Mäusen nicht exprimiert.....	55
3.2	Zellspezifische Untersuchungen von IL-27 induzierten Signalwegen .....	57
3.2.1	IL-27 induziert STAT1- und STAT3-Signalwege in T Zellen.....	57
3.2.2	In NK Zellen von naiven C57BL/6 Mäusen induziert IL-27 nur in unreifen CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> Zellen die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3.....	61
3.2.3	IL-27 induziert keine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, MEK1 und p38 oder der Proteinkinase B (AKT).....	64
3.2.4	BMDMs sind nicht responsiv auf eine IL-27 Stimulation.....	66
3.2.5	Humane PBMCs sind IL-27 responsiv.....	67
3.3	Etablierung eines murinen Modells der Legionellose zur Untersuchung von IL-27 vermittelten Effekten.....	68
3.3.1	<i>Legionella pneumophila</i> induziert IL-27 Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ..	68
3.3.2	IL-27 responsive NK Zellen und T-Lymphozyten werden während der Legionellen-Pneumonie in die Alveolarräume rekrutiert .....	70
3.3.3	<i>Legionella pneumophila</i> induziert eine protektive IFN $\gamma$ -vermittelte Immunantwort.....	74
3.4	Infektionsstudien mit <i>Legionella pneumophila</i> .....	78
3.4.1	IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen mildereren Verlauf nach Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> .....	78
3.4.2	Herstellung von konditionalen Knockouts mit NK Zell-spezifischer oder CD8-spezifischer Defizienz von IL-27R $\alpha$ .....	83

3.4.3	Mäuse mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$ sind anfälliger während einer <i>Legionella pneumophila</i> Infektion .....	88
3.5	Überlebensstudien mit <i>Legionella longbeachae</i> .....	98
3.5.1	IL-27R $\alpha^{-/-}$ Mäuse haben ein besseres Überleben nach einer Infektion mit <i>Legionella longbeachae</i> .....	99
3.5.2	NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ Mäuse zeigen einen schwereren Krankheitsverlauf in der Frühphase einer Infektion mit <i>Legionella longbeachae</i> .....	102
3.6	GNB2 reguliert die Expression von IL-27p28 in Makrophagen .....	105
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>111</b>
4.1	Zellspezifische Untersuchungen der Expression von IL-27R $\alpha$ und IL-27 induzierter Signalwege .....	111
4.2	Die Rolle der IL-27 vermittelten Immunantwort im Rahmen der bakteriellen Legionellen-Pneumonie .....	116
4.3	Die Bedeutung von GNB2 im Rahmen einer Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> .....	123
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	125
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>127</b>
<b>IV.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>XIX</b>
	Danksagung .....	XIX

## I. Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	ACES	<i>N</i> -(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
	AF488	Alexa Fluor 488
	AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
	AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
	AKT (PKB)	Proteinkinase B
	AMs	Alveolarmakrophagen
	APC	Allophycocyanin
	APCs	<i>Antigen-presenting cells</i>
	Arf1	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
	ATP	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
	BCYE	<i>Buffered charcoal yeast extract</i>
	BMDMs	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
	bp	Basenpaar
	BSA	Bovines Serumalbumin
	BV421	<i>Brilliant Violet 421</i>
	BV510	<i>Brilliant Violet 510</i>
<b>C</b>	C5a	<i>Complement component 5a</i>
	Casp1	<i>Caspase 1</i>
	Ccl	<i>CC chemokine ligand</i>
	CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
	CD40L	CD40 Ligand
	cDNA	<i>Complementary DNA</i>
	CFUs	<i>Colony-forming units</i>
	CITE-Seq	<i>Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing</i>
	cKO	<i>Conditional Knockout</i>
	CLF	<i>Cytokine-like factor</i>
	c-MAF	<i>c-musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
	CNTFR $\alpha$	<i>Ciliary neurotrophic factor receptor alpha</i>
	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
	Cp	<i>Crossing point</i>
	C <sub>t</sub>	<i>Cycle threshold</i>
	CXCR	CXC Chemokin-Rezeptor
	Cy5.5	Cyanin 5.5
	Cy7	Cyanin 7

<b>D</b>	dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser	
	DMSO	Dimethylsulfoxid	
	DN	Doppelt-negative Zellen	
	DNA	Desoxyribonukleinsäure	
	Dot/icm	<i>defective organelle trafficking/intracellular multiplication</i>	
	DP	Doppelt-positive Zellen	
	DPBS	Dulbecco's PBS	
	dsRNA	Doppelsträngige RNA	
	DSS	<i>Dextran sodium sulfate</i>	
	DZ420	Bakterienstamm <i>Legionella longbeachae</i>	
<b>E</b>	EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	
	Ebi3	<i>Epstein-Barr virus-induced gene 3</i>	
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	
	Eomes	Eomesodermin	
	EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>	
	ER	Endoplasmatisches Retikulum	
	ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>	
<b>F</b>	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	
	Fc	Konstantes Fragment eines Antikörpers	
	FC	<i>Fold change</i>	
	FCS	Fötales Kälberserum	
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat	
	fl	Gefloxt	
	FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>	
	FRT	<i>Flippase recognition target</i>	
	FSC	<i>Forward scatter</i>	
	FSC-A	<i>Forward scatter-area</i>	
	FSC-H	<i>Forward scatter-height</i>	
	<b>G</b>	G	Gauge
		GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gbp		<i>Interferon-induced guanylate-binding protein</i>	
GDP		Guanosindiphosphat	
gMFI		<i>Geometric mean fluorescence intensity</i>	
GNB2		<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2</i>	
GO		Gen-Ontologie	
Gp130		Glykoprotein 130	

	GTP	Guanosintriphosphat
	GSEA	<i>Gene set enrichment</i> -Analyse
<b>H</b>	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
	HCl	Salzsäure
	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
	HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>I</b>	i.p.	Intraperitoneal
	ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
	ICOS	Induzierbarer T Zell Co-Stimulator
	IFN $\alpha/\beta$	Interferon alpha/beta
	IFNAR	Interferon alpha-Rezeptor
	IFN $\gamma$	Interferon gamma
	IFNGR	Interferon gamma-Rezeptor
	Ig	Immunoglobulin
	IL	Interleukin
	IL-27R $\alpha$	Interleukin-27 Rezeptor alpha
	ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
	IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
	IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
<b>J</b>	JAK	Januskinase
	JR32	Bakterienstamm <i>Legionella pneumophila</i>
<b>K</b>	KO	Knockout
	KOH	Kaliumhydroxid
<b>L</b>	LAG3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
	LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
	LCV	<i>Legionella-containing vacuole</i>
	LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
	loxP	<i>Locus of X-over</i>
	LPS	Lipopolysaccharide
<b>M</b>	Maf	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
	MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
	M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
	MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
	MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

	MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
	MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
	Mrc1	<i>Mannose receptor</i>
	mRNA	<i>Messenger RNA</i>
	MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
<b>N</b>	n	Gruppengröße
	NAIP5	<i>Neuronal apoptosis-inhibitory protein 5</i>
	NaOH	Natriumhydroxid
	Neo	Neomycin
	NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
	NK Zelle	Natürliche Killerzelle
	NKG2D	<i>NKG2-D type II integral membrane protein</i>
	Nlrc4	<i>NOD-like receptor family CARD domain containing 4</i>
	NLRP3	<i>NLR family pyrin domain-containing 3</i>
	NO	Stickstoffmonoxid
	NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
	Nos2	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
	Nrf2	<i>Nuclear factor E2-related factor 2</i>
	ns	Nicht signifikant
<b>O</b>	OD	Optische Dichte
<b>P</b>	p	Phosphoryliert; Wahrscheinlichkeit; Protein
	PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
	PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
	PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
	PE	Phycoerythrin
	PEMs	<i>Peritoneal elicited macrophages</i>
	PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
	Pparg	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
	PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
	PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
	P/S	Penicillin/Streptomycin
<b>Q</b>	qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
<b>R</b>	RANTES	<i>Regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
	RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
	RIN	<i>RNA integrity number</i>
	RNA	Ribonukleinsäure

<b>S</b>	RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
	S	Serin	
	SiglecF	<i>Sialic acid-binding Ig-like lectin F</i>	
	SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>	
	SPF	<i>Specific-pathogen free</i>	
	spp.	<i>Species pluralis</i>	
	SSC	<i>Side scatter</i>	
<b>T</b>	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	
	T	Threonin	
	T4SS	Typ IV Sekretionssystem	
	TAE	Tris-Acetat-EDTA	
	T-Bet	<i>T-box expressed in T cells</i>	
	TCR	T-Zell-Rezeptor	
	Tfh	Follikuläre T Helferzelle	
	Th1/2/17	Typ1/2/17 T Helferzelle	
	TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>	
	TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>	
	TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>	
	TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha	
	TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor	
	T <sub>R</sub> 1	Typ 1 regulatorische T Zelle	
	T <sub>reg</sub>	Regulatorische T Zelle	
	TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta</i>	
	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
	Tyk2	Tyrosin-Kinase 2	
	<b>U</b>		
	<b>V</b>	v/v	Volumen/Volumen
<b>W</b>	WT	Wildtyp	
	w/v	Gewicht/Volumen	
<b>X</b>			
<b>Y</b>	Y	Tyrosin	
<b>Z</b>			

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktureller Aufbau von Zytokinen und Rezeptoren der IL-12 Familie. .2	
Abbildung 2: Regulation von IL-27 Expression.....4	4
Abbildung 3: IL-27 reguliert T Zell-Antworten. ....8	8
Abbildung 4: Etablierung einer <i>Legionella-containing vacuole</i> in Alveolarmakrophagen. .....16	16
Abbildung 5: GNB2 ist an der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine beteiligt. .....20	20
Abbildung 6: Lymphozyten in Milz und Knochenmark von naiven C57BL/6 Mäusen exprimieren IL-27R $\alpha$ .....50	50
Abbildung 7: <i>Innate Lymphoid Cells</i> (ILCs) in peripheren Lymphknoten exprimieren IL-27R $\alpha$ . ....51	51
Abbildung 8: Myeloide Zellen aus Milz und Knochenmark naiver C57BL/6 Mäuse weisen keine messbare Expression von IL-27R $\alpha$ auf.....52	52
Abbildung 9: Makrophagen aus dem Knochenmark sowie rekrutierte Peritoneal- makrophagen und Neutrophile haben keine signifikante Expression von IL-27R $\alpha$ . ....54	54
Abbildung 10: In den Lungen von naiven C57BL/6 Mäusen ist IL-27R $\alpha$ weder auf Epithel- oder Endothelzellen noch auf Alveolarmakrophagen exprimiert. ....55	55
Abbildung 11: IL-27 induziert eine robuste STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T Zellen. ....58	58
Abbildung 12: Kinetik, Konsequenz und Korrelation von IL-27 induzierten STAT- Phosphorylierungen in T Zellen.....60	60
Abbildung 13: Reife CD27 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> NK Zellen aus der Milz naiver C57BL/6 Mäuse zeigen keine STAT1- und STAT3-Phosphorylierung nach IL-27 Stimulation. ....62	62
Abbildung 14: In NK Zellen aus dem Knochenmark naiver C57BL/6 Mäuse induziert IL-27 nur in unreifen CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> NK Zellen STAT1- und STAT3- Phosphorylierungen. ....63	63
Abbildung 15: IL-27 induziert keine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, MEK1 und p38 in naiven CD4 <sup>+</sup> T Zellen.....64	64

Abbildung 16: IL-27 induziert keine AKT-Phosphorylierung in naiven CD4 <sup>+</sup> T Zellen. .....	65
Abbildung 17: BMDMs sind nicht responsiv auf eine IL-27 Stimulation.....	66
Abbildung 18: IL-27 induziert eine robuste STAT3-Phosphorylierung in humanen PBMCs.....	67
Abbildung 19: <i>Legionella pneumophila</i> induziert IL-27 Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . .....	69
Abbildung 20: Die IL-27 Konzentration ist in der BALF von Patienten mit Legionärskrankheit signifikant erhöht.....	69
Abbildung 21: Gating-Strategie von BALF Immunzellen nach <i>Legionella pneumophila</i> Infektion. ....	71
Abbildung 22: Kinetik rekrutierter BALF Immunzellen nach <i>Legionella pneumophila</i> Infektion. ....	72
Abbildung 23: Rekrutierte BALF NK Zellen und T Zellen exprimieren IL-27R $\alpha$ . ....	73
Abbildung 24: Rekrutierte BALF NK Zellen und T Zellen exprimieren gp130. ....	73
Abbildung 25: Volcano Plot von differentiell exprimierten Genen nach <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> Infektion.....	74
Abbildung 26: Identifizierung induzierter zellulärer Signalwege nach <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> Infektion.....	75
Abbildung 27: <i>Legionella pneumophila</i> induziert eine IFN $\gamma$ -vermittelte Immunantwort. .....	77
Abbildung 28: IL-27R $\alpha$ defiziente Mäuse zeigen einen milderen Verlauf nach Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> . ....	79
Abbildung 29: NK- und T-Lymphozyten in der BALF von infizierten IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen weisen eine höhere Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf.....	81
Abbildung 30: Unterschiede in der Anzahl an NK und T Zellen in der Lunge von infizierten IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen.....	82
Abbildung 31: Herstellung einer neuen IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mauslinie (Il27ra <sup>tm1.1Bosm</sup> ) für konditionale Knockouts. ....	84
Abbildung 32: Deletionseffizienz von IL-27R $\alpha$ in NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen.....	85
Abbildung 33: Deletionseffizienz und Deletionsspezifität von IL-27R $\alpha$ in CD8 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen. ....	86

Abbildung 34: Deletionseffizienz und Deletionsspezifität von IL-27R $\alpha$ in CD8 <sup>Cre</sup> NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen.....	87
Abbildung 35: Mäuse mit NK Zell-spezifischer Defizienz des IL-27R $\alpha$ verlieren mehr Gewicht während einer Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> . ....	88
Abbildung 36: CD8 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigen keine Unterschiede im Schweregrad während einer Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> . ....	89
Abbildung 37: CD8 <sup>Cre</sup> NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse weisen keine signifikanten Gewichtsunterschiede während einer Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> auf.....	90
Abbildung 38: NK Zellen in der BALF von infizierten NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigen eine reduzierte Expression des Aktivierungsmarkers CD69. ...	93
Abbildung 39: Reduzierte Anzahl an NK Zellen in der Lunge von infizierten NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen.....	93
Abbildung 40: Konzentrationen von Chemokinen und Zytokinen in BALF nach Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> . ....	96
Abbildung 41: Zellzahlen in BALF und Lunge 7 Tage nach <i>Legionella pneumophila</i> Infektion. ....	96
Abbildung 42: <i>Legionella longbeachae</i> induziert IL-27 Expression <i>in vivo</i> . ....	98
Abbildung 43: IL-27R $\alpha$ defiziente Mäuse haben ein besseres Überleben während einer Infektion mit <i>Legionella longbeachae</i> . ....	99
Abbildung 44: IL-27R $\alpha$ defiziente Mäuse haben einen reduzierten Lungenschaden während einer Infektion mit <i>Legionella longbeachae</i> . ....	101
Abbildung 45: Mäuse mit NK Zell-spezifischer IL-27R $\alpha$ Defizienz zeigen einen schlechteren Krankheitsverlauf in der Frühphase einer Infektion mit <i>Legionella longbeachae</i> . ....	102
Abbildung 46: NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse weisen keinen erhöhten Lungenschaden während einer Infektion mit <i>Legionella longbeachae</i> auf. ....	103
Abbildung 47: Die IL-27 vermittelte STAT-Phosphorylierung und IL-10 Induktion ist unverändert in GNB2 defizienten T Zellen. ....	105
Abbildung 48: GNB2 reguliert die Expression von IL-27p28 in BMDMs nach LPS-Stimulation und Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> . ....	106
Abbildung 49: GNB2 <sup>-/-</sup> BMDMs haben ein erhöhtes Überleben nach <i>Legionella pneumophila</i> Infektion. ....	107

Abbildung 50: GNB2 defiziente Mäuse haben einen schwereren Krankheitsverlauf nach Infektion mit <i>Legionella pneumophila</i> . .....	108
Abbildung 51: Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen in der BALF von WT und GNB2 <sup>-/-</sup> Mäusen nach <i>Legionella pneumophila</i> Infektion .....	109
Abbildung 52: NK Zellen und T Zellen in der BALF von infizierten GNB2 <sup>-/-</sup> Mäusen weisen eine signifikant erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf. ....	110
Abbildung 53: Hypothetisches Modell der räumlich und zeitlich definierten Immunantworten durch IL-27 während einer Legionellen-Infektion..	122

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Labormaterialien.....	22
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Medien. ....	25
Tabelle 4: Kommerziell bezogene Kits und Assays.....	26
Tabelle 5: Verwendete Agonisten und Inhibitoren.....	26
Tabelle 6: Verwendete Antikörper. ....	27
Tabelle 7: Verwendete qPCR-Primer. ....	29
Tabelle 8: Verwendete Genotypisierungs-Primer.....	29
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien. ....	30
Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme.....	30
Tabelle 11: Verwendete Mausstämme.....	30
Tabelle 12: Verwendete Laborgeräte. ....	31
Tabelle 13: Verwendete Software. ....	32
Tabelle 14: Bestimmung eines Krankheits-Scores.....	36
Tabelle 15: PCR-Ansatz.....	42
Tabelle 16: Protokoll der cDNA-Synthese.....	44
Tabelle 17: qPCR-Protokoll.....	44

# 1 Einleitung

## 1.1 Interleukin 27 – ein Mitglied der IL-12 Zytokin-Familie

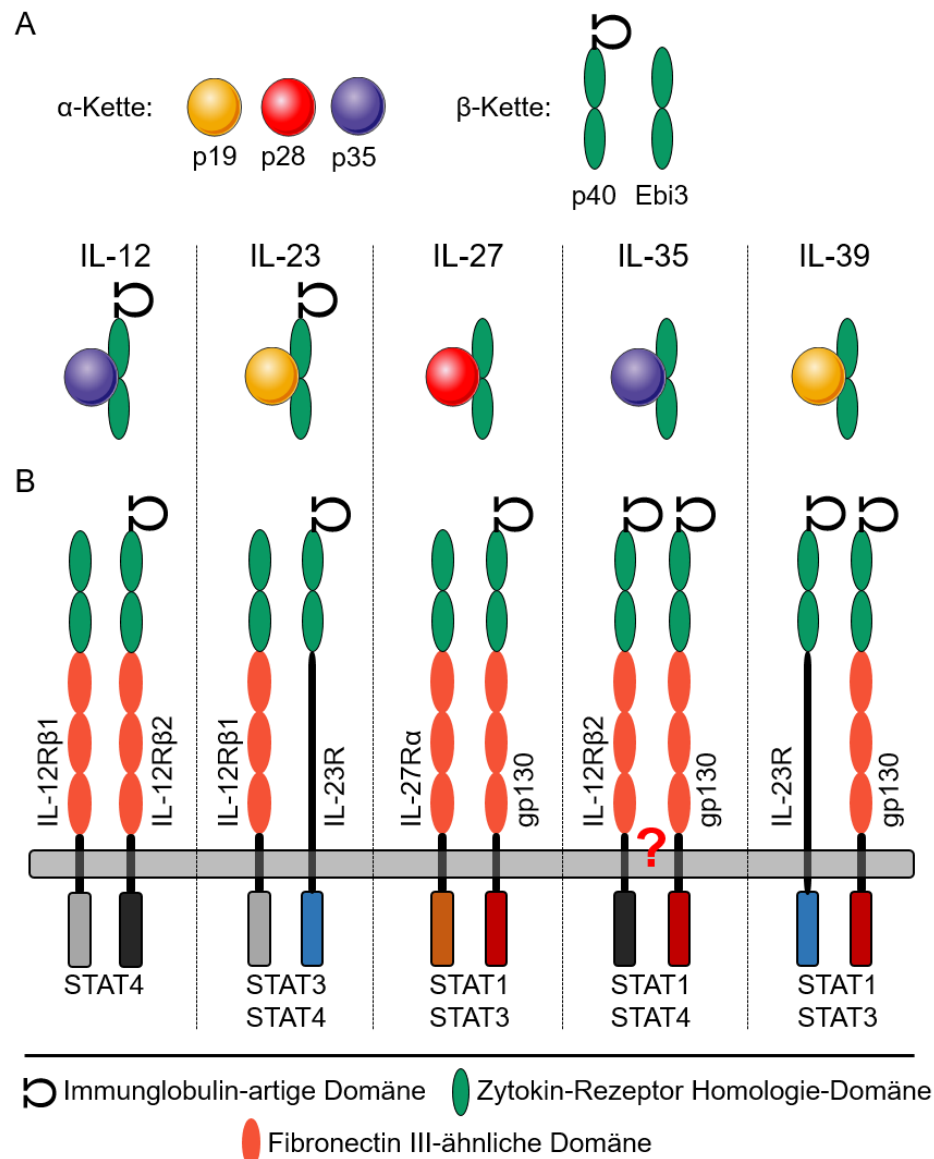
Interleukin 27 (IL-27) ist ein heterodimeres Zytokin, das aus den beiden Untereinheiten IL-27p28 und *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (Ebi3) besteht [1]. Es vermittelt seine biologische Funktion durch Bindung und Aktivierung des IL-27 Rezeptors, einem ebenfalls heterodimeren Rezeptor, der aus der Zytokin-spezifischen Rezeptorkette IL-27R $\alpha$  und Glykoprotein 130 (gp130) aufgebaut ist [2]. IL-27 gehört damit der IL-12 Familie heterodimerer Zytokine an. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich strukturell insbesondere dadurch aus, dass sowohl zwischen den verschiedenen Zytokinen als auch von ihren Rezeptoren dieselben  $\alpha$ -Ketten und  $\beta$ -Ketten geteilt werden [3]. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit verfügen Zytokine der IL-12 Familie über eine erstaunliche funktionelle Vielfalt und sie sind maßgeblich an der Regulation von T Zell-Antworten beteiligt [4, 5].

### 1.1.1 Struktureller Aufbau von Zytokinen der IL-12 Familie

Bis heute sind fünf Mitglieder der IL-12 Zytokin-Familie bekannt: das namensgebende Zytokin IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 sowie das erst kürzlich beschriebene IL-39 [6]. Die heterodimeren Zytokine bestehen aus einer von drei  $\alpha$ -Ketten (p19, p28, p35), die über eine Disulfidbrücke oder nicht-kovalente Interaktion mit einer von zwei  $\beta$ -Ketten (p40, Ebi3) assoziiert ist [7, 8]. IL-12 und IL-23 teilen sich die gemeinsame  $\beta$ -Kette p40 und unterscheiden sich in ihrer  $\alpha$ -Kette p35 bzw. p19 [9, 10]. Die Zytokine IL-27, IL-35 und IL-39 bestehen aus der gemeinsamen  $\beta$ -Untereinheit Ebi3 und den  $\alpha$ -Ketten p28, p35 und p19 (Abbildung 1A) [1, 6, 11]. Die  $\alpha$ -Ketten der IL-12 Zytokin-Familie verfügen wie auch IL-6 über eine konservierte 4-Helix-Bündel-Struktur. IL-12 Zytokine gehören damit der IL-6 Superfamilie an [8, 10]. Die beiden  $\beta$ -Untereinheiten p40 und Ebi3 sind strukturell der löslichen Rezeptorkette IL-6R $\alpha$  ähnlich [7].

Wie bereits bei den Zytokinen werden auch bei den Rezeptoren der IL-12 Familie dieselben fünf Rezeptorketten (IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2, IL-23R, IL-27R $\alpha$  und gp130) von den verschiedenen Mitgliedern geteilt. Der IL-12 Rezeptor besteht aus den beiden Untereinheiten IL-12R $\beta$ 1 und IL-12R $\beta$ 2 (Abbildung 1B) [12-14]. IL-12R $\beta$ 1 bildet darüber hinaus zusammen mit IL-23R den IL-23 Rezeptor [15]. Der IL-27 Rezeptor wurde als Heterodimer aus den beiden Rezeptorketten IL-27R $\alpha$  und gp130 identifiziert [2]. Der IL-35 Rezeptor besteht aus den beiden Untereinheiten IL-12R $\beta$ 2 und gp130.

Darüber hinaus wurden auch ungewöhnliche gp130- und IL-12R $\beta$ 2-Homodimere als IL-35 Rezeptor beschrieben [16]. IL-23R und gp130 bilden dagegen den IL-39 Rezeptor [17].



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau von Zytokinen und Rezeptoren der IL-12 Familie.**

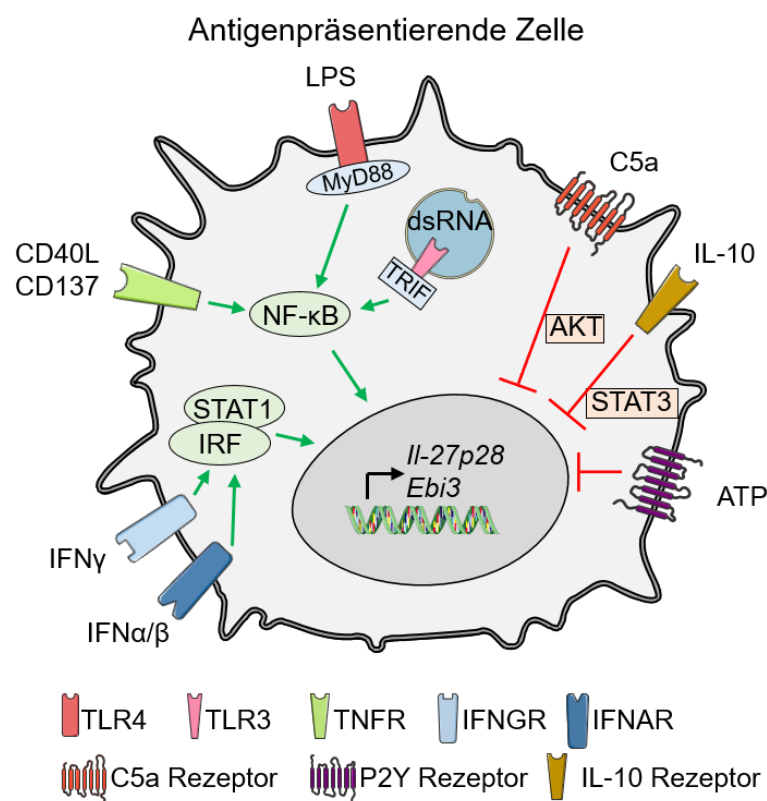
(A) Zytokine der IL-12 Familie sind Heterodimere, die aus einer von drei  $\alpha$ -Ketten (p19, p28, p35) und einer von zwei  $\beta$ -Ketten (p40, Ebi3) bestehen. Bis heute sind die fünf Mitglieder IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/Ebi3), IL-35 (p35/Ebi3) und IL-39 (p19/Ebi3) beschrieben. (B) Die Rezeptoren der IL-12 Familie teilen sich die gemeinsamen Rezeptorketten IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2, IL-23R, IL-27R $\alpha$  und gp130. Extrazellulär (N-terminal) verfügen die Rezeptoren über eine Zytokin-Rezeptor Homologie-Domäne, die aus zwei Fibronectin III-ähnlichen Domänen besteht, sowie weitere Fibronectin III-ähnliche Domänen oder eine Immunglobulin-artige Domäne. Intrazellulär (C-terminal) befinden sich Tyrosin-Reste für die Aktivierung von verschiedenen STAT-Signalwegen. Das rote Fragezeichen verweist auf die unklare Zusammensetzung des IL-35 Rezeptors. Adaptiert nach [4, 7, 17, 18]. STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, gp130: Glykoprotein 130.

Strukturell sind sämtliche Rezeptorketten der IL-12 Zytokine sogenannte Typ I Membranproteine mit einer extrazellulären N-terminalen und einer intrazellulären C-terminalen Domäne. Das N-Terminus beinhaltet eine Zytokin-Rezeptor Homologie-Domäne, die aus zwei Fibronectin III-ähnlichen Domänen besteht und auch bei den  $\beta$ -Ketten p40 und Ebi3 zu finden ist [5, 7]. Einige Rezeptorketten verfügen darüber hinaus über weitere Membran-proximale Fibronectin III-ähnliche Domänen oder eine Immunglobulin-artige Domäne [19]. C-terminal befinden sich ein oder mehrere Tyrosin-Reste, welche für die Bindung und Aktivierung von JAK (Januskinase)/STAT (*Signal transducer and activator of transcription*)- oder MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalmolekülen benötigt werden [20-22]. Die funktionelle Diversität der IL-12 Zytokine beruht unter anderem auf ihrer Fähigkeit, verschiedene STAT-Signalwege zu aktivieren. Während IL-12 vor allem STAT4 induziert, aktiviert IL-23 STAT3- und STAT4-Signalwege [10, 15, 23]. IL-27 induziert vorrangig STAT1 und STAT3, wohingegen IL-35 und IL-39 hauptsächlich STAT1 und STAT4 bzw. STAT1 und STAT3 aktivieren [6, 16, 24].

### 1.1.2 Regulation von IL-27 Expression

Neben der Aktivierung verschiedener STAT-Signalwege unterscheiden sich die Mitglieder der IL-12 Familie auch hinsichtlich ihrer zellulären und zeitlichen Expression [8, 25]. Antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen und dendritische Zellen sind die dominierende zelluläre Quelle von IL-27 [26]. Darüber hinaus können auch inflammatorische Monozyten, Mikroglia, Plasmazellen sowie Epithel- und Endothelzellen IL-27 exprimieren [27]. Die Expression und Freisetzung von IL-27 erfolgt im Allgemeinen als zelluläre Antwort auf mikrobielle oder immunologische Stimuli. Hierzu zählen unter anderem bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) oder virale doppelsträngige RNA (dsRNA), welche nach Aktivierung von *Pattern Recognition* Rezeptoren (PRR) eine NF- $\kappa$ B-vermittelte Expression von *Il-27p28* und *Ebi3* induzieren (Abbildung 2) [28, 29]. Auch Typ-I und Typ-II Interferone sind potente Aktivatoren von *Il-27p28* und wurden als zentraler Bestandteil eines positiven Feedback-Mechanismus beschrieben [26, 30]. Während NF- $\kappa$ B eine initiale Expression von *Il-27p28* induziert, vermitteln Typ-I und Typ-II Interferone durch die Aktivierung von STAT1 und *Interferon regulatory factors* (IRFs) eine anhaltende Expression [31, 32]. Zudem induzieren auch die Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie CD40L und CD137 durch die Bindung ihrer Rezeptoren die Expression

von IL-27 [33]. Demgegenüber stehen einige Faktoren, die die IL-27 Expression in APCs limitieren. Extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) inhibiert *Il-27p28* Expression durch Aktivierung von purinergen P2Y Rezeptoren [34]. Ebenso vermittelt C5a, eine Spaltkomponente des Komplementsystems, eine Inhibition von *Il-27p28* Expression durch Aktivierung von Proteinkinase B (PKB/AKT) [35, 36]. Auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 inhibiert IL-27 Expression im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus über die Induktion von STAT3-Signalwegen [37].



**Abbildung 2: Regulation von IL-27 Expression.**

IL-27 wird überwiegend von Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Mikrobielle molekulare Muster wie bakterielles LPS oder virale doppelsträngige RNA induzieren über die Adapterproteine MyD88 und TRIF eine NF- $\kappa$ B-vermittelte *Il-27p28* und *Ebi3* Expression. Auch CD40L und CD137 stimulieren NF- $\kappa$ B-Aktivität. IFN $\alpha/\beta$  und IFN $\gamma$  sind Teil eines positiven Feedback-Mechanismus und aktivieren STAT1 und IRFs für eine anhaltende *Il-27p28* Expression. Extrazelluläres ATP, der Komplementfaktor C5a und IL-10 wirken der *Il-27p28* Expression limitierend entgegen. Adaptiert nach [26, 32, 37, 38]. AKT: Proteinkinase B, ATP: Adenosintriphosphat, C5a: *Complement component 5a*, dsRNA: doppelsträngige RNA, IFNAR: Interferon alpha-Rezeptor, IFNGR: Interferon gamma-Rezeptor, IRF: *Interferon regulatory factor*, LPS: Lipopolysaccharid, MyD88: *Myeloid differentiation primary response 88*, NF- $\kappa$ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, TLR: *Toll-like-Rezeptor*, TNFR: *Tumornekrosefaktor-Rezeptor*, TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta*.

Die beiden IL-27 Untereinheiten IL-27p28 und Ebi3 weisen zum Teil erhebliche zeitliche Unterschiede in ihrem zellulären Expressionsprofil auf. Studien mit humanen LPS-stimulierten Monozyten und Dendritischen Zellen zeigen, dass die Expression von *IL-27p28* mit einem relativen Maximum etwa 6 Stunden nach Stimulation der von *Ebi3* mit einem relativen Expressionsmaximum 12 bis 24 Stunden nach Stimulation vorausgeht [1, 34]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass IL-27p28 unabhängig von Ebi3 sekretiert werden und die Aktivität von gp130-Signalwegen inhibieren kann. IL-27p28 Monomeren könnte damit die Rolle eines natürlichen Rezeptorantagonisten mit niedriger Rezeptoraffinität zukommen [39, 40]. Andere Studien berichten dagegen, dass jener beschriebenen Aktivität von IL-27p28 womöglich eine inkorrekte Konformation zugrunde liegt und dass korrekt gefaltetes IL-27p28 den löslichen IL-6R $\alpha$  binden und eine Trans-Aktivierung von gp130-Homodimeren induzieren kann [41]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass IL-27p28 auch mit *Cytokine-like factor* (CLF) ein biologisch aktives Heterodimer bildet, welches T und NK Zell-Aktivität stimuliert [42]. Die Frage, ob die zweite Untereinheit Ebi3 neben ihrer Funktion als Bestandteil der heterodimeren Zytokine IL-27, IL-35 und IL-39 ebenfalls eine eigenständige biologische Aktivität besitzt, ist dagegen nicht abschließend geklärt [32].

### 1.1.3 IL-27 Rezeptor und induzierte Signalwege

IL-27R $\alpha$  und gp130 bilden den heterodimeren IL-27 Rezeptor [2]. Während gp130 als ubiquitär exprimiert gilt, wurde IL-27R $\alpha$  Expression insbesondere auf Lymphozyten aber auch in myeloiden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Granulozyten oder auf Epithel- und Endothelzellen beschrieben [2, 43-48]. Die Bindung von IL-27 an den IL-27 Rezeptor resultiert in der Aktivierung der Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyrosin-Kinase 2 (Tyk2) einhergehend mit der Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Signalmolekülen [24, 38, 49]. Wenngleich STAT1 und STAT3 die dominanten IL-27 induzierten Signalwege sind, vermittelt IL-27 auch STAT4, STAT5 und STAT6 Aktivität [25, 50, 51]. Ebenso ist IL-27 in der Lage, die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 oder AKT-Signalwege zu stimulieren [52, 53]. In T Zellen aktiviert IL-27 zudem die Transkriptionsfaktoren c-Maf (*c-musculoaponeurotic fibrosarcoma*) und Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) [54, 55]. Neben der Beteiligung am heterodimeren IL-27 Rezeptor ist IL-27R $\alpha$  darüber hinaus Bestandteil der beiden trimeren Rezeptorkomplexe IL-27R $\alpha$ /gp130/CNTFR $\alpha$ , einem Oberflächenrezeptor für das neuroprotektive Peptid Humanin, und IL-27R $\alpha$ /gp130/IL-

6R $\alpha$ , dem Oberflächenrezeptor für das p28/CLF Heterodimer [42, 56]. In transformierten myeloiden Zellen wurde außerdem die Bildung von IL-27R $\alpha$  Homodimeren mit Aktivierung von STAT-Signalwegen nachgewiesen [57]. Auch eine lösliche Form von IL-27R $\alpha$ , welches IL-27 binden und IL-27 induzierte Signalwege inhibieren kann, wurde als natürlicher Antagonist beschrieben [58]. Die zweite Rezeptoruntereinheit gp130 ist zudem Bestandteil von Rezeptoren der IL-6 Zytokin-Familie wie IL-6, IL-11 oder *Leukemia inhibitory factor* (LIF) [59].

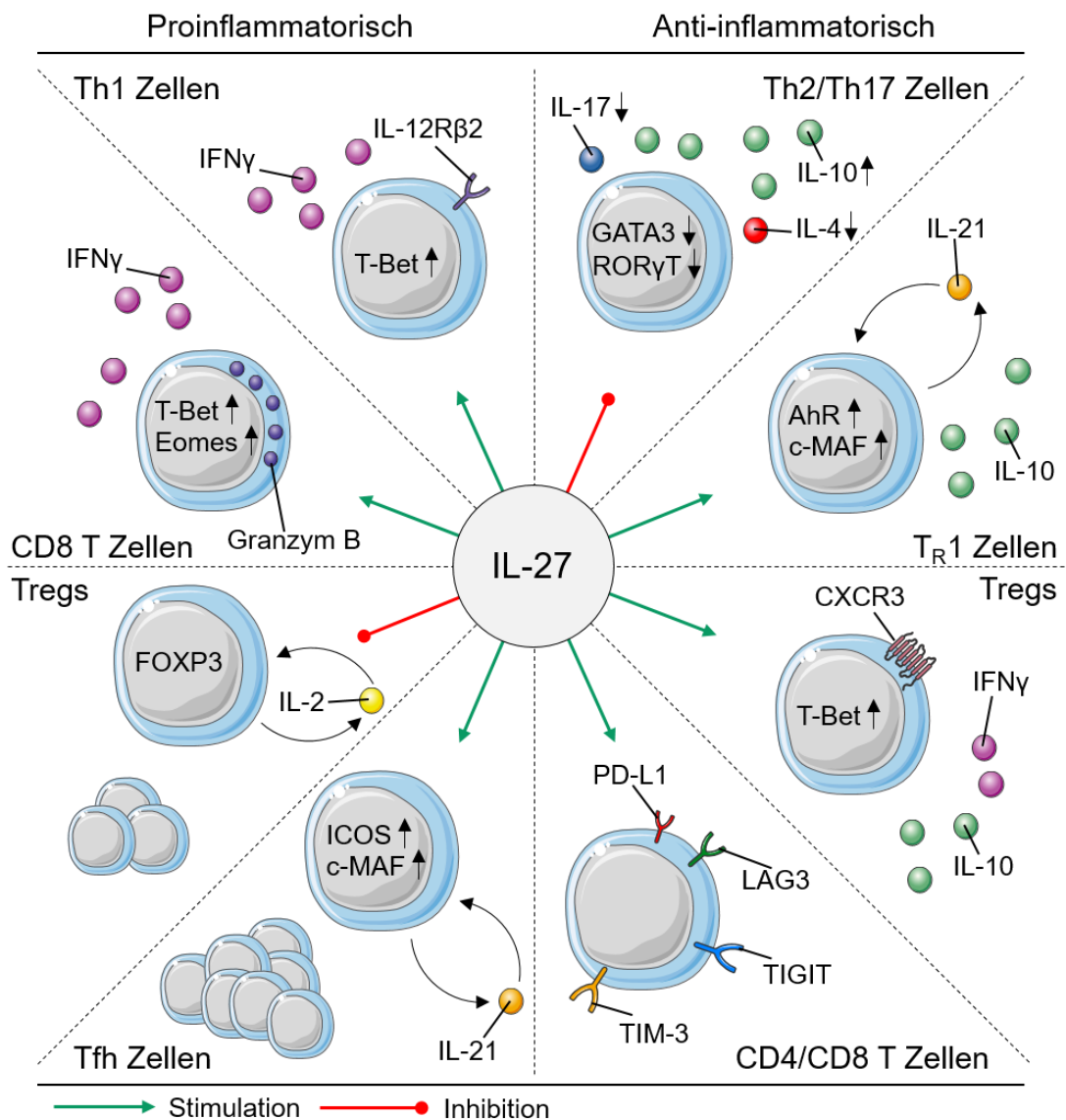
#### 1.1.4 IL-27 vermittelte Regulierung von T und B Zell-Antworten

Auch aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit IL-12 wurde IL-27 ursprünglich als proinflammatorisches Zytokin mit IL-12 synergistischer Funktion beschrieben [32]. So zeigten frühe Infektionsstudien mit *Listeria monocytogenes* und *Leishmania major*, dass IL-27R $\alpha$ -Signalwege für die Induktion einer protektiven Th1 T Zell-Antwort benötigt werden [44, 60]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen induziert IL-27 in naiven T Zellen und Natürlichen Killer (NK) Zellen den für Th1 Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktor *T-box expressed in T cells* (T-Bet) gemeinsam mit der Expression von IFN $\gamma$  und IL-12R $\beta$ 2 (Abbildung 3) [24, 50, 61-63]. Die Stimulation von proinflammatorischen Immunantworten durch IL-27 ist außerdem vielfach im Kontext von viralen Infektionen dominierend. In CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen stimuliert IL-27 die Proliferation, die Expression von T-Bet, Eomesodermin (Eomes) und IFN $\gamma$  sowie die zytolytische Aktivität [64-68]. Auch *in vivo* Studien mit ektopischer Expression von IL-27 in Tumorzellen belegen, dass IL-27 die Effektorfunktionen von zytotoxischen T Zellen stimulieren kann. IL-27 induziert Tumorspezifische T Zell-Antworten und Tumorregression [69-71]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird eine mögliche Relevanz für IL-27 im Rahmen von Impfungen als Adjuvans diskutiert [32, 72, 73].

Die rein proinflammatorischen Funktionen von IL-27 wurden durch zwei Infektionsstudien mit *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma cruzi* in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen grundsätzlich in Frage gestellt. In beiden Krankheitsmodellen waren IL-27R $\alpha$  defiziente Mäuse in der Lage, protektive T Zell-Antworten zu induzieren und die Replikation der Parasiten zu kontrollieren. Stattdessen gelang es den Mäusen nicht, ihre T Zell-Aktivität herunter zu regulieren und sie entwickelten eine letale Immunpathologie [74, 75]. Ausgehend von diesen beiden Veröffentlichungen folgte eine Reihe weiterer Studien zu Th1, Th2 und Th17 assoziierter Krankheitsmodelle, in

denen die Bedeutung von IL-27 für die Regulation von T Zell-Antworten offensichtlich wurde [26, 27, 32]. IL-27 antagonisiert die GATA3 sowie IL-4 Expression und inhibiert dadurch Th2 abhängige T Zell-Antworten [61, 76]. In Infektionsmodellen weisen IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse folglich eine erhöhte Resistenz während Th2 assoziierter Wurminfektionen auf [77, 78]. Ebenso inhibiert IL-27 ROR $\gamma$ T und ROR $\alpha$  Expression. Es hemmt die Freisetzung von IL-17 und limitiert damit Th17 abhängige T Zell-Antworten [79-81].

Die Beobachtung einer letalen T Zell-vermittelten Immunpathologie in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen nach *Toxoplasma gondii*-, *Trypanosoma cruzi*- oder Malaria-Infektion erinnert an den Phänotyp von IL-10 defizienten Mäusen in Infektionsmodellen mit den entsprechenden Parasiten [32, 74, 75, 82, 83]. Es überrascht daher nicht, dass IL-27 als potenter Aktivator von IL-10 Expression in Th0, Th1, Th2 und Th17 Zellen beschrieben wurde [63, 84-87]. Die IL-10 Freisetzung erfolgt dabei nach IL-27 vermittelter Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 [84]. In Typ 1 regulatorischen (T<sub>R1</sub>) T Zellen induziert IL-27 darüber hinaus die Transkriptionsfaktoren c-MAF und AhR sowie die Produktion von IL-21 für eine optimale Expression von IL-10 [54, 55]. Dagegen ist die Studienlage zur Rolle von IL-27 in FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen (T<sub>regs</sub>) vielschichtiger. Frühe Studien ergaben, dass IL-27 *in vitro* die Generation von induzierbaren T<sub>regs</sub> inhibiert [88]. Darüber hinaus resultierte die Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  in einem T Zell-Transfermodell in höheren T<sub>reg</sub> Zellzahlen und einer verminderten experimentellen Kolitis [89]. Die Überexpression von IL-27 reduziert dagegen T<sub>reg</sub> Zellzahlen und transgene Mäuse entwickeln spontane Entzündungsreaktionen [90]. Weitere Studien ergaben jedoch, dass IL-27 keinen direkten inhibitorischen Einfluss auf T<sub>regs</sub> hat und dass den vorherigen Beobachtungen eine IL-27 vermittelte Inhibition von IL-2 Expression, einem Zytokin mit essentieller Funktion für T<sub>regs</sub>, als indirekter Mechanismus zugrunde liegt [91]. So hat IL-27 weder auf die Expression von FOXP3 noch auf die immunsupprimierenden Effektorfunktionen von T<sub>regs</sub> einen direkten inhibierenden Einfluss [32, 43, 89]. Neuere Arbeiten zur Rolle von IL-27 für T<sub>regs</sub> zeigen, dass IL-27 das Überleben von T<sub>reg</sub> Populationen fördern kann [92, 93]. In Infektionsstudien mit intrazellulären Erregern wie *Leishmania major* oder *Toxoplasma gondii* wird IL-27 Aktivität für das Auftreten von T-Bet<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> und die lokale Regulation der Immunantwort benötigt [32, 92].



**Abbildung 3: IL-27 reguliert T Zell-Antworten.**

IL-27 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, welches sowohl pro- als auch antiinflammatorische T Zell-Antworten vermittelt. Proinflammatorische Eigenschaften: In naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen induziert IL-27 die Expression von T-Bet, IFN $\gamma$  und IL-12R $\beta$ 2. In zytotoxischen T Zellen stimuliert IL-27 die Expression von T-Bet, Eomes, IFN $\gamma$  und Granzym B. IL-27 hemmt die Expansion von FOXP3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> durch die Inhibition von IL-2 Expression. IL-27 stimuliert die Expansion von Tfh Zellen durch die Induktion von ICOS, c-MAF und IL-21. Antiinflammatorische Eigenschaften: IL-27 inhibiert GATA3 und ROR $\gamma$ T, limitiert IL-4 und IL-17 Expression und stimuliert stattdessen die Freisetzung von IL-10 in Th2 und Th17 Zellen. IL-27 stimuliert IL-10 Expression in T<sub>R</sub>1 Zellen durch die Induktion von c-MAF, AhR und IL-21. IL-27 induziert T-Bet<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> regulatorische T Zellen für eine lokale Regulation der Immunantwort. In CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen aktiviert IL-27 ein genetisches Programm zur Expression der inhibierenden Rezeptoren PD-L1, LAG3, TIM-3 und TIGIT. Adaptiert nach [48, 94, 95]. AhR: Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, c-MAF: *c-musculoaponeurotic fibrosarcoma*, Eomes: Eomesodermin, FOXP3: *Forkhead box P3*, ICOS: Induzierbarer T Zell Co-Stimulator, IFN $\gamma$ : Interferon gamma, LAG3: *Lymphocyte-activation gene 3*, PD-L1: *Programmed death-ligand 1*, TIGIT: *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*, TIM-3: *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*, T<sub>R</sub>1 Zelle: Typ 1 regulatorische T Zelle, T<sub>reg</sub>: regulatorische T Zellen.

Weitere immunregulatorische Funktionen von IL-27 wurden durch die initiale Beobachtung bekannt, dass IL-27 die Expression des inhibitorischen Rezeptors *Programmed death-ligand 1* (PD-L1) auf T Zellen induziert [96]. Darauf folgende Studien identifizierten weitere inhibitorische Rezeptoren wie *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG3), *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* (TIM-3) und *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT), deren Expression auf T Zellen durch IL-27 stimuliert werden kann [97-100]. IL-27 ist damit ein bedeutsamer Regulator eines inhibitorischen Gen-Programms in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen [95, 101].

IL-27 besitzt darüber hinaus Funktionen bei der Stimulation von follikulären T Helferzellen (Tfh) und B Zell-Antworten. Mechanistisch aktiviert IL-27 den induzierbaren T Zell Co-Stimulator (ICOS), c-MAF und IL-21, welche für die Entwicklung und Expansion von Tfh Zellen benötigt werden [54, 102, 103]. Zudem stimuliert IL-27 die Bildung von Keimzentren durch eine Suppression der IL-2 Expression [104, 105]. Auch direkte stimulatorische Effekte von IL-27 auf B Zellen sind beschrieben. So induziert IL-27 die Expression des Interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM) sowie des co-stimulatorischen Moleküls CD86 auf B Zellen [106]. Außerdem stimuliert IL-27 die Produktion von IgG2a and IgG1 [107, 108].

#### **1.1.5 IL-27 in Immunantworten der angeborenen Immunität**

Neben den weitreichenden immunmodulatorischen Funktionen bei T Zell-Antworten sind auch vielfältige Effekte von IL-27 auf Immunzellen der angeborenen Immunität und nicht-hämatopoetische Zellen beschrieben [109].

In murinen Modellen der peritonealen Sepsis resultiert die Abwesenheit von IL-27R $\alpha$ -Signalwegen in einem verstärkten respiratorischen Burst durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen, einer verbesserten bakteriellen Clearance und einem erhöhten Überleben [110, 111]. Unklar ist dabei, ob die in Knockout-Mäusen beobachtete erhöhte Aktivität der Neutrophilen durch eine direkte inhibitorische Funktion von IL-27 verursacht wird oder das Resultat einer indirekten veränderten Immunantwort ist. Beispielsweise inhibiert IL-27 die Produktion von IL-17, einem potenten Aktivator von Neutrophilen, durch  $\gamma\delta$  T Zellen und NK Zellen [112, 113]. Ebenso sind inhibitorische Funktionen von IL-27 für die Aktivität von NKT Zellen und Gruppe 2 *Innate Lymphoid Cells* (ILC2) beschrieben [114-116]. Dagegen fördert IL-27 sowohl antivirale als auch anti-Tumor Effektorfunktionen von NK Zellen [117-120].

Auch für  $\gamma\delta$  T Zellen und NKT Zellen sind Zytotoxizität-stimulierende Funktionen von IL-27 beschrieben [117, 121].

In humanen Makrophagen wurde IL-27 als Negativregulator von antimikrobiellen Immunantworten beschrieben. Während Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* inhibiert IL-27 die Azidifizierung des Phagolysosoms und beeinträchtigt damit die bakterielle Clearance [122]. In einem Infektionsmodell mit dem *Mycobacterium tuberculosis* unterdrückte IL-27 zudem die IFN $\gamma$ -vermittelte Autophagie und die Reifung des Phagolysosoms und förderte das bakterielle Überleben [53]. Für die Rolle von IL-27 in murinen Makrophagen existieren kontroverse, teils gegensätzliche Studien. Während einerseits berichtet wird, dass IL-27 die LPS-induzierte Expression von IL-12 und TNF $\alpha$  inhibiert und in einem sequenziellen Modell autokrin IL-10 Expression induziert, berichten andere Forschungsgruppen, dass murine Makrophagen und Dendritische Zellen keine oder nur eine minimale IL-27 Responsivität aufweisen [32, 45, 123, 124].

In nicht-hämatopoetischen Zellen konnte eine protektive Funktion von IL-27 in der Stimulation von antimikrobiellen und anti-inflammatorischen Proteinen durch humane Darmepithelzellen gezeigt werden [51]. Dagegen verstärkt IL-27 in humanen Bronchialepithelzellen die TNF $\alpha$  induzierte IL-6 Freisetzung [47]. In HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) Zellen induziert IL-27 darüber hinaus die Expression von *Major Histocompatibility complex* (MHC) II und die mit Leukozyten-Adhäsion und Diapedese assoziierten Chemokine CXCL9, CXCL10 und CX3CL1 [125, 126].

#### **1.1.6 Die Rolle von IL-27 bei Infektionskrankheiten**

Die Bedeutung der immunmodulatorischen und Kontext-abhängigen Funktionen von IL-27 wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Infektionskrankheiten und einer Reihe von unterschiedlichen Pathogenen untersucht [32, 109].

In murinen Modellen zur Malaria-Infektion induziert IL-27 die Expression von IL-10, reguliert T Zell-Aktivität und limitiert schädliche überschießende Immunreaktionen [82, 127]. Ebenso sind in Malaria-Patienten niedrige IL-27 Plasmaspiegel mit verstärkten Immunantworten und einem schwereren symptomatischen Verlauf assoziiert [128]. Auch im murinen Modell der Leishmaniose inhibiert IL-27 eine Infektions-assoziierte Immunpathologie durch die Stimulation von IL-10 Expression in T Zellen [129]. In Patienten korreliert IL-10 Expression dagegen mit einer verminderten Clearance der

Parasiten und IL-10 Neutralisation fördert die Beseitigung der Parasiten in aspirierten Zellen aus der Milz [130, 131].

In Mausmodellen zur polymikrobiellen Sepsis inhibiert IL-27 den respiratorischen Burst von Neutrophilen und Makrophagen und die genetische Deletion oder eine Inhibition von IL-27 durch blockierende Antikörper resultiert in einer verminderten bakteriellen Belastung und einem verbesserten Überleben [110, 111]. Ebenso zeigen *in vitro* Experimente mit dem gramnegativen Bakterium *Burkholderia pseudomallei*, dass exogenes IL-27 die Aktivität von Neutrophilen inhibiert und das bakterielle Überleben fördert. In Übereinstimmung mit diesen experimentellen Daten korrelieren erhöhte IL-27 Plasmakonzentrationen in Sepsis-Patienten mit einer schlechteren klinischen Prognose [132].

In murinen Modellen zur Influenza-Infektion verstärkt IL-27 die Effektorfunktionen von NK Zellen und stimuliert die IL-10 Expression in anti-viralen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen [120, 133]. Wenngleich IL-27 auch während einer humanen Influenza-Infektion induziert wird, ist bisher nicht klar, ob erhöhte IL-27 Konzentrationen auch tatsächlich mit dem Krankheitsverlauf korrelieren [32, 134]. Auch im Zentralnervensystem wurde IL-27 Expression im Kontext eines viralen Enzephalomyelitis-Modells mit dem murinen Hepatitis-Virus JHMV beschrieben. IL-27 Expression korrelierte mit einer verminderten IFN $\gamma$  Produktion von Virus-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen, einer reduzierten Clearance des Virus und einer verstärkten Demyelinisierung [135]. Darüber hinaus wurde IL-27 im Zusammenhang mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) als inhibierend für die HIV-1 Infektion in CD4<sup>+</sup> T Zellen und Makrophagen identifiziert und als Zytokin mit einem möglichen therapeutischen Potenzial beschrieben [109, 136, 137].

Zur Rolle von IL-27 in Pilzinfektionen ist demgegenüber vergleichsweise wenig bekannt. Patienten mit einer *gain-of-function* Mutation in STAT1 weisen eine erhöhte Anfälligkeit für eine chronisch-mukokutane Candidose auf [138]. Da IL-27 als potenter Inhibitor von Th17 T Zell-Antworten beschrieben wurde, könnte dem Krankheitsbild eine gesteigerte IL-27 induzierte STAT1-Aktivität als Ursache zugrunde liegen [48, 138].

### 1.1.7 Die Rolle von IL-27 bei Autoimmunerkrankungen

Die weitreichenden immunregulatorischen Funktionen von IL-27 wurden auch vielfach im Zusammenhang mit verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen untersucht [32, 48].

In experimentellen Modellen zur humanen Psoriasis stimuliert IL-27 proinflammatorische Entzündungsreaktionen und trägt zum Voranschreiten der Erkrankung bei. In Patienten mit Psoriasis sind die Plasmaspiegel von IL-27 zudem signifikant erhöht und sie korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung [139-141]. Bei inflammatorischen Darmerkrankungen wurden sowohl proinflammatorische als auch anti-inflammatorische Funktionen von IL-27 beschrieben. In IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen resultierte die Gabe von niedrigen Dosen von *Dextran sodium sulfate* (DSS) in einem verbesserten Schweregrad des Krankheitsbildes [142]. Hohe Dosen DSS führten dagegen in IL-27R $\alpha$  defizienten Mäusen zu einer erhöhten Th17 T Zell-Aktivität und verstärkten intestinalen Entzündungsreaktionen [143]. Eine Punktmutation im *IL-27p28* Gen wird darüber hinaus mit einer verminderten IL-27 Produktion und einer erhöhten Anfälligkeit für Morbus Crohn in Verbindung gebracht [144]. Ebenso limitiert IL-27 in murinen Asthma-Modellen Th2 T Zell-Antworten. Die genetische Deletion von IL-27R $\alpha$  resultiert in einer gesteigerten Lungenpathologie, einhergehend mit einer Hyperreaktivität der Atemwege, einer vermehrten Rekrutierung von Eosinophilen und erhöhten Serum IgE Konzentrationen [145, 146]. In der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zeigt IL-27 protektive Eigenschaften und inhibiert pathologische Th17 T Zell-Antworten [86, 147]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen korreliert bei Multiple Sklerose (MS)-Patienten der Erfolg einer Typ I Interferon-Therapie mit ihrer Fähigkeit, IL-27 Expression zu stimulieren [148, 149]. Experimentelle Studien zur Rolle von IL-27 bei Arthritis zeigen gegensätzliche Beobachtungen. In Modellen der Kollagen-induzierten Arthritis reduziert IL-27 die Konzentration von IL-17 in den Gelenken und verbessert das Krankheitsbild [150, 151]. Ebenso korrelieren in Patienten erhöhte Konzentrationen von IL-27 in der Gelenkflüssigkeit mit reduzierten IL-17 und IL-6 Konzentrationen [152]. In einem Modell der Proteoglykan-induzierten Arthritis stimulierte IL-27 dagegen IFN $\gamma$  Expression und förderte Knorpel- und Gelenkschäden [153].

### 1.1.8 Herausforderungen bei der Untersuchung von IL-27 Funktionen

Der heterodimere Aufbau von IL-27 und dem IL-27 Rezeptor sowie das kombinatorische Potenzial der einzelnen Untereinheiten und ihre gemeinsame Verwendung durch verschiedene Mitglieder der IL-6/IL-12 Superfamilie haben die Interpretation von Mausstudien mit verschiedenen Knockout-Stämmen in der Vergangenheit vielfach erschwert [4, 7, 48]. Wenngleich *Ebi3*<sup>-/-</sup> und *IL-27Rα*<sup>-/-</sup> Mäuse in Infektionsmodellen mit *Leishmania major* oder während peritonaler Sepsis ähnliche Phänotypen aufweisen, existieren Stamm-spezifische Eigenschaften, die sich durch die vielseitige Beteiligung der einzelnen Untereinheiten an weiteren Zytokin- oder Rezeptorkomplexen ergeben [25, 60, 110, 111, 154]. Aktuell existiert nur eine geringe Anzahl an Studien, die die Immunantworten von *IL-27Rα*<sup>-/-</sup>, *p28*<sup>-/-</sup>, *Ebi3*<sup>-/-</sup> oder *p35*<sup>-/-</sup> Mäusen in einem direkten Vergleich zueinander untersuchen [7]. Ebenso mangelt es an spezifischen neutralisierenden Antikörpern oder sensitiven *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs), die spezifisch entweder das heterodimere IL-27 oder aber einzelne Untereinheiten detektieren [4].

Insbesondere konditionale Knockout-Stämme, in denen entweder der *IL-27Rα* oder eine der beiden Zytokin-Untereinheiten *Ebi3* und *p28* zellspezifisch deletiert ist, sind vielversprechende Werkzeuge, um die Frage nach zellspezifischen Funktionen von IL-27 während komplexer Entzündungsreaktionen zu klären und herauszufinden, welche Zellen beide Zytokin-Untereinheiten exprimieren und das biologisch aktive Heterodimer produzieren [32, 38]. Bis heute sind nur wenige Studien mit konditionalen Knockout-Mäusen veröffentlicht, die sich zudem auf die Rolle von *IL-27Rα* in FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen beschränken. Die zellspezifische Deletion von *IL-27Rα* in T<sub>regs</sub> resultierte in einem Modell der T Zell-induzierten Kolitis in einer reduzierten Expression von LAG3 und einer verstärkten intestinalen Entzündungsreaktion [97]. Auch in einem EAE- und einem Asthma-Modell entwickelten Mäuse mit T<sub>reg</sub>-spezifischer Deletion von *IL-27Rα* überschießende Immunreaktionen und zeigten ein verschlechtertes Krankheitsbild im Vergleich zur Kontrollgruppe [155, 156]. Weitere Studien mit neuen konditionalen Knockout-Stämmen werden daher benötigt, um zellspezifische Funktionen von IL-27 beispielsweise in NK Zellen, in CD8<sup>+</sup> T Zellen, in Makrophagen oder in Neutrophilen zu identifizieren.

## 1.2 *Legionella pneumophila* – Erreger der Legionärskrankheit

Legionellen sind fakultativ intrazelluläre gramnegative Bakterien [157]. Sie wurden 1977 als ursächlicher Erreger einer mysteriösen Häufung tödlicher Pneumonien während eines Kongresses von amerikanischen Kriegsveteranen 1976 in Philadelphia identifiziert [158]. Über 180 Teilnehmer infizierten sich im Rahmen des Ausbruchs mit dem zunächst unbekanntem Pathogen. Insgesamt 29 von ihnen entwickelten einen tödlichen Krankheitsverlauf charakterisiert durch eine schwere Lungenentzündung, Lungenversagen, Nierenversagen oder das Auftreten eines septischen Schocks [159]. Das neue Krankheitsbild wurde als Legionärskrankheit beschrieben und sein ätiologischer Erreger als *Legionella pneumophila* terminiert [160]. Infektionen mit *Legionella pneumophila* weisen insbesondere bei älteren Menschen, bei Rauchern sowie bei Patienten mit chronischer Lungenerkrankung oder Immunsuppression eine hohe Letalität auf [161, 162]. Bei gesunden, immunkompetenten Menschen verursacht die Infektion dagegen in der Regel nur milde respiratorische Symptome oder sie verläuft asymptomatisch [163]. Darüber hinaus können *Legionella pneumophila* auch das ebenfalls milde Krankheitsbild des Pontiac-Fiebers hervorrufen [160, 164].

Seit der ersten Beschreibung von *Legionella pneumophila* 1977 wurden zahlreiche weitere Legionellen-Spezies identifiziert, von denen mindestens 24 mit humanen Infektionen in Verbindung gebracht werden [157]. Weltweit werden etwa 90% der diagnostizierten Fälle der Legionärskrankheit durch *Legionella pneumophila* verursacht [157]. *Legionella bozemanai*, *Legionella micdadei* und *Legionella longbeachae* sind Schätzungen zufolge für weitere 2-7% der Fälle verantwortlich [165]. Eine geografische Ausnahme bilden Australien und Neuseeland, wo etwa 30% der dokumentierten Fälle durch *Legionella longbeachae* hervorgerufen werden [166].

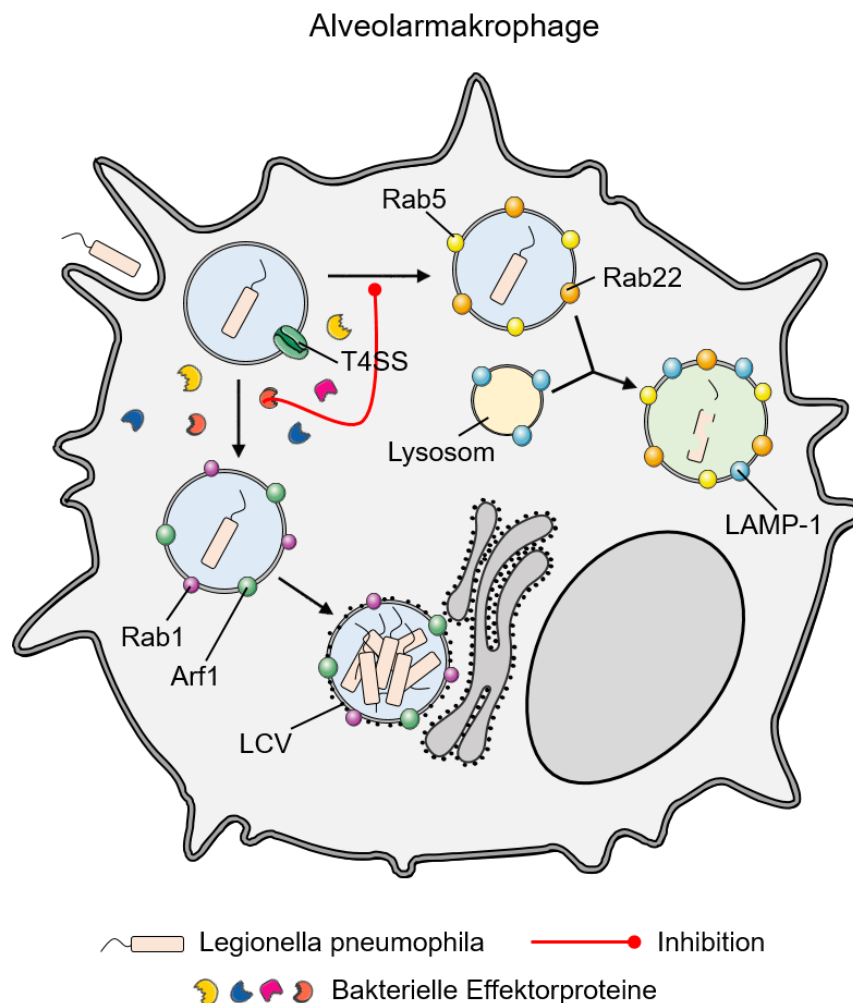
### 1.2.1 Infektionsweg und molekulare Pathogenese

Natürlicherweise treten *Legionella pneumophila* in wässrigen Umgebungen wie Flüssen oder Seen auf, wo sie freilebende Amöben parasitieren, die ihnen als replikative Nische dienen und Schutz gegenüber harschen äußeren Umwelteinflüssen vermitteln [163, 167-169]. Von infektiologischer Relevanz sind heutzutage überwiegend technische Einrichtungen mit Wassersystemen wie Klimaanlage, Kühltürme, Trinkwasserspeicher oder Duschen, bei denen eine unzureichende Wartung der Wasserleitungen in einer erhöhten bakteriellen Belastung resultieren kann. Eine Infektion mit *Legionella pneumophila* erfolgt nahezu ausschließlich durch

eine direkte Inhalation von kontaminierten Aerosolen [157, 170]. Es wurde bis heute lediglich ein einziger Fall beschrieben, der auf eine wahrscheinliche Mensch-zu-Mensch Übertragung zurückzuführen ist [171]. Dem Menschen kommt damit die Rolle eines versehentlichen Wirts zu und eine humane Infektion stellt eine replikative Sackgasse für das Bakterium dar [157, 160].

Alveolarmakrophagen sind ortsständige Immunzellen in der Lunge, welche als zelluläre Wächter der angeborenen Immunität das Lumen der Alveolarräume überwachen [172]. Bedingt durch ihre komplexe, spezielle Mikroumgebung verfügen Alveolarmakrophagen – ähnlich wie Kupffer-Zellen in der Leber oder Mikroglia im Zentralnervensystem – über einen einzigartigen Phänotyp [172, 173]. Die starke Exposition von Alveolarmakrophagen gegenüber vielfältigen Umweltfaktoren erfordert ein hohes Maß an funktioneller Plastizität. Einerseits müssen sie eine Immuntoleranz gegenüber ungefährlichen Umwelteinflüssen (z.B. Staubpartikeln) gewährleisten. Andererseits sollen protektive Immunantworten gegenüber eindringenden Pathogenen ermöglicht werden, ohne dabei einen übermäßigen Gewebeschaden durch eine unkontrollierte Reaktion des Immunsystems zu verursachen [172, 174]. Im Rahmen der Legionellen-Infektion werden die inhalierten Bakterien zunächst überwiegend durch ortsständige Alveolarmakrophagen phagozytiert [175]. Nach erfolgter Phagozytose sind *Legionella pneumophila* in der Lage, eine Fusion von Phagosom und Lysosom zu verhindern und stattdessen eine sogenannte *Legionella-containing vacuole* (LCV) als replikative Nische in infizierten Alveolarmakrophagen zu etablieren (Abbildung 4) [157, 160, 176]. Als entscheidender Virulenzfaktor für die Etablierung der LCV wurde ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS) in *Legionella pneumophila* identifiziert [175, 177]. Das T4SS ist ein Multiproteinkomplex, der dem Bakterium ermöglicht, etwa 300 bakterielle Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle zu translokieren und damit grundsätzliche zelluläre Prozesse wie Vesikeltransport, Proteinsynthese oder Autophagie zu beeinflussen [178-182]. Die bakteriellen Effektorproteine manipulieren die Rekrutierung und Aktivierung der für den endozytischen Weg charakteristischen kleinen G-Proteine Rab5 und Rab22 [157, 160, 176, 183]. Stattdessen werden die Proteine sekretorischer Vesikel Rab1 und Arf1 an die Membran der LCV assoziiert. Rab1 wiederum rekrutiert Vesikel, die dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) entstammen, sodass die Membran der LCV innerhalb von wenigen Stunden nahezu vollständig aus rauem ER besteht [175, 184,

185]. Defekte in einem der T4SS-kodierenden *Dot/icm* (*defective organelle trafficking/intracellular multiplication*) Genen resultieren dagegen in einer Rekrutierung von Rab5, Rab7 und dem *Lysosomal-associated membrane protein 1* (LAMP-1) und einer schnellen Beseitigung der Bakterien im Phagolysosom [186, 187].



**Abbildung 4: Etablierung einer *Legionella-containing vacuole* in Alveolarmakrophagen.**

In den Lungenalveolen werden inhalierte *Legionella pneumophila* durch ortsständige Alveolarmakrophagen phagozytiert. *Legionella pneumophila* verfügen über ein Typ IV Sekretionssystem, welches die Translokation von 300 bakteriellen Effektorproteinen aus dem Phagosom in das Zytosol der Alveolarmakrophagen vermittelt. Die bakteriellen Effektorproteine interferieren mit dem endozytischen Weg, indem sie die Rekrutierung und Aktivierung der endosomalen Marker Rab5 und Rab22 und eine Fusion des Phagolysosoms verhindern. Durch die Assoziation von Rab1 und Arf1 werden stattdessen sekretorische Vesikel rekrutiert und die *Legionella-containing vacuole* zu einer dem rauen Endoplasmatischen Retikulum abstammenden Organelle umgebaut. Adaptiert nach [157, 160, 188]. Arf1: *ADP-ribosylation factor 1*, LAMP-1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*, LCV: *Legionella-containing vacuole*, T4SS: Typ IV Sekretionssystem.

### 1.2.2 Immunerkennung und Immunantwort des Wirts

Da *Legionella pneumophila* als versehentlicher Erreger des Menschen zu bewerten ist, der in seinem natürlichen Zusammenleben mit freilebenden Amöben keinem Selektionsdruck durch das humane Immunsystem unterliegt, können seine *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) effizient durch PRRs des angeborenen Immunsystems erkannt werden [160, 175]. Zu diesen charakteristischen PAMPs gehören unter anderem bakterielles Peptidoglycan, Lipoproteine, Flagellin oder bakterielle DNA und RNA, die durch Aktivierung von *Toll-like receptor 2* (TLR2), TLR5, TLR9 oder von zytosolischen PRRs wie *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein* (NOD) 1 und NOD2 sowie *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *Melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) oder *Absent in melanoma 2* (AIM2) eine inflammatorische Immunantwort stimulieren [189-194]. In den meisten Inzucht-Mausstämmen wie C57BL/6 Mäusen induziert zytosolisches Flagellin darüber hinaus eine schnelle Aktivierung des *Neuronal apoptosis-inhibitory protein 5* (NAIP5)/*NOD-like receptor family CARD domain containing 4* (NLRC4)-Inflammasoms [195-197]. Die darauffolgende Aktivierung von Caspase-1 resultiert in einem inflammatorischen Zelltod (Pyroptose) der Makrophagen und verhindert dadurch eine effiziente Replikation der Bakterien in den Wirtszellen [198]. Wildtypische *Legionella pneumophila* rufen in C57BL/6 Mäusen daher nur einen milden Krankheitsverlauf hervor [157].

NK und CD8<sup>+</sup> T Zellen sind zytotoxische Lymphozyten des angeborenen bzw. des adaptiven Immunsystems, denen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Erregern wie *Legionella pneumophila* zukommt [175]. Einerseits vermitteln sie über die Ausschüttung von zytotoxischen Granula und die Freisetzung von Perforinen und Granzymen die Induktion von apoptotischem Zelltod in infizierten Zielzellen [199, 200]. Darüber hinaus produzieren sie pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$ , welche wiederum die bakterizide Aktivität von Phagozyten stimulieren können [201-203]. Eine Infektion mit *Legionella pneumophila* führt zu einer potenten zellulären Immunantwort mit Rekrutierung von Neutrophilen, Dendritischen Zellen, Monozyten, NK Zellen sowie von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen in die Alveolen [175]. Bei der Zytokinantwort wurden insbesondere Zytokine der IL-1 Familie wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-18 sowie die Th1 assoziierten Zytokine IL-12, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mit zentraler Bedeutung für eine protektive zelluläre Immunantwort beschrieben [204-207]. In

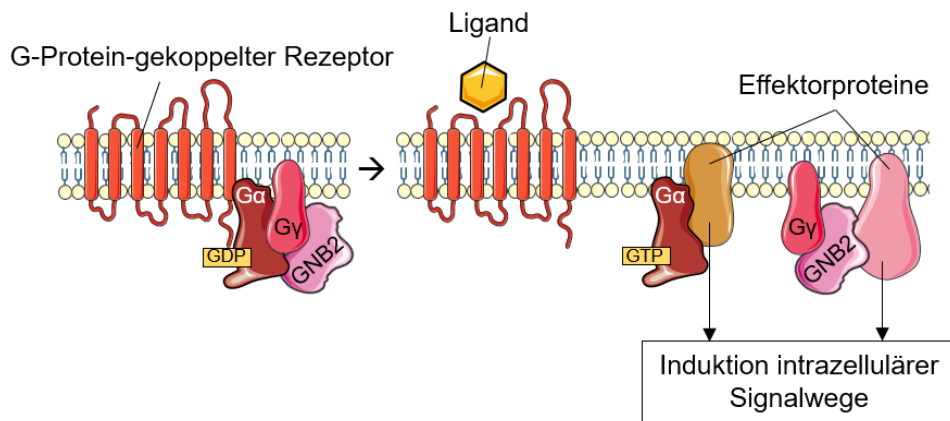
Übereinstimmung mit diesen Befunden aus Mausmodellen zeigen Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen unter anti-TNF $\alpha$  Therapie eine erhöhte Anfälligkeit für die Legionärskrankheit [208-210]. Ebenso legt eine retrospektive Analyse von Patienten mit Legionärskrankheit nahe, dass Beeinträchtigungen in der IFN $\gamma$  Antwort eine erhöhte Anfälligkeit begünstigen können [211]. Wenngleich der genaue Mechanismus unklar ist, wie IFN $\gamma$  die bakterielle Replikation inhibiert, zeigen *in vitro* Studien mit murinen Makrophagen, dass IFN $\gamma$  die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und Itaconsäure, einem Metaboliten mit bakteriziden Eigenschaften, stimuliert [203, 212, 213]. Zudem limitiert IFN $\gamma$  die Verfügbarkeit von essentiellen Eisen durch eine Suppression des Transferrin-Rezeptors und beeinträchtigt damit die Replikation von *Legionella pneumophila* [214, 215]. *In vivo* wurden insbesondere NK und T Zellen als zelluläre Quelle von IFN $\gamma$  beschrieben [216-218]. Die Depletion von NK Zellen während einer Infektion mit *Legionella pneumophila* resultiert in signifikant reduzierten IFN $\gamma$  Konzentrationen [219]. Ebenso resultiert die Depletion von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T Zellen in anfälligen A/J Mäusen in erhöhten bakteriellen Belastungen und einer gesteigerten Letalität [220].

Die Bedeutung von anti-inflammatorischen Zytokinen und die Regulation der Immunantwort im Rahmen einer Legionellen-Infektion ist dagegen weit weniger untersucht [175]. Obwohl IL-10 *in vitro* in humanen Monozyten und murinen Makrophagen die IFN $\gamma$ -vermittelten protektiven Effekte inhibiert, ist seine Beteiligung *in vivo* unklar [221, 222]. Ebenso liegen bis heute keine Publikationen zur Rolle des immunmodulatorischen Zytokins IL-27 vor.

### 1.3 GNB2 – eine $\beta$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen

Heterotrimere G-Proteine sind Membran-assoziierte Proteinkomplexe, die zwischen einem inaktiven GDP (Guanosindiphosphat)-gebundenen und einem aktiven GTP (Guanosintriphosphat)-gebundenen Zustand wechseln können und dadurch als molekulare Schalter der zellulären Signaltransduktion wirken [223, 224]. Im inaktiven Zustand ist der heterotrimere Proteinkomplex an spezielle Oberflächenrezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, gebunden (Abbildung 5). Die Bindung eines spezifischen extrazellulären Rezeptorliganden resultiert in einer molekularen Konformationsänderung des Rezeptors und ermöglicht den Austausch von GDP gegen GTP [225]. Der heterotrimere Komplex dissoziiert in eine GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit und einen  $\beta\gamma$ -Komplex. Beide Teilkomplexe sind in der Lage, mit zellulären Effektorproteinen zu interagieren und dadurch intrazelluläre Signalwege zu regulieren [226]. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit kann GTP wieder zu GDP hydrolysiert und die Signaltransduktion abgeschaltet werden [227].

GNB2 (*Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2*) ist eine von fünf bekannten  $\beta$ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen [226]. Mutationen in GNB2 wurden bereits mit neurologischen Entwicklungsstörungen, Fehlfunktionen des Herzens und Krebs in Verbindung gebracht [228-234]. Immunologische Studien konnten zudem eine Beteiligung von GNB2 bei der Chemotaxis und Rekrutierung von Immunzellen nachweisen [235, 236]. Darüber hinaus wird in der Proteininteraktions-Datenbank BioGRID eine humane Proteom-Studie geführt, die eine direkte Interaktion von GNB2 mit IL-27R $\alpha$  nahelegt [237]. Ob GNB2 durch seine Interaktion mit IL-27R $\alpha$  auch IL-27 induzierte Signalwege regulieren kann, ist dagegen nicht bekannt.



**Abbildung 5: GNB2 ist an der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine beteiligt.**

GNB2 ist eine  $\beta$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen. Im inaktiven Zustand ist der heterotrimer Komplex an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren assoziiert und die  $\alpha$ -Untereinheit bindet GDP. Die Bindung eines extrazellulären Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors und den Austausch von GDP gegen GTP. Das heterotrimer G-Protein dissoziiert vom Rezeptor und zerfällt in eine GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit und einen  $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl die  $G\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex können mit zellulären Effektorproteinen interagieren und damit eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege regulieren. Adaptiert nach [224, 225, 227]. GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintri-phosphat.

## 1.4 Arbeitshypothese

IL-27 ist ein immunmodulatorisches Zytokin mit Kontext-abhängigen Funktionen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Arbeitshypothese getestet, dass IL-27 Zelltyp-spezifische Effekte in NK Zellen und CD8<sup>+</sup> T Zellen hervorruft, welche für die komplexe Vielfalt an pro- und anti-inflammatorischen IL-27 Funktionen verantwortlich sind. Die immunologische Relevanz der zellspezifischen Funktionen von IL-27 soll im Rahmen der bakteriellen Legionellen-Pneumonie mithilfe von konditionalen und globalen IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen untersucht werden. Ebenso soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob die G-Protein  $\beta$ -Untereinheit GNB2 an der Regulation von IL-27 induzierten Signalwegen beteiligt ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1: Verwendete Labormaterialien.**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
ELISA-Platten NUNC MaxiSorp, 96-well	Sigma-Aldrich
FACS-Röhrchen, 5ml	Sarstedt
Feindosierungsspritzen	B. Braun
Filterspitzen (10µl)	Molecular BioProducts
Filterspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	StarLab
Flaschenaufsatzfilter (0,22µm)	Corning
Impfösen	VWR
Kanülen (20G, 21G, 24G, 26G)	Becton Dickinson
Kryokonservierungs-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific
Küvetten	Carl Roth
Mikrotestplatten, V-Boden, 96-well	Corning
Parafilm „M“	Bemis
PCR-Platten, 96-well	Bio-Rad
PCR-Streifen (8 x 250µl Reaktionsvolumen)	Sarstedt
Pipetten-Spitzen (200µl, 1000µl)	Sarstedt
Pipettierreservoirs (DNase und RNase-frei), 25ml	StarLab
Plattierungsspatel	Sarstedt
Präzisions-Wischtuch	KIMTECH Science
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio-One
Spritzen (1ml, 10ml, 20ml)	Becton Dickinson
Venenverweilkanülen Introcan-W (18G)	B. Braun
Zellheber, 18cm	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen, 182,5cm <sup>2</sup>	VWR
Zellkulturflaschen, 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (zellabweisend), 96-well	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten, 24-well	Corning
Zellkulturschalen, 10cm	Sarstedt
Zellsiebe (70µm, 100µm)	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
123count eBeads™ Counting Beads	Thermo Fisher Scientific
ACES (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Sigma-Aldrich
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth
Aktivkohle, Pulver	Sigma-Aldrich
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Carl Roth
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer
Bovine Serumalbumin (BSA)-Lösung, 35% (w/v) in DPBS	Sigma-Aldrich
Bradford Ultra™	Expedeon
Casein	Sigma-Aldrich
cComplete Protease Inhibitor, Tabletten	Roche
Desderman®	Schüle & Mayr
Dimethylsulfoxid (DMSO, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma-Aldrich
Dispase	Sigma-Aldrich
DNase I	Sigma-Aldrich
eBioscience™ TMB Solution (1x)	Thermo Fisher Scientific
EDTA-Lösung (0.5 M, steril)	Promega
Eisen(III)-Nitrat Nonahydrat (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
Ethanol (99,8%, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Carl Roth
Ficoll-Paque	Sigma-Aldrich
Fixable viability dye eFluor™ 780	Thermo Fisher Scientific
Formaldehyd, 16% (w/v)	Thermo Fisher Scientific
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
Isopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Carl Roth
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Ketamin (50 mg/ml)	Hameln
Kollagenase A	Sigma-Aldrich
Kollagenase D	Sigma-Aldrich
L-Cystein (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S)	Sigma-Aldrich

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
OneComp eBeads™ Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (P/S), 100x	Thermo Fisher Scientific
RNAse AWAY™	Molecular Bioproducts
Rompun® (Xylazin)	Bayer
RotiSafe GelStain	Carl Roth
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	AppliChem
Terralin®	Schüle & Mayr
Thioglykolat	BD Biosciences
Tris-HCl (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	AppliChem
Trypan-Blau, 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
UltraPure™, DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen

## 2.1.3 Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Medien.

Verwendung	Puffer/Medium	Hersteller/Zusammensetzung
ELISA	Blockpuffer	1x PBS + 1% (w/v) BSA
	PBS (10x)	Thermo Fisher Scientific
	Stopp-Lösung	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	Waschpuffer	1x PBS + 0,05% (v/v) Tween <sup>®</sup> 20
FACS	BD Cytotfix	BD Biosciences
	BD Perm III Puffer	BD Biosciences
	FACS-Puffer	1x PBS + 2mM EDTA + 3% (v/v) FCS
Geno- typisierung	Lysepuffer	25mM NaOH + 0.2mM EDTA, pH=12
	Neutralisationspuffer	40mM Tris-HCl, pH=5
	TAE-Puffer	AppliChem
Maus- experimente	Casein-Lösung	1x PBS + 9% (w/v) Casein
	Lungenverdau-Lösung	RPMI 1640 + 5% (v/v) FCS + 2,2mg/ml Kollagenase D + 0,055mg/ml DNase I
	Thioglykolat-Lösung	1x PBS + 3% (w/v) Thioglykolat
Zellkultur	BMDM Medium	RPMI 1640 + 30% (v/v) L-Zell konditioniertes Medium + 20% (v/v) FCS + 1% (v/v) P/S
	Erythrozyten-Lysepuffer	150mM NH <sub>4</sub> Cl + 10mM KHCO <sub>3</sub> + 0,1mM EDTA in dH <sub>2</sub> O
	HBSS	Gibco
	Kryokonservierungs-Medium	90% (v/v) FCS + 10% (v/v) DMSO
	L-Zell (L-929) Medium	RPMI 1640 + 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) P/S
	Makrophagen-Medium	RPMI 1640 + 0,1% (w/v) BSA
	PBS (1x)	ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , Gibco
	RPMI 1640	Mit L-Glutamin und 25mM HEPES, Gibco
Trypsin	Gibco	

### 2.1.4 Kommerzielle Kits und Assays

**Tabelle 4: Kommerziell bezogene Kits und Assays.**

Produktbezeichnung	Hersteller
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies
CD31 MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD45 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Cytokine & Chemokine Convenience 26-Plex Mouse ProcartaPlex™ Panel 1	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific
ELISA MAX™ Standard Set Mouse IFN- $\gamma$	Biolegend
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Human IL-27 DuoSet ELISA	R&D Systems
innuPREP RNA mini Kit 2.0	Analytik Jena
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad
Mouse IL-10 DuoSet ELISA	R&D Systems
Mouse IL-12 p40 DuoSet ELISA	R&D Systems
Mouse IL-27 p28/IL-30 DuoSet ELISA	R&D Systems
Qubit™ RNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	Biolegend

### 2.1.5 Agonisten und Inhibitoren

**Tabelle 5: Verwendete Agonisten und Inhibitoren.**

Agonist/Inhibitor	Arbeitskonzentration	Hersteller
Lipopolysaccharide (LPS, <i>E.coli</i> 0111:B4)	100 ng/ml	Sigma-Aldrich
Rekombinantes humanes IL-27	20 ng/ml	PeprTech
Rekombinantes murines IFN $\gamma$	20 ng/ml	PeprTech
Rekombinantes murines IL-27	10 ng/ml bis 20 ng/ml	R&D Systems
Rekombinantes murines IL-4	20 ng/ml	PeprTech

## 2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Antigen/Isotyp	Klon	Fluorophor	Hersteller
CD11b	M1/70	Pacific Blue PerCP-Cy5.5 PE-Cy7	Biolegend
CD11c	N418	PE-Cy7	Biolegend
CD127	A7R34	BV510	Biolegend
CD16	B73.1	APC-Cy7	Biolegend
CD19	6D5	Pacific Blue PerCP-Cy5.5	Biolegend
CD19	HIB19	APC	Biolegend
CD206	C068C2	PE-Cy7	Biolegend
CD25	PC61	APC/Fire FITC	Biolegend
CD27	LG.3A10	BV510	Biolegend
CD28	37.51		Biolegend
CD3	145-2C11	Pacific Blue	Biolegend
CD3	17A2	BV510	Biolegend
CD3	HIT3a	APC	Biolegend
CD3	17A2		Biolegend
CD31	390	APC	Biolegend
CD326 (EpCAM)	G8.8	APC	Biolegend
CD38	90	FITC	Biolegend
CD4	RM4-5	BV510 FITC PerCP	Biolegend
CD45	30-F11	Alexa Fluor 488	Biolegend
CD49b	DX5	Alexa Fluor 488	Biolegend
CD56	MEM-188	PE	Biolegend
CD69	H1.2F3	PerCP-Cy5.5 PE-Cy7	Biolegend
CD8 $\alpha$	53-6.7	APC APC/Fire PE-Cy7	Biolegend

F4/80	BM8	APC FITC Pacific Blue	Biolegend
GATA3	16E10A23	Alexa Fluor 488	Biolegend
gp130	4H1B35	PE	Biolegend
IL-27R $\alpha$	2918	PE	BD Biosciences
Ly6C	HK1.4	BV510 PE	Biolegend
Ly6G	1A8	APC PE-Cy7	Biolegend
MHCII	M5/114.15.2	PerCP	Biolegend
NK1.1	PK136	APC	Biolegend
NKp46	29A1.4	PE	Biolegend
pAKT <sub>S473</sub>	M89-61	Alexa Fluor 488	BD Biosciences
pAKT <sub>T308</sub>	J1-223.371	PE	BD Biosciences
pERK1/2 <sub>T202/Y204</sub>	20A	PE	BD Biosciences
pMEK1 <sub>S298</sub>	J114-64	Alexa Fluor 488	BD Biosciences
p-p38 <sub>T180/Y182</sub>	36/p38	PE	BD Biosciences
pSTAT1 <sub>S727</sub>	K51-856	Alexa Fluor 488	BD Biosciences
pSTAT1 <sub>Y701</sub>	4a	PE	BD Biosciences
pSTAT3 <sub>S727</sub>	49/p-Stat3	PE	BD Biosciences
pSTAT3 <sub>Y705</sub>	4/P-STAT3	Alexa Fluor 488	BD Biosciences
pSTAT4 <sub>Y693</sub>	38/p-Stat4	PE	BD Biosciences
pSTAT5 <sub>Y694</sub>	47/p-Stat5	PE	BD Biosciences
pSTAT6 <sub>Y641</sub>	18/P-Stat6	PE	BD Biosciences
Rat IgG2a, $\kappa$	R35-95	PE	BD Biosciences
Rat IgG2b, $\kappa$	RTK4530	PE	Biolegend
ROR $\gamma$ T	AFKJS-9	APC	eBioscience
SiglecF	E50-2440	BV421	BD Biosciences
T-Bet	4B10	PE-Cy7	Biolegend
TCR $\beta$	H57-597	BV510	Biolegend
TCR $\gamma/\delta$	GL3	APC	Biolegend
TruStain FcX™	93		Biolegend

## 2.1.7 Primer

Tabelle 7: Verwendete qPCR-Primer.

Ziel-Gen	Orientierung	Sequenz (5'-3')
<i>Ebi3</i>	Vorwärts	GCCATGCTTCTCGGTATCC
	Rückwärts	GAGCCTGTAAGTGGCAATGA
<i>Gapdh</i>	Vorwärts	TACCCCAATGTGTCCGTCGTG
	Rückwärts	CCTTCAGTGGGCCCTCAGATGC
<i>Il-27p28</i>	Vorwärts	GGCCATGAGGCTGGATCTC
	Rückwärts	AACATTTGAATCCTGCAGCCA

Tabelle 8: Verwendete Genotypisierungs-Primer.

Genotypisierung	Orientierung	Sequenz (5'-3')
CD8-Cre Transgen	Vorwärts	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
	Rückwärts	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
CD8-Cre	Vorwärts	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Interne Kontrolle	Rückwärts	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
GNB2 KO Allel	Vorwärts	CATCTTCCCCTTGTCTCCTG
	Rückwärts	GGAATCAGTCTTCCCAAATTACTG
GNB2 WT Allel	Vorwärts	CATCTTCCCCTTGTCTCCTG
	Rückwärts	AATCCCCGCATGCTTTTT
IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ Allel	Vorwärts („Ef“)	CTGGCCTGCATGGGTTTCCTAATC
	Rückwärts („Er“)	CACACGCTTGTGTGTCAGGTAC
IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ Allel	Vorwärts („Lf“)	CTGGGATGACAGCTGTGAACTGTC
	Rückwärts („Lr“)	CGTGACCTGAGGAGAGTGACTTAAC
IL-27R $\alpha$ KO Allel	Vorwärts	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC
	Rückwärts	AGGTGAGATGACAGGAGATC
IL-27R $\alpha$ WT Allel	Vorwärts	CAAGACCTTGTGTGCAGGTG
	Rückwärts	GTCACCATCTTGAGCCCAGT
NCR1-Cre Transgen	Vorwärts	ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG
	Rückwärts	GACCATGATGCTGGGTTTGGCCCAGAT
NCR1-Cre	Vorwärts	TTACGTCCATCGTGGACAGC
Interne Kontrolle	Rückwärts	TTCCCGGTATCATCAGCACA

### 2.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	ATCC® Identifizierungsnummer
L-929 Fibroblasten	CCL-1™

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstämme	Herkunft
<i>Legionella longbeachae</i> DZ420 [238]	Prof. Vance, University of California, Berkeley
<i>Legionella pneumophila</i> JR32 [239]	Prof. Vance, University of California, Berkeley

### 2.1.9 Mausstämme

Tabelle 11: Verwendete Mausstämme.

Stamm	Offizielle Nomenklatur	Herkunft
CD8-Cre	C57BL/6-Tg(Cd8a-cre)1Itan/J	Jackson Laboratory
CD8 <sup>Cre</sup> IL-27Rα <sup>fl/fl</sup>		Eigene Zucht, CTH, Mainz
CD8 <sup>Cre</sup> NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27Rα <sup>fl/fl</sup>		Eigene Zucht, CTH, Mainz
GNB2	C57BL/6N-Gnb2 <sup>em1(IMPC)J/J</sup>	Jackson Laboratory
IL-27Rα <sup>-/-</sup>	B6N.129P2-II27ra <sup>tm1Mak/J</sup>	Jackson Laboratory
IL-27Rα <sup>fl/fl</sup>	II27ra <sup>tm1.1Bosm</sup>	Charles River Laboratories
NCR1-Cre	Tg(Ncr1-icre)265Sxl [240]	Prof. Sexl, Veterinärmedizinische Universität, Wien
NCR1 <sup>Cre</sup> IL-27Rα <sup>fl/fl</sup>		Eigene Zucht, CTH, Mainz
WT	C57BL/6JRj	Janvier

## 2.1.10 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
-80°C Gefrierschrank	Eppendorf
Bakterien-Inkubator HERATHERM	Thermo Fisher Scientific
Bio-Plex® 200 System	Bio-Rad
Bio-Plex® HTF	Bio-Rad
Bio-Plex® magnetisches Handwaschgerät	Bio-Rad
FACS Cantoll	BD Biosciences
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank	Liebherr
Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
Kühlschrank	Liebherr
Mastercycler ProS	Eppendorf
Mehrkanalpipette (10µl – 300µl)	StarLab
Mixer MTS 2/4	IKA
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Nalgene
Nano Drop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Neubauer-Zählkammer	Brand
pH-Meter HI2211 pH/ORP Meter	HANNA Instruments
Pipetten (0,1µl – 2µl, 1µl – 10µl, 2µl – 20µl, 20µl – 200µl, 200µl – 1000µl)	Gilson
Pipettierhelfer (Accurpette)	VWR
Plattenleser Opsys MR	Dynex Technologies
Präparierbesteck	Carl Roth
qTOWER <sup>3</sup> G	Analytik Jena
Qubit® Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Rodent Intubation Stand	Braintree Scientific, Inc.
SpectraMax i3	Molecular Devices
Stickstofftank	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler C1000	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage AY612	Sartorius

Waage CPA1003P	Sartorius
Wasserbad	Julabo
Werkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur-Inkubator	Memmert
Zentrifuge 5417 C/R	Eppendorf
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckman Coulter
Zentrifuge Rotanta/RP	Hettich

### 2.1.11 Software

**Tabelle 13: Verwendete Software.**

<b>Verwendung (Software)</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
Durchflusszytometrie (FACS Diva)	6.1.3	BD Biosciences
Durchflusszytometrie (FlowJo®)	10.5.2	FlowJo® LLC
ELISA (Revelation)	4.25	Dynex® Technologies
Spektrophotometer (NanoDrop 2000c)	1.6.198	Thermo Fisher Scientific
Genotypisierung (ImageLab)	5.2.1	Bio-Rad
Graphische Darstellung (GraphPad Prism)	9.0.1	GraphPad Software Inc.
Multiplex (Bio-Plex® Manager)	6.2	Bio-Rad
qPCR (qPCRsoft4.0)	4.0.8.0	Analytik Jena
Statistik (GraphPad Prism)	9.0.1	GraphPad Software Inc.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellen von BCYE-Agarplatten

*Buffered charcoal yeast extract* (BCYE) Agarplatten wurden für die Anzucht der gram-negativen Bakterien *Legionella pneumophila* und *Legionella longbeachae*, wie von Hori und Zamboni publiziert [241], hergestellt. Dazu wurde zunächst ein Basismedium bestehend aus 10g Hefeextrakt und 10g *N*-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure (ACES) in einem Liter deionisiertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde mit einer 1M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH=6,9 eingestellt. Anschließend wurden 15g bakteriologischer Agar und 2g Aktivkohlepulver hinzugefügt und das Medium wurde für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Währenddessen wurden zwei Supplementations-Lösungen angesetzt. Je 0,4g L-Cystein und 0,135g Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> wurden in 10ml deionisiertem Wasser gelöst und steril-filtriert. Nach Abkühlen des Mediums in einem Wasserbad bei 56°C wurde es mit den vorbereiteten Lösungen supplementiert. Unter sterilen Bedingungen wurden je 20ml Medium luftblasenfrei in Zellkulturschalen gegossen. Die BCYE-Agarplatten wurden für 4 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur anschließenden Verwendung für maximal 30 Tage bei 4°C gelagert.

#### 2.2.1.2 Anzucht der gramnegativen Bakterien *Legionella pneumophila* und *Legionella longbeachae*

Aus einer leicht angetauten Legionellen-Stocklösung wurden mithilfe einer sterilen Impföse geringe Mengen der Bakterien entnommen und auf eine BCYE-Agarplatte überführt. Ein Drei-Ösen-Ausstrich zur Verringerung der Bakteriendichte wurde durchgeführt. Die BCYE-Agarplatte wurde bis zum Auswachsen einzelner abgegrenzter Bakterien-Kolonien für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden zwei bis drei Einzelkolonien mit sterilen Impfösen auf eine frische BCYE-Agarplatte überführt und dort auf einer ca. 1,5cm x 1,5cm großen Fläche ausgestrichen. Die frische Agarplatte wurde erneut für 2 Tage bei 37°C bis zur Ausbildung sichtbarer Bakterien-Plaques inkubiert [241].

### 2.2.1.3 Ansetzen eines infektiösen Inokulums

Ein sichtbarer Bakterien-Plaques wurde mit einer sterilen Impföse von der BCYE-Agarplatte abgekratzt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit 1ml vorgelegtem sterilem dH<sub>2</sub>O überführt. Die Legionellensuspension wurde durch gründliches Mischen mit einem Vortex-Schüttler homogenisiert. Zur Herstellung einer 1:10-Verdünnung wurden 100µl Bakteriensuspension zu 900µl dH<sub>2</sub>O hinzugefügt. Hiervon wurden 500µl in eine Küvette überführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>) wurde bestimmt (Nano Drop 2000c). Die Bakteriensuspension wurde auf eine optische Dichte von OD<sub>600</sub>=1,0 eingestellt. Durch Ausplattieren serieller Verdünnungen (siehe 2.2.1.4) wurde empirisch festgestellt, dass eine OD<sub>600</sub>=1,0 einer bakteriellen Konzentration von etwa  $4 \times 10^8$  Colony-forming units (CFUs)/ml entspricht. Für *in vivo* Versuche wurde die Legionellensuspension wie in 2.2.2.1 beschrieben in PBS verdünnt. Bei Zellkulturexperimenten erfolgte die Verdünnung zur Einstellung der gewünschten *Multiplicity of infection* (MOI) mit Makrophagenmedium.

### 2.2.1.4 Bestimmung bakterieller CFUs durch Ausplattieren serieller Verdünnungen

Bei allen Infektionsexperimenten mit *Legionella pneumophila* oder *Legionella longbeachae* wurde die anhand der optischen Dichte abgeschätzte Infektionsdosis durch Ausplattieren serieller Verdünnungen des Inokulums auf BCYE-Agarplatten überprüft. Hierzu wurden serielle 1:10-Verdünnungen des Inokulums in sterilem dH<sub>2</sub>O angesetzt. Je 100µl der vierten bis siebten Verdünnungsstufe wurden mithilfe eines Plattierungsspatels auf BCYE-Agarplatten ausgestrichen. Ebenso wurde die bakterielle Last in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) der Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht. Analog wurden serielle 1:10-Verdünnungen der BALF in dH<sub>2</sub>O angesetzt und 100µl der ersten beiden Verdünnungsstufen wurden ausplattiert. Die BCYE-Agarplatten wurden für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der gewachsenen Bakterien-Kolonien bestimmt und die Konzentration der bakteriellen CFUs wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

### **2.2.2 *In vivo* Experimente und Isolation von Primärzellen**

Sämtliche *in vivo* Mausexperimente wurden im Vorfeld durch das zuständige Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07/G17-1-036). Nicht genehmigungspflichtige Versuche zur Organentnahme wurden dem Landesuntersuchungsamt angezeigt. Alle Mausstämme wurden unter kontrollierten SPF (*specific pathogen-free*)-Bedingungen mit definiertem 12-stündigem Tag-Nacht-Zyklus und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. *In vivo* Experimente wurden ausschließlich mit Männchen in einem Alter von 8-12 Wochen durchgeführt.

#### **2.2.2.1 Intranasale Infektion mit *Legionella pneumophila* und *Legionella longbeachae***

Infektionsexperimente wurden durch Verabreichung der gramnegativen Bakterien *Legionella pneumophila* oder *Legionella longbeachae* über die intranasale Route durchgeführt [238]. Dazu wurden Mäuse zunächst durch intraperitoneale Gabe einer Ketamin/Xylazin-Lösung (100mg/kg Körpergewicht Ketamin + 8mg/kg Körpergewicht Xylazin in sterilem PBS) anästhesiert. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes sichergestellt. Für die Applikation der Bakterien wurden die Mäuse in vertikaler Position an einem *Rodent Intubation Stand* fixiert. Das vorbereitete Inokulum wurde unmittelbar vor Verabreichung in sterilem PBS auf eine Konzentration von  $5 \times 10^7$  CFUs/ml (*Legionella pneumophila*) oder  $1 \times 10^8$  CFUs/ml (*Legionella longbeachae*) verdünnt. Je 20µl Bakteriensuspension oder 20µl steriles PBS (als Scheinbehandlung) wurden vorsichtig in ein Nasenloch appliziert. Die vollständige Aspiration der Lösung wurde überprüft und die Maus für etwa 1 Minute auf dem *Rodent Intubation Stand* belassen, bis sich die Atmung wieder normalisiert hatte. Nach erfolgter Infektion wurden die Mäuse über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen bei Infektion mit *Legionella pneumophila* und bis zu 14 Tagen bei Infektion mit *Legionella longbeachae* täglich gewogen und auf Krankheitszeichen überprüft.

#### **2.2.2.2 Bestimmung eines Krankheits-Scores**

Nach Infektion mit *Legionella longbeachae* wurde der Gesundheitszustand der infizierten Mäuse zweimal täglich überprüft. In Anlehnung an ein bereits publiziertes Scoring-System in einem bakteriellen Sepsis-Modell [242] wurde nachfolgende Tabelle verwendet, um den Krankheitszustand der Mäuse zu evaluieren. Als Abbruchkriterium wurde ein kumulativer Score  $\geq 12$  oder ein Score von 3 bei einem

einzelnen Parameter definiert. Betroffene Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und in Überlebensstudien als Ereignis für den folgenden Beobachtungszeitpunkt gewertet.

**Tabelle 14: Bestimmung eines Krankheits-Scores**

<b>Parameter</b>	<b>Score</b>	<b>Beschreibung</b>
Allgemeinzustand	0	Fell glatt, glänzend und anliegend; Körperöffnungen sauber
	1	Fell matt
	2	Fell stumpf; verklebte oder feuchte Körperöffnungen
	3	Fell gestäubt; Tier fühlt sich kalt an; Lähmungen
Augen	0	Augen glänzend
	1	Augen trüb; leichte Exsudate
	2	Augen eingesunken und trüb; mäßige Exsudate
	3	Augen geschlossen; starke Exsudate
Spontanverhalten	0	Aufmerksam und neugierig; flinke Bewegungen
	1	Eingeschränkte oder reduzierte Bewegung
	2	Isolation; Apathie; Koordinationsstörungen
	3	Automutilation; Nekrosen; Rektumvorfall
Atmung	0	Normal
	1	Atemfrequenz ggf. verlangsamt; Leichte Dyspnoe
	2	Atemfrequenz reduziert; mäßige Dyspnoe
	3	Atemfrequenz reduziert, ausgeprägte abdominale Atmung
Haltung	0	Normal
	1	Leichte Krümmung
	2	Mäßige Krümmung
	3	Starke Krümmung; beeinträchtigte Bewegung
Reaktionsverhalten auf Stimulus	0	Direkte Reaktion auf akustische Stimulation und Berührung
	1	Langsame/keine Reaktion auf akustische Stimulation
	2	Langsame Reaktion auf Berührung
	3	Keine Reaktion auf akustische Stimulation und Berührung

### **2.2.2.3 Organentnahme und Isolation von Primärzellen**

Zur Organentnahme und Isolation von Primärzellen wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Exposition euthanasiert und das Fell der Tiere mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert.

#### **2.2.2.3.1 Milz und Lymphknoten**

Das Fell der Mäuse wurde mit einer Schere geöffnet und vom darunterliegenden Peritoneum getrennt. Periphere Lymphknoten wurden mithilfe zweier Pinzetten vorsichtig aus der Leiste und Achselhöhle entnommen. Das Peritoneum wurde weiter mit einer Schere geöffnet und die Milz vorsichtig herauspräpariert. Milz und Lymphknoten wurden von verbliebenem Fettgewebe befreit. Mit dem stumpfen, sterilen Kolben einer 1ml Spritze wurden Milz und Lymphknoten auf einem 100µm Zellsieb zerdrückt. Das Zellsieb wurde mit RPMI Medium mit 5% FCS (v/v) gespült und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Splenozyten wurden in 1ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, auf Eis für 3 Minuten inkubiert und erneut zentrifugiert. Zur Untersuchung der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert. Stimulationsexperimente mit Proteinphosphorylierung als Endpunkt wurden mit je 5x10<sup>5</sup> Splenozyten in zellabweisenden 96-well Zellkulturplatten durchgeführt. Stimulationsexperimente mit Zytokin-Messung als Endpunkt erfolgten mit 2x10<sup>6</sup> Splenozyten in 24-well Zellkulturplatten mit plattengebundenem α-CD3 und gelöstem α-CD28 Antikörper.

#### **2.2.2.3.2 Knochenmark**

Femur und Tibia wurden aus den Hinterbeinen von Mäusen mithilfe von Präparierbesteck entnommen. Fellreste sowie Muskel- und Fettgewebe wurden mit einem Präzisions-Wischtuch entfernt und die freiliegenden Knochen in PBS auf Eis überführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen zunächst für 30 Sekunden in Terralin<sup>®</sup> desinfiziert und anschließend äußerlich mit PBS gespült. Femur und Tibia wurden an ihren Enden mit einer Schere geöffnet und das Knochenmark mithilfe einer 20ml Spritze mit kaltem PBS und einer 24G Kanüle aus dem Knochen auf ein 100µm Zellsieb gespült. Das Zellsieb wurde mit PBS gewaschen und die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Zur Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark wurde mit den Zellen weiter verfahren, wie in 2.2.3.3 beschrieben. Für die Untersuchung der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen.

#### **2.2.2.3.3 Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF)**

Der Thorax der Mäuse wurde mit Präparierbesteck geöffnet. Die Schilddrüse wurde mithilfe zweier Pinzetten getrennt und die Trachea wurde freigelegt. Eine 18G Venenverweilkanüle wurde in die exponierte Luftröhre eingeführt. Mit einer Spritze wurde 1ml PBS mit 2mM EDTA und 1x Protease-Inhibitor in die Lunge appliziert. Nach einigen Sekunden wurde die Lösung aspiriert. Gegebenenfalls wurde der Vorgang wiederholt und eine zweite BALF entnommen. Für Zytokin-Messungen wurde immer die zellfreie erste BALF verwendet. Zur Untersuchung der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen beider Spülungen vereint.

#### **2.2.2.3.4 Lunge**

Lungen wurden zunächst mit 10ml kaltem PBS perfundiert. Nach Entnahme der Lunge aus dem freiliegenden Thorax wurde sie in ein 2,0ml Reaktionsgefäß überführt und dort mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Die Lunge wurde enzymatisch mit Dispase [50U/ml] oder Kollagenase D [2,2mg/ml] für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von EDTA mit einer finalen Konzentration von 10mM gestoppt. Die Zellsuspension wurde auf ein 100µm Zellsieb überführt und verbliebene Gewebestückchen mit dem stumpfen, sterilen Kolben einer 1ml Spritze zerdrückt. Das Zellsieb wurde mit 1ml RPMI Medium mit 5% FCS (v/v) gespült. Zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen durch Zentrifugation (400g, 5 Minuten, 4°C) sedimentiert und in FACS-Puffer resuspendiert. Eine Anreicherung von Endothelzellen aus der Lunge wurde von einem Kollaborationspartner ( [REDACTED], CTH Mainz) durchgeführt. Hierzu wurde die Lunge für 30 Minuten mit Kollagenase A verdaut. Endothelzellen wurden mittels Depletion von CD45<sup>+</sup> Zellen und einer Positivselektion mit CD31 Microbeads (Miltenyi Biotec) angereichert.

#### **2.2.2.3.5 Blutplasma**

Mit einer Feindosierungsspritze wurde eine Herzpunktion zur terminalen Blutabnahme durchgeführt. Das Blut wurde direkt in 1,5ml Reaktionsgefäße mit vorgelegten 10µl 0,5M EDTA-Lösung überführt. Das Reaktionsgefäß wurde durch Klopfen gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die zellulären Bestandteile des Vollbluts wurden durch Zentrifugation (2000g, 10 Minuten, 4°C) sedimentiert. Das Blutplasma wurde vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bis zur Zytokin-Messung bei -80°C gelagert.

#### **2.2.2.3.6 Peritoneallavage**

Für die Isolation von PEMs (*Peritoneal elicited macrophages*) wurde Mäusen 1,25ml einer 3%igen (w/v) Thioglykolat-Lösung intraperitoneal gespritzt. Das Peritoneum wurde 4 Tage nach Applikation, wie unten beschrieben, lavagiert. Zur Isolation von Neutrophilen aus der Bauchhöhle wurde Mäusen in einem zeitlichen Abstand von 6 Stunden zweimal je 1ml einer 9%igen (w/v) Casein-Lösung intraperitoneal verabreicht. Die Peritoneallavage wurde am Folgetag durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse zunächst durch CO<sub>2</sub>-Exposition euthanasiert. Mit einer 26G Kanüle wurden vorsichtig 10ml kaltes PBS mit 2mM EDTA in die Bauchhöhle appliziert. Zum Verteilen der Flüssigkeit wurden die Mäuse mehrfach von Seite zu Seite gedreht und zur Aspiration der Lavage in Seitenlage positioniert. Etwa 8ml Zellsuspension konnten mithilfe einer 23G Kanüle zurückgewonnen werden. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 400g und 4°C zentrifugiert und zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie in FACS-Puffer resuspendiert.

#### **2.2.2.4 Isolierung humaner PBMCs**

Humane PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurden 10ml frisches EDTA-Blut mit 25ml PBS/EDTA (2mM) verdünnt. Die Lösung wurde in einem 50ml Plastikgefäß vorsichtig über 15ml Ficoll-Paque geschichtet. Das 50ml Gefäß wurde für 40 Minuten bei Raumtemperatur und 400g bei deaktivierter Bremse zentrifugiert. Das Blutplasma in der oberen Phase wurde abgesaugt. PBMCs in der Interphase wurden vorsichtig abgenommen und in ein neues 50ml Plastikgefäß überführt. Die PBMCs wurden mit 50ml Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Zur Entfernung von Blutplättchen wurden die PBMCs zwei weitere Male mit je 50ml Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 200g zentrifugiert. Stimulationsexperimente mit rekombinantem humanen IL-27 und Proteinphosphorylierung als Endpunkt wurden mit je  $5 \times 10^5$  PBMCs in zellabweisenden 96-well Zellkulturplatten durchgeführt.

### 2.2.3 Zellkulturtechniken

#### 2.2.3.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zelllinie L-929

Murine Fibroblasten der Zelllinie L-929 wurden für die Herstellung von L-Zell konditioniertem Medium kultiviert. Zum Auftauen eines kryokonservierten Aliquots wurde die Zellsuspension kurz bei 37°C in einem Wasserbad angetaut. Die Zellen wurden zu 50ml vorgewärmten RPMI Medium gegeben und für 5 Minuten bei 400g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in L-Zell Medium (RPMI 1640 + 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) P/S) resuspendiert. Die Fibroblasten wurden bis zur Konfluenz in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einem Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 10ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1ml Trypsin und Inkubation für 5 Minuten bei 37°C wurden die Zellen von der Plastikoberfläche abgelöst. Der Verdau wurde durch Zugabe von 9ml L-Zell Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung 1:30 bis 1:50 gesplittet oder für die Produktion von L-Zell konditioniertem Medium verwendet. Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert und in 10ml Kryokonservierungs-Medium (90% (v/v) FCS + 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 10 Kryokonservierungs-Röhrchen à 1ml verteilt und in einem Isopropanol-befüllten Mr. Frosty™ Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Kryokonservierungs-Röhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 2.2.3.2 Herstellung von L-929-Zell konditioniertem Medium

L-929 Fibroblasten sekretieren M-CSF [243]. Für die Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark wurde daher L-929-Zell konditioniertes Medium hergestellt. Hierfür wurde je 1ml L-929 Zellsuspension zu je 29ml frischem L-929-Zellmedium in 182,5cm<sup>2</sup> Produktionsflaschen hinzugefügt und die Zellkulturflaschen für 7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde der M-CSF-haltige Überstand abgenommen und steril-filtriert. Das L-929-Zell konditionierte Medium wurde entweder direkt zum Ansetzen von BMDM Medium (RPMI 1640 + 30% (v/v) L-929-Zell konditioniertes Medium + 20% (v/v) FCS + 1% (v/v) P/S) verwendet oder bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.3 Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen (BMDMs, *bone marrow-derived macrophages*)

Knochenmark wurde isoliert, wie in 2.2.2.3.2 beschrieben. Die Einzelzellsuspension einer Maus wurde auf 10 Zellkulturschalen mit je 10ml BMDM Medium aufgeteilt. Die Zellkulturschalen wurden für insgesamt 7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. An Tag 3 oder Tag 4 wurden 10ml frisches BMDM Medium je Zellkulturschale hinzugefügt. Ausdifferenzierte Makrophagen wurden an Tag 7 zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS/EDTA (0,5mM) und der Hilfe eines Zellhebers von der Plastikoberfläche der Zellkulturschalen gelöst. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert und die Zellen in frischem Makrophagen-Medium (RPMI 1640 + 0,1% (w/v) BSA) aufgenommen. Nach diesem Vorgehen konnten bis zu 1x10<sup>8</sup> BMDMs aus dem Knochenmark einer Maus gewonnen werden. Die Reinheit der Zellpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie anhand der Expression der Marker CD11b und F4/80 überprüft und betrug bei allen Experimenten ≥98%. Für Stimulationsexperimente mit Zytokin-Produktion oder RNA-Expression als Endpunkt wurden je 5x10<sup>5</sup> BMDMs in 1ml Makrophagen-Medium in 24-well Zellkulturplatten ausgesät. Vor Beginn der Stimulation wurden die Zellen für mindestens 1h in einem Inkubationsschrank inkubiert, um eine vollständige Adhärenz der Makrophagen zu gewährleisten. Stimulationsexperimente mit Proteinphosphorylierung als Endpunkt wurden mit je 5x10<sup>5</sup> BMDMs in zellabweisenden 96-well Zellkulturplatten durchgeführt.

### 2.2.3.4 Bestimmung der Zellkonzentration für Zellkulturexperimente

Zellkonzentrationen wurden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension 1:10 in Trypan-Blau verdünnt und 10µl der Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer übertragen. Je 4 Großquadrate der Zählkammer wurden unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Zellkonzentration in der Ausgangssuspension wurde unter Berücksichtigung des Mittelwerts der Großquadrate, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor wie folgt berechnet:

$$c = \text{Mittelwert}_{\text{Großquadrate}} \times 10 \times 10^4 / \text{ml}$$

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Genotypisierung von genetisch veränderten Mäusen

Der Genotyp von genetisch veränderten Mäusen wurde mittels *Polymerase chain reaction* (PCR) und einer anschließenden qualitativen Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

#### 2.2.4.1.1 Lyse muriner Ohrbiopsien

Ohrbiopsien wurden durch die zuständigen Tierpfleger entnommen und in DNase- und RNase-freien 1,5ml Reaktionsgefäßen ins Labor geliefert. Hier wurde das Gewebe durch Zugabe von 40µl Lysepuffer (25mM NaOH + 0.2mM EDTA, pH=12) und Inkubation für 20 Minuten bei 95°C aufgeschlossen. Dem Verdau wurden 40µl Neutralisationspuffer (40mM Tris-HCl, pH=5) hinzugefügt. Der Ansatz wurde gut gemischt und als DNA *template* für die Genotypisierungs-PCR verwendet. Bis zur Durchführung der PCR wurden die Proben bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.1.2 Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierungs-PCR erfolgte mithilfe des kommerziell bezogenen DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) von Thermo Fisher Scientific. Typischerweise wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt.

**Tabelle 15: PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10µl
Vorwärtsprimer [5µM]	1µl
Rückwärtsprimer [5µM]	1µl
DNA <i>template</i>	1µl
Nuklease-freies Wasser	7µl

Die genauen Sequenzen der verwendeten Primer sind Tabelle 8 zu entnehmen. Genotypisierungen auf das Cre-Transgen wurden mit einer internen Kontrolle durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde unter Berücksichtigung der Verwendung von vier Primern in einer Reaktion individuell angepasst. Die PCR erfolgte in einem Mastercycler ProS (Eppendorf) mit mindestens 35 Amplifikations-Zyklen und Primer-optimierten Annealingtemperaturen.

#### **2.2.4.1.3 Qualitative Agarose-Gelelektrophorese**

In einem 2%igen Agarose-Gel wurden PCR-Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 3,2g Agarose in 160ml 1x TAE-Puffer gelöst und für etwa 3 Minuten aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 8µl RotiSafe hinzugefügt und die Lösung luftblasenfrei in eine Gelapparatur gegossen. Ausgehärtete Gele wurden in eine mit TAE-Puffer befüllte Laufkammer überführt. Einzelne Geltaschen wurden mit je 15µl PCR-Ansatz oder 5µl einer 100bp DNA-Leiter beladen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 40 Minuten bei 140V. Die Detektion der PCR-Fragmente erfolgte mit einem Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

#### **2.2.4.2 RNA-Isolierung**

RNA wurde unter Verwendung des innuPREP RNA mini Kit 2.0 (Analytik Jena) nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach Abnahme des Überstands wurden  $5 \times 10^5$  BMDMs in 24-well Zellkulturplatten mit je 400µl Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde auf eine DNA-bindende Säule gegeben und für 2 Minuten bei 11.000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit einer äquivalenten Menge 70% (v/v) Ethanol versetzt, durch Pipettieren vermischt und auf eine RNA-bindende Säule übertragen. Die Säule wurde für 2 Minuten bei 11.000g zentrifugiert. In zwei Waschschritten wurde die Säule nacheinander mit 500µl *high-salt* Puffer und 750µl *low-salt* Puffer mit anschließender Zentrifugation gewaschen. Um verbliebenes Ethanol zu entfernen, wurde die Säule für 3 Minuten bei 11.000g zentrifugiert. Je Säule wurden 30µl Nuklease-freies Wasser hinzugefügt und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 1 Minute bei 11.000g von der Säule eluiert. RNA-Konzentration und Reinheit wurden mit einem Nano Drop 2000c (Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm bestimmt.

#### **2.2.4.3 cDNA-Synthese**

Je 400-800ng RNA wurden mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Ein Reaktionsansatz von 20µl (bestehend aus 2x Puffer, dNTPs, *random* Primern, reverser Transkriptase und RNA) wurde nach Vorgabe des Herstellers angesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Mastercycler ProS (Eppendorf) gemäß nachfolgendem Protokoll.

Tabelle 16: Protokoll der cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit
I	25°C	10min
II	37°C	120min
III	85°C	5min
IV	10°C	∞

#### 2.2.4.4 Quantitative *real-time*-PCR (qPCR)

Die cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 4-8ng/μl verdünnt. Ein 20μl Reaktionsansatz mit 2x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 2μl cDNA und je 0,5μM Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurde hergestellt. Die genauen Sequenzen der verwendeten Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die qPCR erfolgte in einem qTOWER<sup>3</sup> G (Analytik Jena) gemäß nachfolgendem Protokoll. Die relative Gen-Expression wurde unter Verwendung von *Gapdh* als *housekeeping* Gen nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet [244].

Tabelle 17: qPCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
I	95°C	180s	1
II	95°C	10s	40
III	58°C	30s	
IV	60-95°C ( $\Delta 0,5^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$ )	5s	70

#### 2.2.4.5 Transkriptom-Analyse

RNA wurde isoliert, wie in 2.2.4.2 beschrieben. RNA Konzentrationen wurden für eine höhere Genauigkeit am Paul-Klein-Zentrum für Immunintervention (PKZI) mithilfe eines Qubit® Fluorometers (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Qualität der RNA wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) bestimmt. Alle Proben wiesen eine RIN (*RNA integrity number*)  $\geq 9,7$  auf. Die Aufbereitung (mRNA-Anreicherung, Herstellung einer cDNA *library*) und Sequenzierung der Proben wurde extern von Novogene (Cambridge, UK) durchgeführt. Die Sequenzierung der cDNA-Fragmente erfolgte mit einer Leseweite von 150 Nukleotiden nach einem *paired-end* Verfahren. Die Analyse der erhaltenen Daten wurde von einer Bioinformatikerin der eigenen Arbeitsgruppe ( [REDACTED], Boston University) durchgeführt.

## 2.2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

### 2.2.5.1 Bradford-Test

Der Proteingehalt in der BALF von Mäusen nach Infektion mit *Legionella longbeachae* wurde nach dem Funktionsprinzip von Bradford [245] bestimmt. BALF-Proben wurden 1:5 mit PBS verdünnt und eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS mit einer Spannweite von 0,1mg/ml bis 1,5mg/ml wurde frisch angesetzt. In technischen Duplikaten wurden je 20µl Probe oder Standard mit je 300µl Bradford Ultra™ gemischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm mit einem Plattenleser (Opsys MR, Dynex Technologies) bestimmt. Anhand der generierten Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der BALF-Proben berechnet.

### 2.2.5.2 ELISA

Quantitative Untersuchungen sekretierter Zytokine wurden mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Kommerzielle Kits wurden dafür für IL-10, IL-12p40 und IL-27p28 von R&D Systems und für IFN $\gamma$  von Biolegend bezogen. Die Anweisungen der Hersteller zur Durchführung der ELISA wurden befolgt.

ELISA-Platten wurden zunächst über Nacht mit einem *capture* Antikörper in der angegebenen Verdünnung bei Raumtemperatur (R&D Systems) oder bei 4°C (Biolegend) inkubiert. Die Platten wurden mindestens dreimal mit je 200µl PBS+Tween® 20 (0.05% (v/v)) gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit Blockpuffer (1x PBS + 1% (w/v) BSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 100µl Probe oder Standard verdünnt in Blockpuffer hinzugefügt und die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen, wie oben beschrieben. Ein Biotinmarkierter Detektions-Antikörper wurde hinzugefügt und die Platte wurde für 2 Stunden (R&D Systems) bzw. 1 Stunde (Biolegend) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von Streptavidin-HRP für 20 Minuten (R&D Systems) oder von Avidin-HRP für 30 Minuten (Biolegend) bei Raumtemperatur. Nach einem finalen Waschschrift wurden je 100µl TMB Substratlösung hinzugefügt. Die Farbreaktion wurde nach etwa 10 bis 15 Minuten durch Zugabe von 50µl 2N Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Korrektur bei 550nm mit einem Plattenleser (Opsys MR, Dynex Technologies) bestimmt. Die Berechnung der Konzentration in den Proben erfolgte unter Verwendung der sigmoidalen Standardkurve.

### 2.2.5.3 Multiplex Immunoassay

Zur simultanen Quantifizierung von 26 Chemokinen und Zytokinen in der BALF von Mäusen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* wurde ein ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Chemokin/Zytokin-spezifische Antikörper gekoppelt an magnetische Beads wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit BALF-Proben (1:3 verdünnt) und den im Kit enthaltenen Standards inkubiert. Die 96-well Platte wurde dreimal mithilfe eines magnetischen Handwaschgeräts (Bio-Rad) gewaschen. Spezifische Detektionsantikörper wurden hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Platte dreimal gewaschen. Ein Streptavidin-PE Konjugat wurde hinzugefügt und die Platte wurde für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In drei abschließenden Waschschritten wurde ungebundenes Streptavidin-PE Konjugat entfernt. Die Beads wurden in 120µl Assay-Puffer resuspendiert und die Fluoreszenz mithilfe eines Bio-Plex™ 200 (Bio-Rad) gemessen. Die jeweiligen Chemokin- und Zytokin-Konzentrationen wurden anhand der jeweiligen Standardkurve berechnet.

### 2.2.5.4 Durchflusszytometrie

#### 2.2.5.4.1 Färbung von Oberflächenantigenen

Einzelzellsuspensionen wurden, wie oben beschrieben, hergestellt. Sämtliche FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Färbungen wurden in 96-well Platten mit V-Boden durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, erfolgte zunächst ein Fc-Rezeptorblock mit TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32, 1:50-Verdünnung) in FACS-Puffer (1x PBS + 2mM EDTA + 3% (v/v) FCS) für 15 Minuten bei 4°C. Nach Zentrifugation (650g, 3 Minuten, 4°C) wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer mit den jeweiligen Oberflächen-Antikörpern und dem Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 780 resuspendiert und für 30 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die Zellen entweder für die Messung direkt in FACS-Röhrchen überführt oder für eine spätere Messung in 4% (v/v) Formaldehyd in FACS-Puffer für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Zur Untersuchung der Oberflächenexpression von IL-27R $\alpha$  und gp130 wurden geeignete Isotyp-Kontrollen und Knockout-Kontrollen mit IL-27R $\alpha$  defizienten Zellen durchgeführt.

#### **2.2.5.4.2 Färbung von Transkriptionsfaktoren**

Intrazelluläre Färbungen von Transkriptionsfaktoren wurden mithilfe des *True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set* von Biolegend durchgeführt. Nach erfolgter Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit einer True-Nuclear™ Fixierungslösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit einem True-Nuclear™ Permeabilisierungspuffer gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellen in Permeabilisierungspuffer mit den Transkriptionsfaktor-spezifischen Antikörpern resuspendiert und für 30 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Erneut wurden die Zellen dreimal gewaschen und abschließend in FACS-Röhrchen überführt.

#### **2.2.5.4.3 Färbung von phosphorylierten Signalmolekülen**

Einzelzellsuspensionen wurden in zellabweisenden 96-well Zellkulturplatten mit rekombinantem IL-27 stimuliert, wie in den Abbildungsbeschriftungen spezifiziert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen in 96-well Platten mit V-Boden überführt, zentrifugiert (650g, 3 Minuten, 4°C) und sofort in BD Cytifix (BD Biosciences) resuspendiert. Die Fixierung erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in Methanol-haltigem BD Perm III Puffer (BD Biosciences) resuspendiert. Die 96-well Platte wurde mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei -20°C gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und ein Fc-Rezeptorblock durchgeführt. Die Zellen wurden in FACS-Puffer mit den jeweiligen Oberflächen-Antikörpern und spezifischen Phosphoprotein-Antikörpern resuspendiert und für 30 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und zur Messung in FACS-Röhrchen überführt.

#### **2.2.5.4.4 FACS-Messung und Auswertung**

Die Messung der gefärbten Zellpopulationen erfolgte mit einem BD FACS Canto II (BD Biosciences). Zellpopulationen wurden zunächst anhand ihres *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC) identifiziert und Zellduplets wurden unter Berücksichtigung von FSC-A (*area*) und FSC-H (*height*) ausgeschlossen. Zu Kompensationszwecken wurden immer eine ungefärbte Kontrolle und Einzelfärbungen der Zellen mitgeführt. Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte mithilfe von FlowJo®. Zur Quantifizierung von absoluten Zellzahlen (beispielsweise in der BALF) wurden

*Counting Beads* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Berechnung erfolgte nach Vorgaben des Herstellers.

### **2.2.6 Statistische Auswertung und grafische Darstellung**

*In vitro* Experimente wurden als mindestens drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt (sofern nicht an anderer Stelle spezifiziert), wovon ein repräsentatives Ergebnis dargestellt ist. ELISA und qPCR wurden dabei unter Verwendung von biologischen und technischen Replikaten durchgeführt. Bei *in vivo* Versuchen wurden n=3-16 Mäuse je Gruppe verwendet. Die genauen Gruppengrößen sind den jeweiligen Abbildungsbeschriftungen zu entnehmen. Alle Balkendiagramme, Dosis-Wirkungskurven und Zeitverläufe sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Box-Plots präsentieren den Median, den Interquartilenabstand und die Spannweite des Datensatzes. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 9 mittels zweiseitigem t-Test unter Annahme einer Normalverteilung bei zwei Versuchsgruppen und mittels einfacher oder zweifacher Varianzanalyse bei mehr als zwei Versuchsgruppen. Überlebensexperimente wurden mittels Log-rank Test (Mantel-Cox) analysiert. Statistische Signifikanzniveaus sind in den Abbildungen wie folgt dargestellt: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , ns: nicht signifikant.

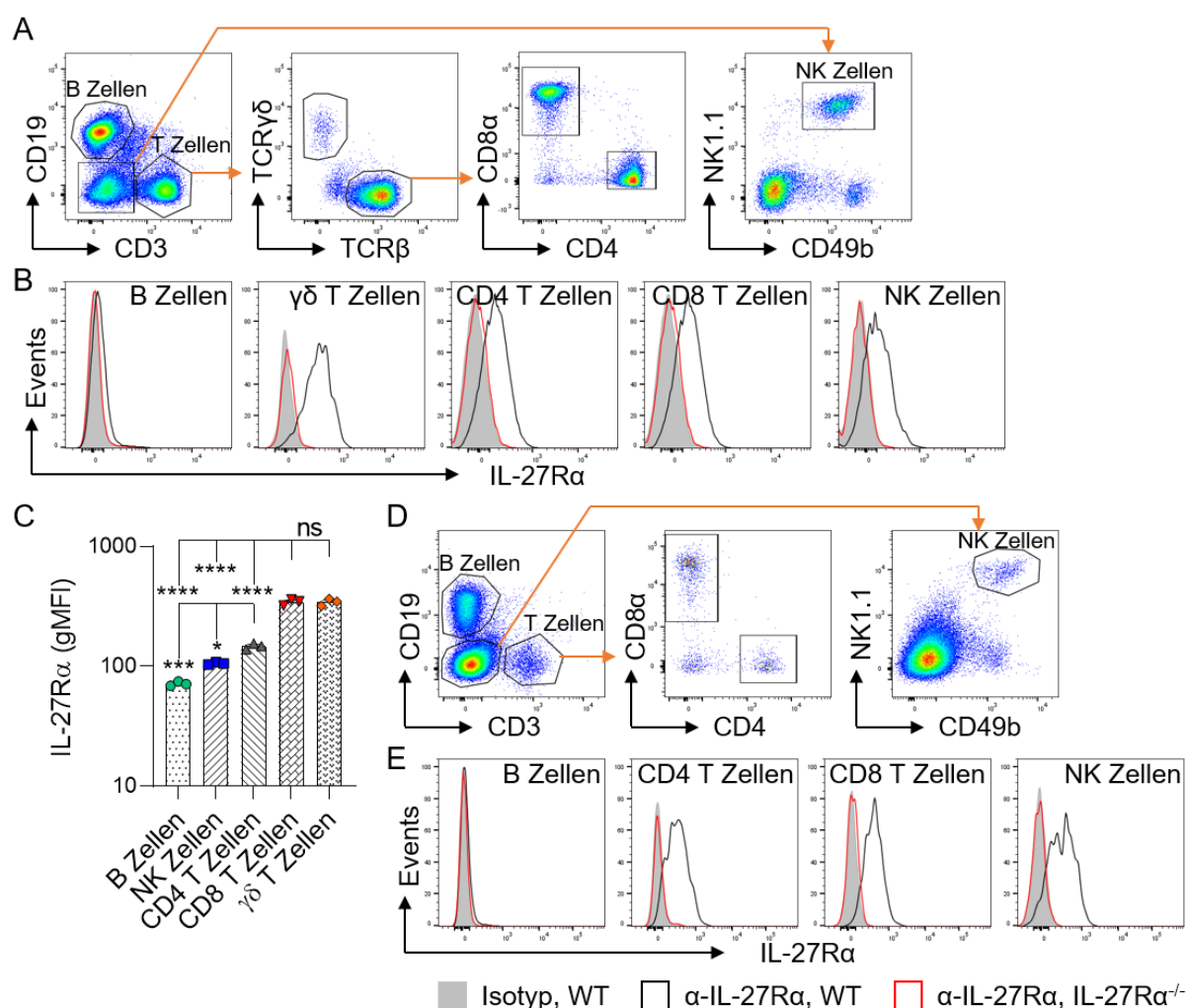
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Expression von IL-27R $\alpha$ in naiven C57BL/6 Mäusen

Im ersten Schritt wurde die Expression der spezifischen Rezeptoruntereinheit IL-27R $\alpha$  systematisch auf Immunzellen und nicht-hämatopoetischen Gewebezellen von C57BL/6 Mäusen untersucht, um herauszufinden, welche Zellpopulationen responsiv auf freigesetztes IL-27 sein können. Die Expression des Rezeptors wurde mit einem spezifischen PE-markierten Antikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mäuse mit einem globalen IL-27R $\alpha$  Knockout und Isotyp-Kontrollen wurden zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers verwendet.

#### 3.1.1 Lymphozyten in Knochenmark, Milz und peripheren Lymphknoten exprimieren IL-27R $\alpha$

Zunächst wurde die IL-27R $\alpha$  Expression auf Lymphozyten aus primären (Knochenmark) und sekundären (Milz, Lymphknoten) lymphatischen Organen untersucht. Sowohl CD49b<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK Zellen als auch CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten und CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz exprimierten IL-27R $\alpha$  (Abbildung 6A+B). Die Expression des Rezeptors war hierbei am höchsten in  $\gamma\delta$  T Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen gefolgt von CD4<sup>+</sup> T Zellen und NK Zellen (Abbildung 6C). B Zellen wiesen dagegen nur eine schwache Expression von IL-27R $\alpha$  auf. Gleichermaßen war IL-27R $\alpha$  auch auf Lymphozyten aus dem Knochenmark exprimiert (Abbildung 6D+E). NK und T Zellen wiesen eine hohe Expression des Rezeptors auf. Auf B Zellen war der Rezeptor wiederum nur schwach exprimiert.

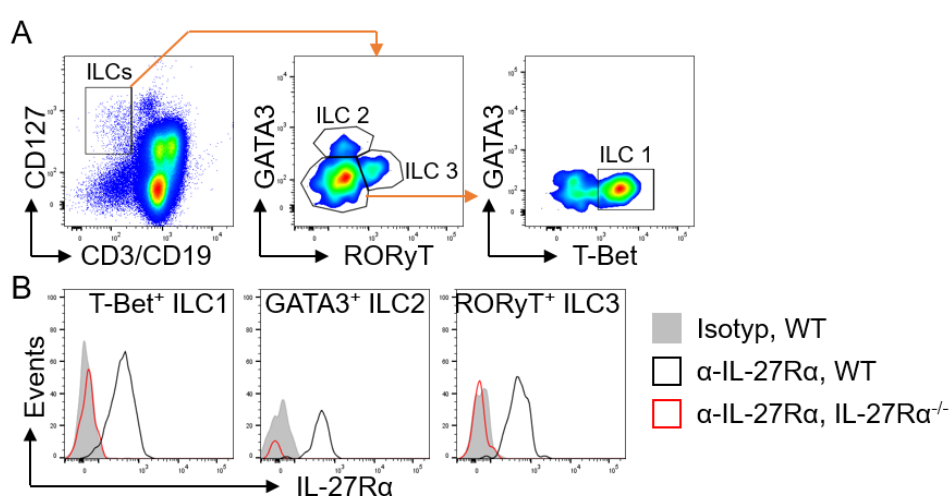


**Abbildung 6: Lymphozyten in Milz und Knochenmark von naiven C57BL/6 Mäusen exprimieren IL-27Rα.**

Milz (**A-C**) und Knochenmark (**D+E**) naiver WT und IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäuse (n=3 je Genotyp) wurden isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Die Expression von IL-27Rα wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (**A+D**) Repräsentative Gating-Strategien zur Identifizierung von B-, NK- und T-Lymphozyten in Milz und Knochenmark. (**B+E**) Repräsentative Histogramme der IL-27Rα Expression in den jeweiligen Zellpopulationen. (**C**) Quantifizierung der IL-27Rα Expression mittels *geometric mean fluorescence intensity* (gMFI). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (**C**).

\* P<0,05, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001, ns: nicht signifikant.

Die Expression von IL-27R $\alpha$  wurde im Folgenden auf murinen Lymphozyten in peripheren Lymphknoten (Leisten- und Achsellymphknoten) untersucht. Erneut wurde eine hohe Expression von IL-27R $\alpha$  auf T und NK Zellen und eine schwache Expression von IL-27R $\alpha$  auf B Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt). In den untersuchten peripheren Lymphknoten wiesen neben T und NK Zellen auch *Innate Lymphoid Cells* (ILCs) eine hohe Expression von IL-27R $\alpha$  auf (Abbildung 7A+B). IL-27R $\alpha$  wurde dabei von allen ILC-Subtypen (T-Bet $^+$  ILC1, GATA3 $^+$  ILC2, ROR $\gamma$ T $^+$  ILC3) exprimiert.

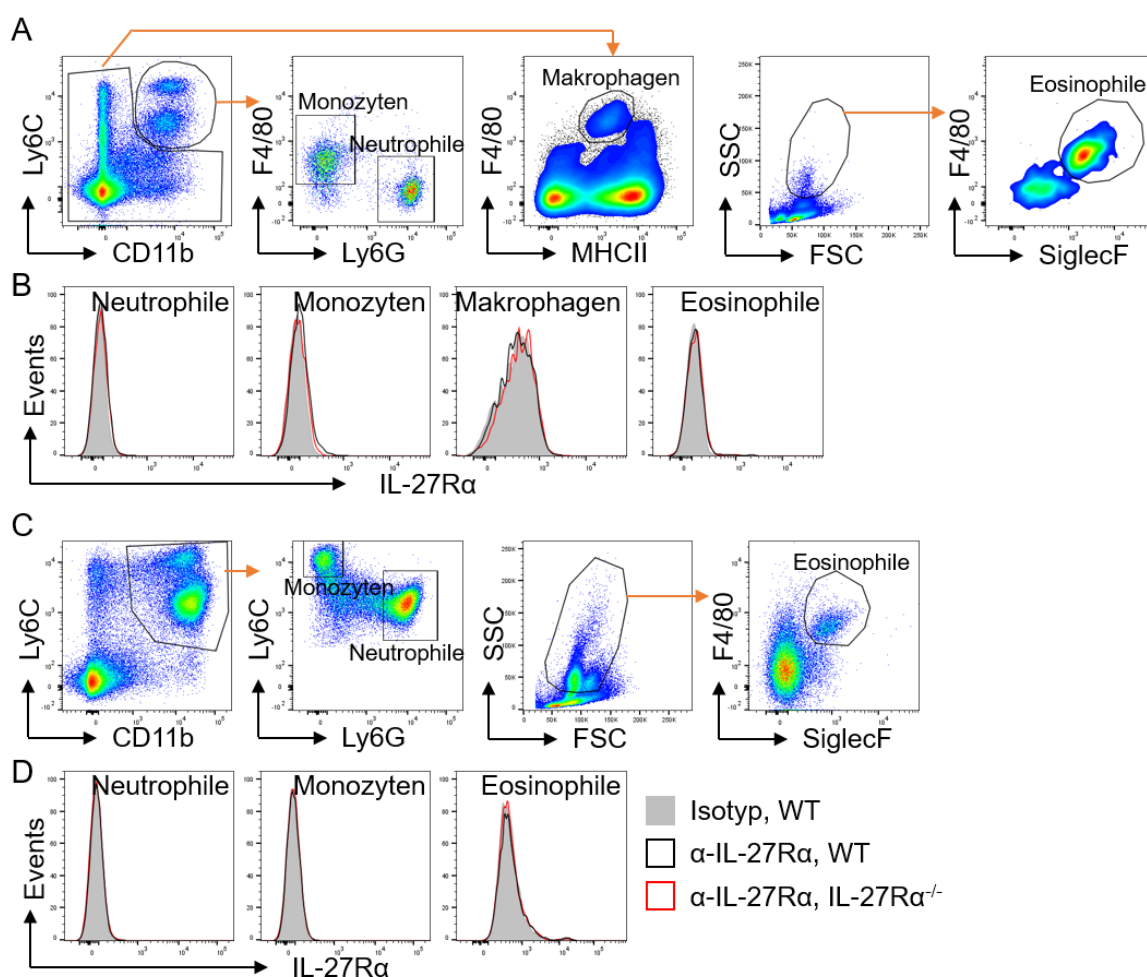


**Abbildung 7: Innate Lymphoid Cells (ILCs) in peripheren Lymphknoten exprimieren IL-27R $\alpha$ .**

Periphere Lymphknoten naiver WT und IL-27R $\alpha$  $^{-/-}$  Mäuse (n=3 je Genotyp) wurden isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Die Expression von IL-27R $\alpha$  wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung der verschiedenen ILC-Subpopulationen anhand ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren. (B) Repräsentative Histogramme der IL-27R $\alpha$  Expression in den jeweiligen Zellpopulationen.

### 3.1.2 Myeloide Zellen weisen keine/kaum detektierbare Expression von IL-27R $\alpha$ auf

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen wurde die Expression von IL-27R $\alpha$  auf myeloiden Zellen in Milz und Knochenmark untersucht. In der Milz von naiven C57BL/6 Mäusen konnte keine Expression von IL-27R $\alpha$  auf der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen oder Eosinophilen detektiert werden (Abbildung 8A+B). Ebenso zeigte eine Färbung nach vorheriger Membran-Permeabilisierung keine messbare Expression von IL-27R $\alpha$  auf intrazellulären Membranbestandteilen (Daten nicht gezeigt). Auch im Knochenmark konnte keine Expression von IL-27R $\alpha$  auf Neutrophilen, Monozyten oder Eosinophilen nachgewiesen werden (Abbildung 8C+D).

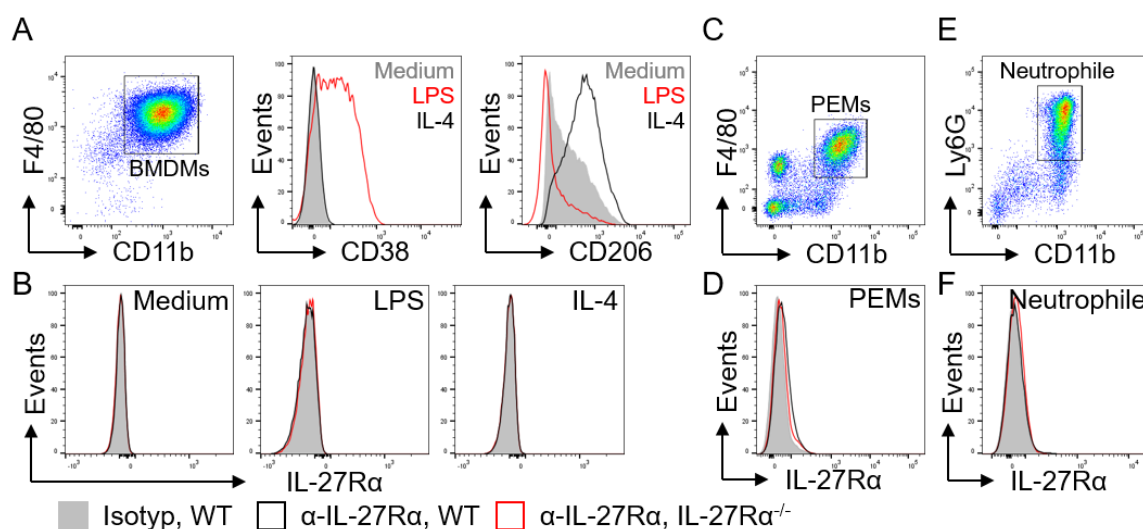


**Abbildung 8: Myeloide Zellen aus Milz und Knochenmark naiver C57BL/6 Mäuse weisen keine messbare Expression von IL-27R $\alpha$  auf.**

Milz (A+B) und Knochenmark (C+D) naiver WT und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse (n=3 je Genotyp) wurden isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Die Expression von IL-27R $\alpha$  wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A+C) Repräsentative Gating-Strategien zur Identifizierung von Monozyten, Neutrophilen, Makrophagen und Eosinophilen in Milz und Knochenmark. (B+D) Repräsentative Histogramme der fehlenden IL-27R $\alpha$  Expression in den jeweiligen Zellpopulationen.

Aufgrund der Negativbefunde in naiven C57BL/6 Mäusen wurde der Frage nachgegangen, ob eine Expression von IL-27R $\alpha$  auf der Oberfläche von Makrophagen und Neutrophilen durch inflammatorische Stimuli induziert werden kann. CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> BMDMs wurden *in vitro* für 24 Stunden entweder mit Medium, LPS oder IL-4 stimuliert, um eine Polarisierung der Makrophagen in Richtung eines proinflammatorischen (LPS) oder anti-inflammatorischen Phänotyps (IL-4) zu induzieren. Die erfolgreiche Polarisierung wurde anhand der Expression der Oberflächenmarker CD38 (M1) und CD206 (M2) überprüft (Abbildung 9A). IL-27R $\alpha$  konnte weder auf unbehandelten noch auf LPS oder IL-4 stimulierten BMDMs nachgewiesen werden (Abbildung 9B).

Die Expression von IL-27R $\alpha$  wurde weiter auf rekrutierten Makrophagen und Neutrophilen aus der Bauchhöhle von C57BL/6 Mäusen untersucht. Um Makrophagen in die Peritonealhöhle zu rekrutieren, wurde naiven C57BL/6 Mäusen eine 3%ige Thioglykolat-Lösung i.p. injiziert. *Peritoneal Elicited Macrophages* (PEMs) wurden 4 Tage nach Gabe von Thioglykolat isoliert (Abbildung 9C). PEMs wiesen eine schwache Expression von IL-27R $\alpha$  auf (Abbildung 9D). Neutrophile wurden durch zweimalige i.p. Injektion einer 9%igen Casein-Lösung in die Bauchhöhle rekrutiert (Abbildung 9E). Rekrutierte Neutrophile zeigten keine messbare Expression von IL-27R $\alpha$  (Abbildung 9F).



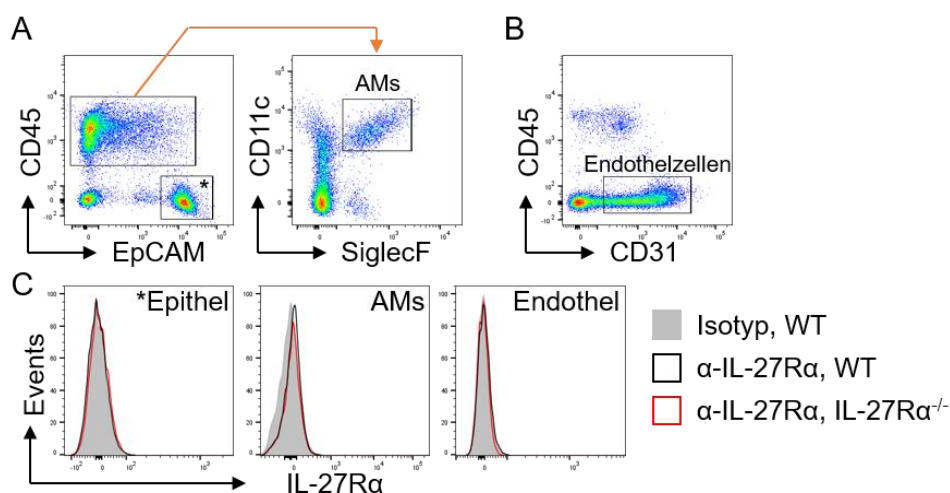
**Abbildung 9: Makrophagen aus dem Knochenmark sowie rekrutierte Peritonealmakrophagen und Neutrophile haben keine signifikante Expression von IL-27R $\alpha$ .**

(A+B) *Bone Marrow Derived Macrophages* (BMDMs) von WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen (n=3 je Genotyp) wurden für 24h mit LPS [100ng/ml], IL-4 [20ng/ml] oder Medium behandelt. Die M1/M2 Polarisierung der Makrophagen wurde anhand der Expression der Marker CD38 (M1) und CD206 (M2) überprüft und die IL-27R $\alpha$  Expression wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Plots und Histogramme zur Überprüfung von Reifegrad und Polarisierung der Makrophagen. (B) Repräsentative Histogramme der fehlenden IL-27R $\alpha$  Expression auf BMDMs. (C-F) Mittels i.p. Injektion einer 3%igen Thioglykolat-Lösung (C+D) oder mittels zweimaliger i.p. Injektion einer 9%igen Casein-Lösung (E+F) in WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse (n=3 je Genotyp) wurden Makrophagen (C+D) oder Neutrophile (E+F) in die Bauchhöhle der Tiere rekrutiert. Eine Peritoneallavage wurde durchgeführt und die Expression von IL-27R $\alpha$  wurde mittels Durchflusszytometrie auf den rekrutierten Immunzellen untersucht. (C+E) Repräsentative Gating-Strategien zur Identifizierung von *Peritoneal Elicited Macrophages* (PEMs, C) und Neutrophilen (E). (D+F) Repräsentative Histogramme der IL-27R $\alpha$  Expression in den jeweiligen Zellpopulationen.

### 3.1.3 IL-27R $\alpha$ wird auf Lungenepithel- und Lungenendothelzellen von unbehandelten C57BL/6 Mäusen nicht exprimiert

Im Weiteren wurde die Expression von IL-27R $\alpha$  auf Epithel- und Endothelzellen aus der Lunge von naiven C57BL/6 Mäusen untersucht. Ebenso wurde die Expression auf Alveolarmakrophagen als ortsständige Immunzellen mit direktem Kontakt zur Außenwelt betrachtet.

Naive Lungen wurden enzymatisch verdaut. Lungen-Epithelzellen (Pneumozyten) wurden anhand der Expression des *Epithelial cell adhesion molecules* (EpCAM) identifiziert (Abbildung 10A). Alveolarmakrophagen wurden anhand der Expression der Oberflächenmarker SiglecF und CD11c identifiziert. CD31<sup>+</sup> Endothelzellen wurden zusätzlich mit magnetischen CD31 Microbeads angereichert (Abbildung 10B). Weder auf Epithel- und Endothelzellen noch auf Alveolarmakrophagen konnte IL-27R $\alpha$  detektiert werden (Abbildung 10C).



**Abbildung 10: In den Lungen von naiven C57BL/6 Mäusen ist IL-27R $\alpha$  weder auf Epithel- oder Endothelzellen noch auf Alveolarmakrophagen exprimiert.**

(A+B) Lungen naiver WT und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse wurden für 30 Minuten mit Dispase (A, n=3 je Genotyp) oder Kollagenase A (B, n=2 je Genotyp) verdaut. Die Expression von IL-27R $\alpha$  wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen (AMs). (B) Repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung von Endothelzellen. Endothelzellen wurden zuvor mittels Depletion von CD45<sup>+</sup> Zellen und einer Positivselektion mit CD31 *Microbeads* angereichert. (C) Repräsentative Histogramme der IL-27R $\alpha$  Expression in den jeweiligen Zellpopulationen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass alle untersuchten Lymphozyten-Populationen in primären und sekundären lymphatischen Organen IL-27R $\alpha$  auf ihrer Oberfläche exprimierten. Insbesondere T und NK Zellen sowie ILCs zeigten eine hohe Expression des Rezeptors. Dagegen wiesen die untersuchten myeloiden Zellpopulationen keine IL-27R $\alpha$  Expression unter homöostatischen Bedingungen auf. Bakteriell LPS konnte IL-27R $\alpha$  auf primären Makrophagen *in vitro* nicht induzieren. Lediglich nach Thioglykolat-Injektion konnte eine geringfügige IL-27R $\alpha$  Expression auf rekrutierten PEMs nachgewiesen werden. In der Lunge von naiven C57BL/6 Mäusen konnte IL-27R $\alpha$  weder auf Epithel- und Endothelzellen noch auf ortsständigen Alveolarmakrophagen detektiert werden.

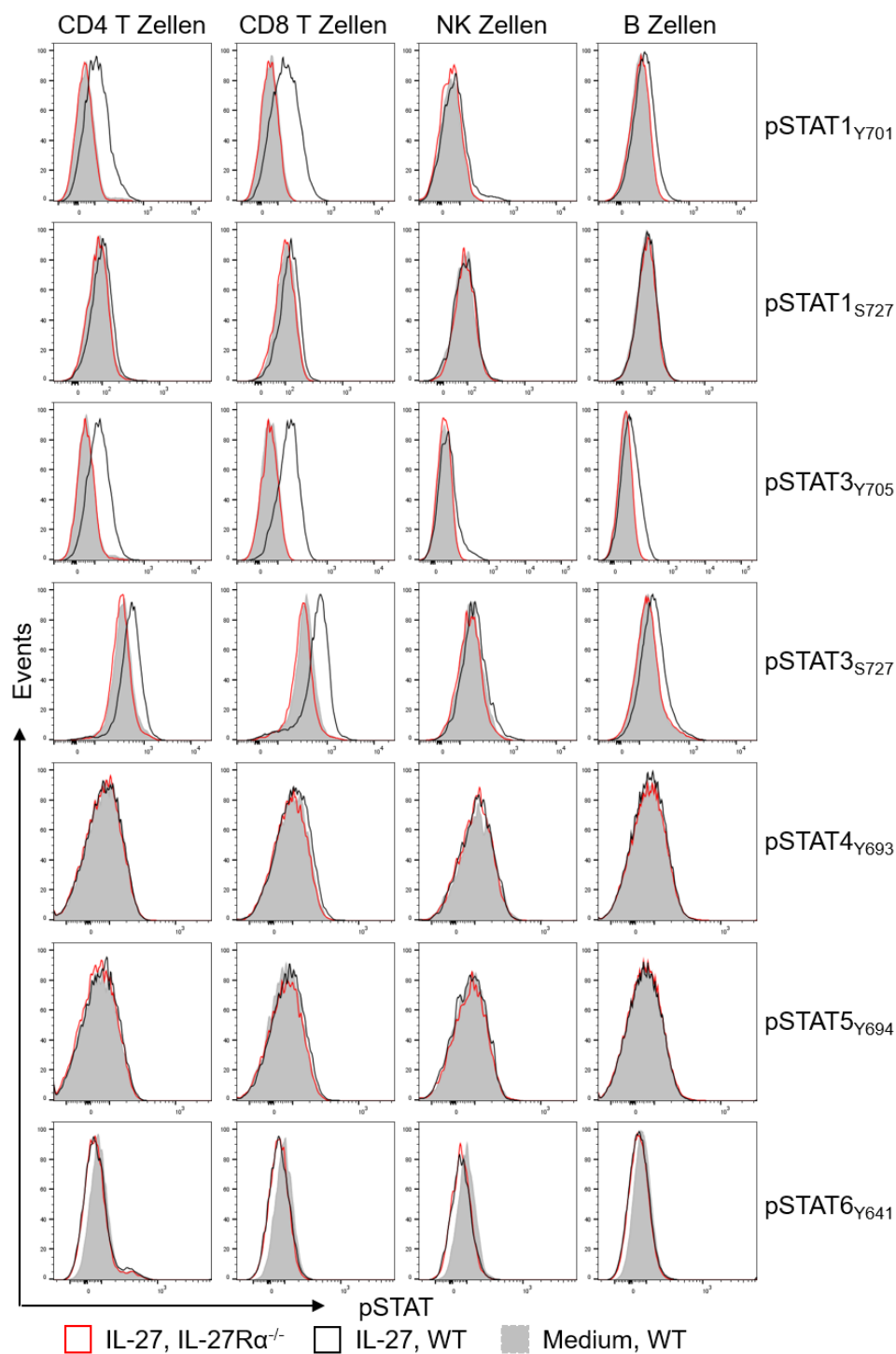
## 3.2 Zellspezifische Untersuchungen von IL-27 induzierten Signalwegen

Obwohl bereits verschiedene IL-27 induzierte Signalwege bekannt sind, bleibt bislang ungeklärt, wie eine Induktion dieser Signalwege zu derart vielseitigen Immunantworten führen kann [7, 32]. Eine mögliche Erklärung bietet die Überlegung, dass den verschiedenen intrazellulären Signalwegen eine Zellspezifität zugrunde liegt. Im Folgenden wurde daher eine zellspezifische Untersuchung von IL-27 induzierten Signalwegen durchgeführt. Die Phosphorylierung zahlreicher Signalmoleküle wurde nach IL-27 Stimulation mittels Durchflusszytometrie mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Unstimulierte Kontrollzellen und Mäuse mit einer globalen IL-27R $\alpha$  Defizienz wurden zum Nachweis der Spezifität der Antikörper verwendet.

### 3.2.1 IL-27 induziert STAT1- und STAT3-Signalwege in T Zellen

Da die IL-27R $\alpha$  Expression in naiven C57BL/6 Mäusen, wie oben beschrieben, auf Immunzellen der lymphozytären Linie begrenzt ist, wurden zunächst Phosphorylierungen verschiedener Signalproteine in T, NK und B Zellen nach IL-27 Stimulation untersucht.

Splenozyten wurden *in vitro* für 45 Minuten mit rekombinatem murinen IL-27 stimuliert. In CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen induzierte IL-27 eine starke Phosphorylierung der funktionell relevanten Phosphorylierungsstellen Tyrosin 701 (Y701) und 705 (Y705) von STAT1 und STAT3 (Abbildung 11). Zudem induzierte IL-27 die Phosphorylierung von Serin 727 (S727) bei STAT3 in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen. Auch in B Zellen konnte eine Phosphorylierung von STAT1<sub>Y701</sub>, STAT3<sub>Y705</sub> und STAT3<sub>S727</sub> nach IL-27 Stimulation beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der deutlich geringeren IL-27R $\alpha$  Expression in B Zellen im Vergleich zu T Zellen (siehe Abbildung 6B+C) war auch das Ausmaß der Phosphorylierungen in B Zellen erheblich vermindert. Trotz hoher Expression der Zytokin-spezifischen Rezeptoruntereinheit IL-27R $\alpha$  auf NK Zellen wurde nur eine sehr eingeschränkte Responsivität beobachtet. IL-27 induzierte lediglich bei einem geringen Anteil an NK Zellen eine Phosphorylierung von STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub>. Der überwiegende Anteil der NK Zellen zeigte sich dagegen nicht responsiv hinsichtlich STAT-Phosphorylierung. Bei allen weiteren betrachteten STAT-Phosphorylierungsstellen (STAT1<sub>S727</sub>, STAT4<sub>Y693</sub>, STAT5<sub>Y694</sub>, STAT6<sub>Y641</sub>) konnte in keiner der untersuchten Zellpopulationen eine nennenswerte Induktion einer Phosphorylierung durch IL-27 beobachtet werden.

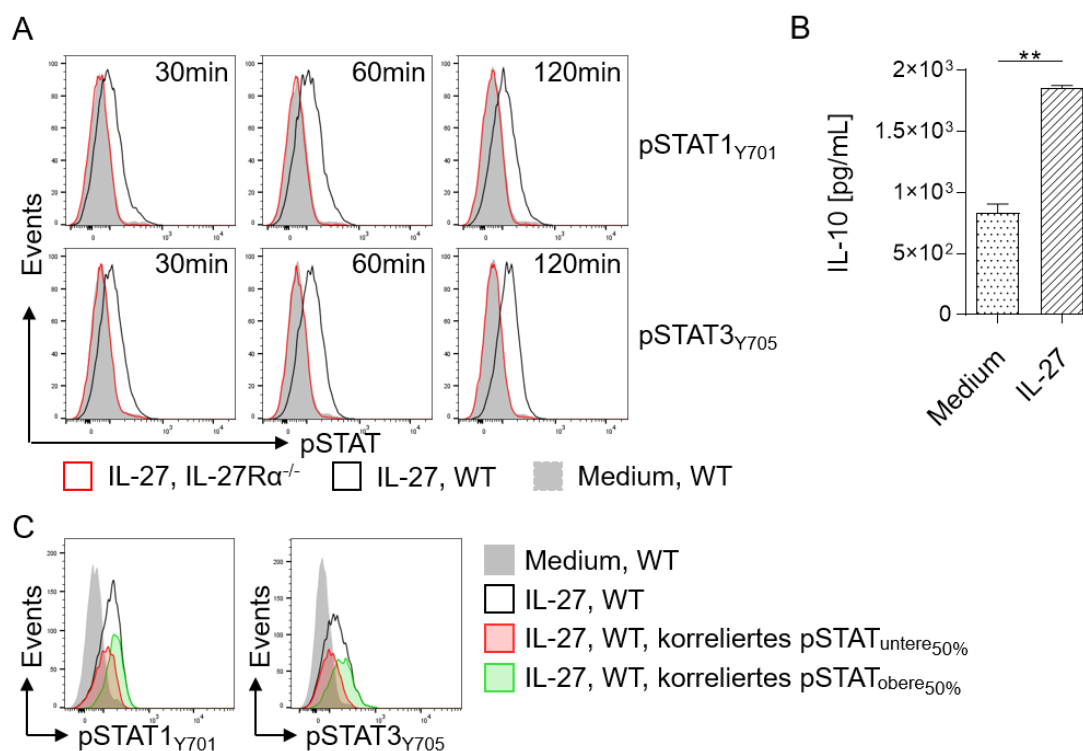


**Abbildung 11: IL-27 induziert eine robuste STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen.**

Die Milz naiver WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse (n=3 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Isolierte Splenozyten wurden für 45 Minuten *in vitro* mit rekombinantem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und verschiedene STAT-Phosphorylierungsstellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen (TCR $\beta^+$ ) sowie für NK (NK1.1<sup>+</sup>) und B Zellen (CD19<sup>+</sup>) sind dargestellt. STAT: *Signal transducer and activator of transcription*.

Im Weiteren wurde der zeitliche Verlauf der IL-27 vermittelten Phosphorylierung von STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub> untersucht. In T Zellen aus der Milz war die IL-27 induzierte STAT-Phosphorylierung über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden stabil. Repräsentative Histogramme für die angegebenen Zeitpunkte sind exemplarisch für CD4<sup>+</sup> T Zellen dargestellt (Abbildung 12A). Darüber hinaus wurde die IL-10 Konzentration in Kulturüberständen 60 Stunden nach  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Stimulation von T Zellen aus der Milz in An- und Abwesenheit von IL-27 untersucht [84]. In Anwesenheit von IL-27 war die IL-10 Konzentration signifikant erhöht (Abbildung 12B). Ebenso wurde der Frage nachgegangen, ob die Induktion der STAT1- und STAT3-Signalwege in T Zellen durch IL-27 gemeinsam oder selektiv erfolgt. In einer STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub> Doppelfärbung konnte in CD4<sup>+</sup> T Zellen nachgewiesen werden, dass eine starke Phosphorylierung von STAT1<sub>Y701</sub> mit einer starken Phosphorylierung von STAT3<sub>Y705</sub> korrelierte (Abbildung 12C). Ebenso korrelierte eine schwache STAT1<sub>Y701</sub> Phosphorylierung mit einer schwachen Phosphorylierung von STAT3<sub>Y705</sub>.

Neben der IL-27 Responsivität von Lymphozyten aus der Milz wurden auch die IL-27 induzierten STAT-Phosphorylierungen von Lymphozyten aus dem Knochenmark analysiert. Auch hier zeigten insbesondere CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen eine deutliche STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub> Phosphorylierung nach IL-27 Stimulation (Daten nicht gezeigt).



### Abbildung 12: Kinetik, Konsequenz und Korrelation von IL-27 induzierten STAT-Phosphorylierungen in T Zellen.

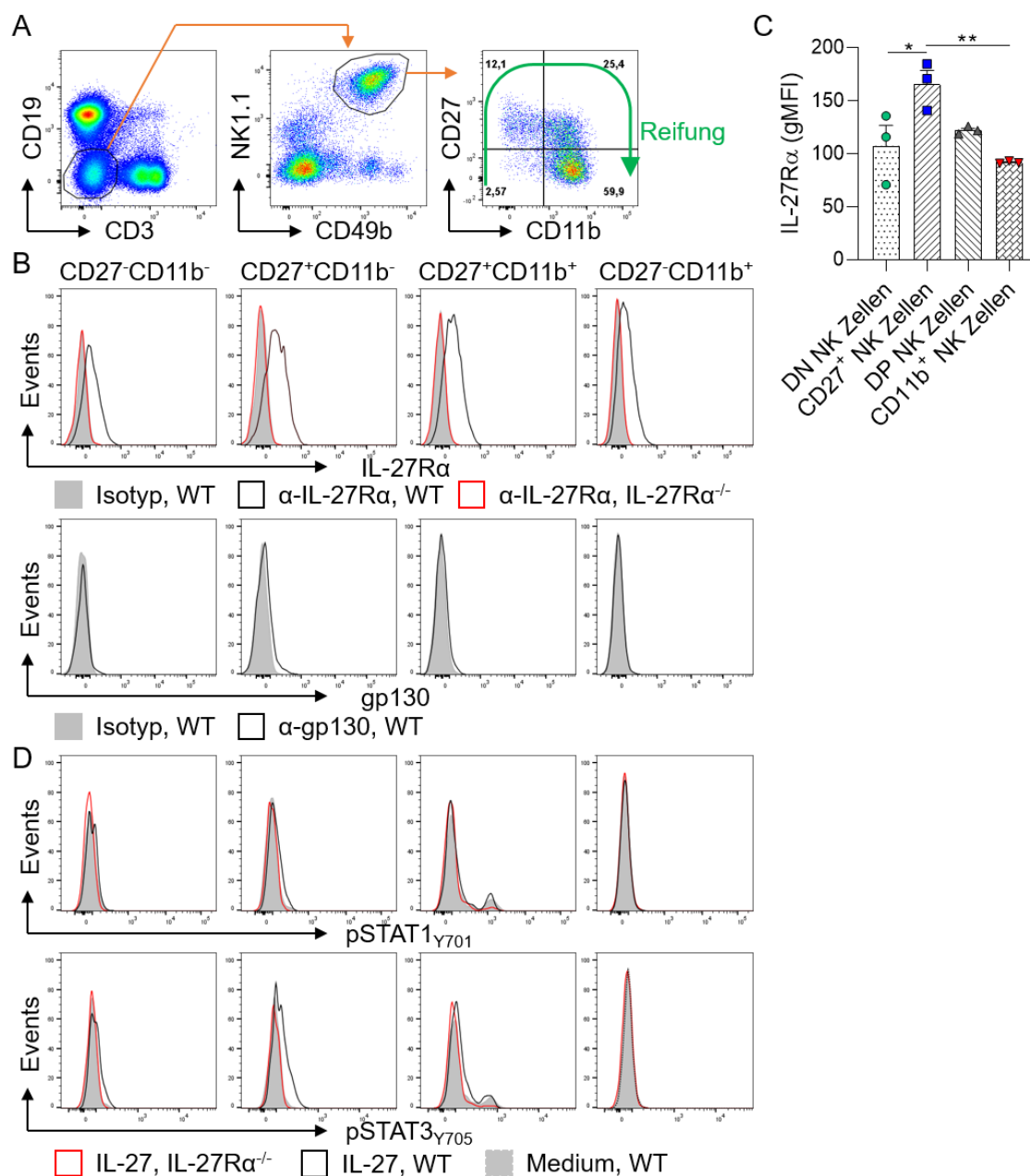
Die Milz naiver WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse (n=3 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. **(A)** Isolierte Splenozyten wurden für die angegebenen Zeiträume *in vitro* mit rekombinatem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme für die beiden Phosphorylierungen zu den jeweiligen Zeitpunkten sind dargestellt. CD4<sup>+</sup> T Zellen von IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen und unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrollen **(B)** WT Splenozyten wurden für 60h mit plattengebundenem  $\alpha$ -CD3 [2 $\mu$ g/ml] und gelöstem  $\alpha$ -CD28 [2 $\mu$ g/ml] in An- und Abwesenheit von 20ng/ml IL-27 stimuliert. Die IL-10 Konzentration in zellfreiem Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen ist dargestellt. **(C)** WT Splenozyten wurden für 45 Minuten *in vitro* mit rekombinatem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die 50% CD4<sup>+</sup> T Zellen mit der stärksten bzw. der schwächsten STAT1-Phosphorylierung wurden bezüglich ihrer STAT3-Phosphorylierung analysiert und umgekehrt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test **(B)**. \*\* P<0,01.

### 3.2.2 In NK Zellen von naiven C57BL/6 Mäusen induziert IL-27 nur in unreifen CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3

Aufgrund der geringen STAT-Phosphorylierung in NK Zellen nach IL-27 Stimulation (siehe [Abbildung 11](#)) wurde die IL-27 Responsivität einzelner Subpopulationen genauer analysiert. Murine NK Zellen lassen sich anhand der Expression der Oberflächenmarker CD27 und CD11b in vier Reifestadien einteilen [246]. Unreife doppelt-negative CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> NK Zellen durchlaufen während ihrer Reifung zunächst ein CD27<sup>+</sup> und später ein doppelt-positives CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Stadium. Reife NK Zellen sind dagegen CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>.

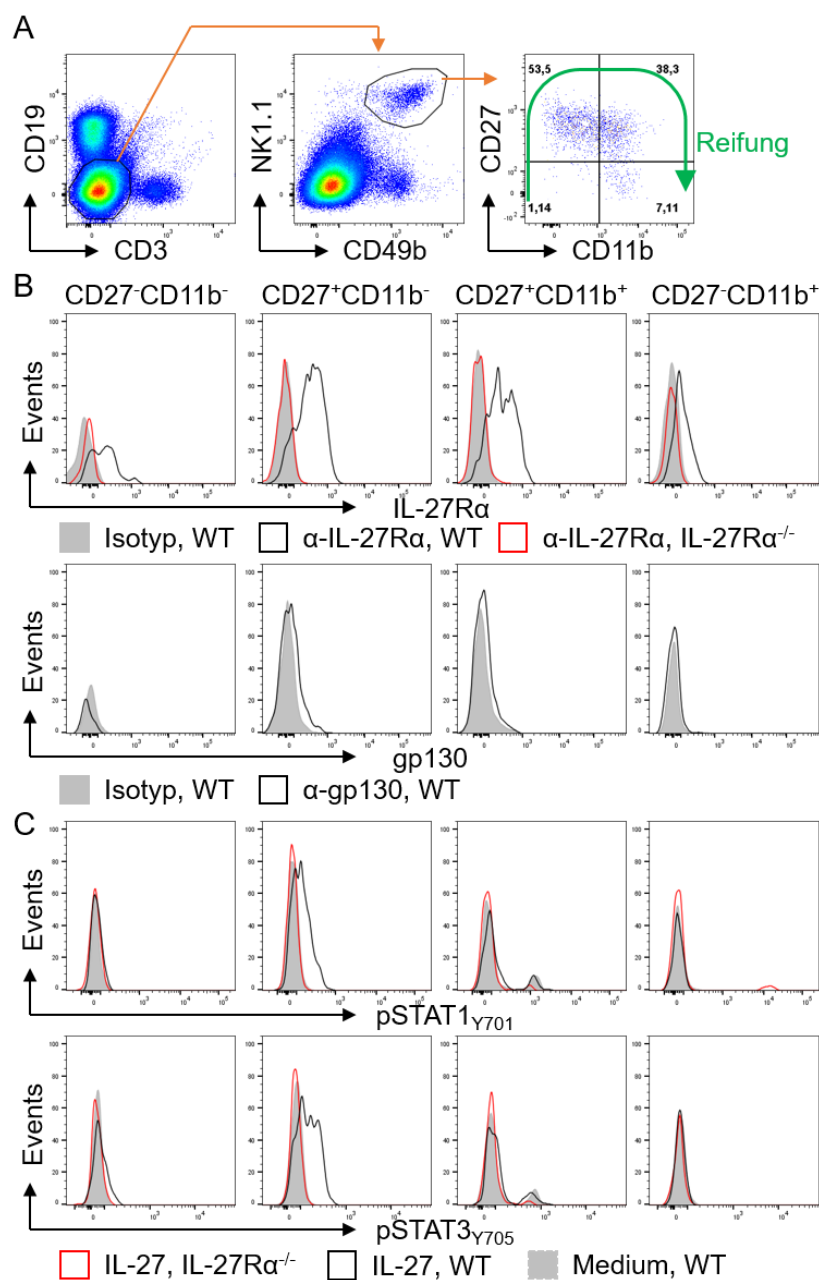
NK Zellen aus der Milz wiesen zu etwa 60% einen reifen CD11b<sup>+</sup> Phänotyp auf ([Abbildung 13A](#)). Unabhängig vom Reifegrad exprimierten alle NK Zellen die Zytokin-spezifische Rezeptoruntereinheit IL-27R $\alpha$  auf ihrer Oberfläche ([Abbildung 13B](#)). Die Expression war hierbei am höchsten in unreifen CD27<sup>+</sup> NK Zellen ([Abbildung 13C](#)). Reife CD11b<sup>+</sup> NK Zellen exprimierten signifikant weniger IL-27R $\alpha$ . Die zweite Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 (gp130) wurde dagegen ausschließlich auf unreifen CD27<sup>+</sup> NK Zellen exprimiert ([Abbildung 13B](#)). Als Konsequenz induzierte IL-27 nur in CD27<sup>+</sup> NK Zellen STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub> Phosphorylierung ([Abbildung 13D](#)). NK Zellen aller anderen Reifestadien, insbesondere die quantitativ größte Subpopulation der reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellen, zeigten dagegen keine STAT-Phosphorylierung nach IL-27 Stimulation.

In gleicher Weise wurden NK Zellen aus dem Knochenmark analysiert. Im Unterschied zur Milz wiesen im Knochenmark mehr als 50% der NK Zellen einen unreifen CD27<sup>+</sup> Phänotyp auf ([Abbildung 14A](#)). Unabhängig vom Reifegrad exprimierten alle NK Zellen IL-27R $\alpha$  auf ihrer Oberfläche ([Abbildung 14B](#)). Die Expression von gp130 war erneut nur auf CD27<sup>+</sup> NK Zellen detektierbar. CD27<sup>+</sup> NK Zellen zeigten eine deutliche Phosphorylierung von STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub> nach IL-27 Stimulation ([Abbildung 14C](#)). In den übrigen NK Zellpopulationen induzierte IL-27 keine nennenswerte STAT-Phosphorylierung.



**Abbildung 13: Reife CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> NK Zellen aus der Milz naiver C57BL/6 Mäuse zeigen keine STAT1- und STAT3-Phosphorylierung nach IL-27 Stimulation.**

Die Milz naiver WT und IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäuse (n=3 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. (A-C) Die Expression der beiden Rezeptoruntereinheiten IL-27Rα und gp130 während verschiedener Reifungsstadien der NK Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Gating-Strategie zur Unterscheidung von vier NK Zell Reifungsstadien anhand der Expression der Marker CD27 und CD11b. (B) Repräsentative Histogramme der Expression von IL-27Rα und gp130. (C) Quantifizierung der IL-27Rα Expression während der NK Zellreifung mittels gMFI. (D) Isolierte Splenozyten wurden für 45 Minuten *in vitro* mit rekombinantem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in den NK Zell-Subpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der STAT1- und STAT3-Phosphorylierung sind dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (C). \* P<0,05, \*\* P<0,01, DN: CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> doppelt-negative Zellen, DP: CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> doppelt-positive Zellen.



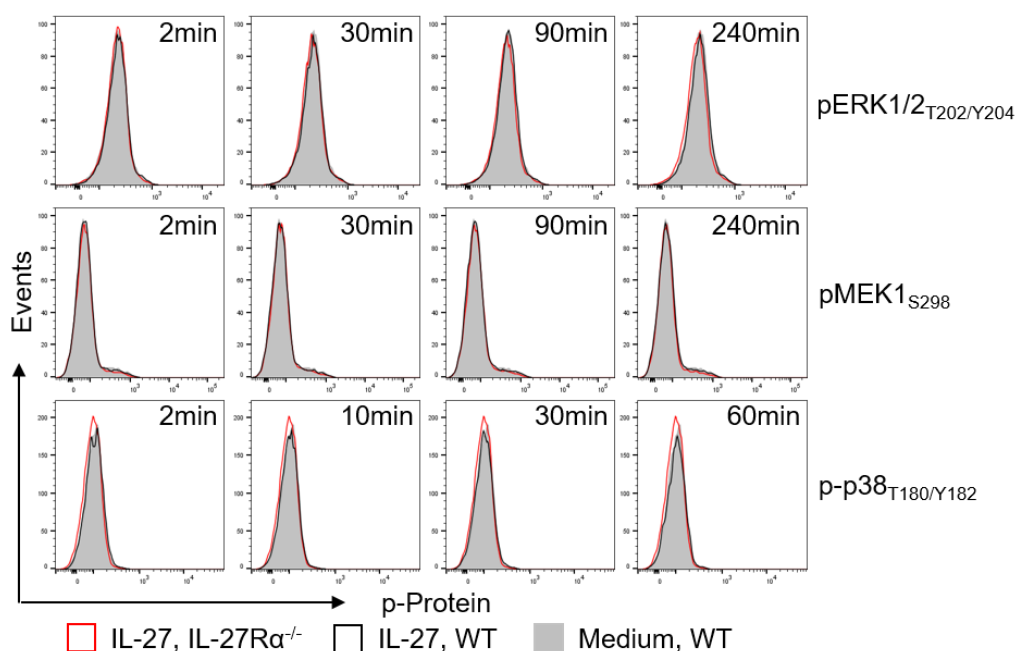
**Abbildung 14: In NK Zellen aus dem Knochenmark naiver C57BL/6 Mäuse induziert IL-27 nur in unreifen CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> NK Zellen STAT1- und STAT3-Phosphorylierungen.**

Das Knochenmark naiver WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse (n=3 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. (A+B) Die Expression der beiden Rezeptoruntereinheiten IL-27R $\alpha$  und gp130 während verschiedener Reifungsstadien der NK Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Gating-Strategie zur Unterscheidung von vier NK Zell Reifungsstadien anhand der Expression der Marker CD27 und CD11b. (B) Repräsentative Histogramme der Expression von IL-27R $\alpha$  und gp130. (C) Isolierte Knochenmarkszellen wurden für 45 Minuten *in vitro* mit rekombinatem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in den NK Zell-Subpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der STAT1- und STAT3-Phosphorylierung sind dargestellt.

### 3.2.3 IL-27 induziert keine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, MEK1 und p38 oder der Proteinkinase B (AKT)

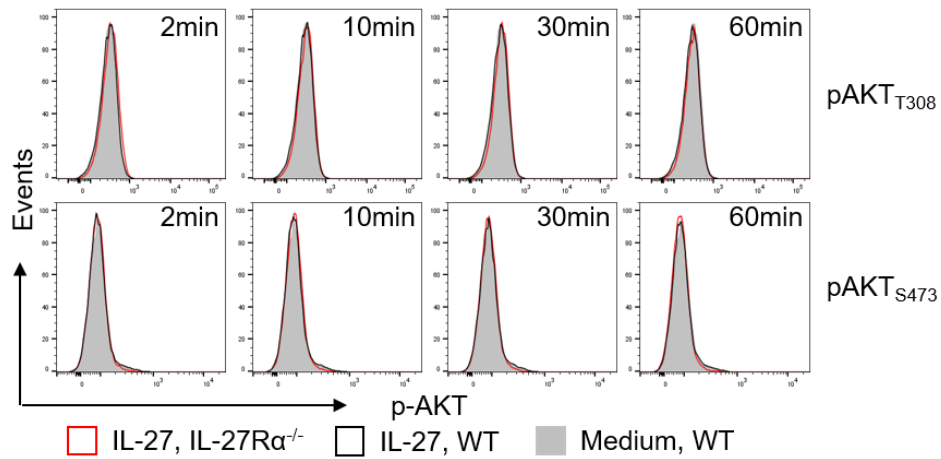
Neben der Aktivierung von STAT-Signalwegen wurde auch eine Induktion verschiedener MAP (*Mitogen-activated protein*)-Kinasen sowie der Proteinkinase B (AKT) durch IL-27 untersucht.

Splenozyten wurden *in vitro* für einen Zeitraum von 2 Minuten bis zu 4 Stunden mit rekombinantem murinen IL-27 stimuliert. Weder in B-, NK- noch T-Lymphozyten konnte IL-27 eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, MEK1 oder p38 an ihren charakteristischen Aktivierungsstellen induzieren. Repräsentative Histogramme für die Phosphorylierung der jeweiligen MAP-Kinase zu den angegebenen Zeitpunkten sind exemplarisch für CD4<sup>+</sup> T Zellen dargestellt (Abbildung 15). Ebenso induzierte IL-27 keine Phosphorylierung von AKT in B-, NK- oder T-Lymphozyten. Repräsentative Histogramme der beiden Phosphorylierungsstellen AKT<sub>T308</sub> und AKT<sub>S473</sub> sind erneut exemplarisch für CD4<sup>+</sup> T Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt (Abbildung 16).



**Abbildung 15: IL-27 induziert keine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, MEK1 und p38 in naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen.**

Die Milz naiver WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse (n=2 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Isolierte Splenozyten wurden für die angegebenen Zeiträume *in vitro* mit rekombinantem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die Phosphorylierungsstellen der jeweiligen MAP-Kinasen wurden mittels Durchflusszytometrie in CD4<sup>+</sup> T Zellen untersucht. Repräsentative Histogramme der entsprechenden Protein-phosphorylierungen sind dargestellt.

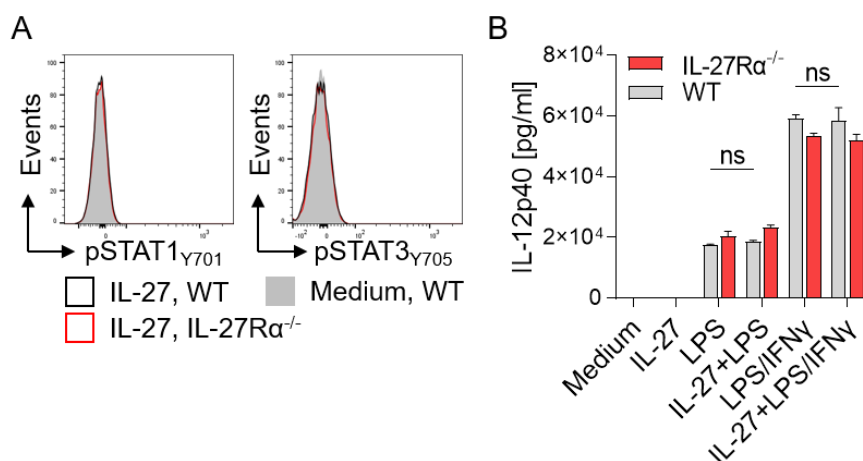


**Abbildung 16: IL-27 induziert keine AKT-Phosphorylierung in naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen.**

Die Milz naiver WT und IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäuse (n=2 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Isolierte Splenozyten wurden für die angegebenen Zeiträume *in vitro* mit rekombinantem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die beiden AKT-Phosphorylierungsstellen wurden mittels Durchflusszytometrie in CD4<sup>+</sup> T Zellen untersucht. Repräsentative Histogramme der entsprechenden Phosphorylierungen sind dargestellt.

### 3.2.4 BMDMs sind nicht responsiv auf eine IL-27 Stimulation

Im Weiteren wurde die IL-27 Responsivität von primären Makrophagen aus C57BL/6 Mäusen untersucht. BMDMs wurden *in vitro* für 45 Minuten mit rekombinantem murinen IL-27 stimuliert. In Übereinstimmung mit der Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  Expression (siehe [Abbildung 9B](#)) konnte IL-27 weder eine Phosphorylierung von STAT1 $_{Y701}$  noch von STAT3 $_{Y705}$  induzieren ([Abbildung 17A](#)). Als zusätzlicher Endpunkt wurde die Konzentration von IL-12p40 in Kulturüberständen 24 Stunden nach Stimulation mit LPS oder LPS/IFN $\gamma$  in An- und Abwesenheit von IL-27 untersucht [45]. Die Anwesenheit von IL-27 hatte keinerlei Einfluss auf die freigesetzte IL-12p40 Menge ([Abbildung 17B](#)). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und IL-27R $\alpha$  defizienten BMDMs.

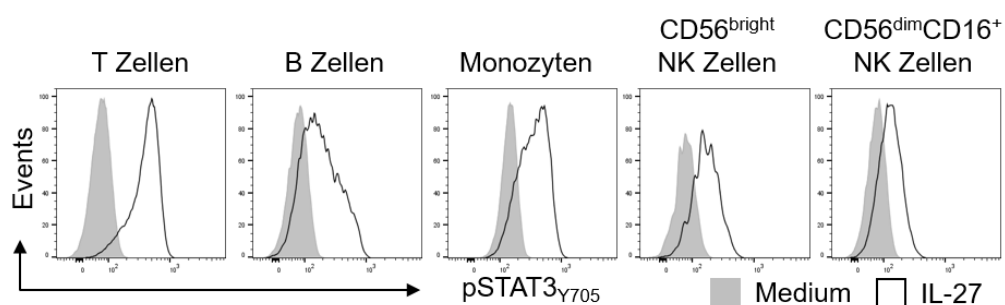


#### Abbildung 17: BMDMs sind nicht responsiv auf eine IL-27 Stimulation.

(**A**) BMDMs von WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen ( $n=3$  je Genotyp) wurden für 45 Minuten *in vitro* mit rekombinantem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der jeweiligen STAT-Phosphorylierung sind dargestellt. (**B**) BMDMs von WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen wurden für 24h mit Medium, LPS [100ng/ml] oder LPS [100ng/ml] und IFN $\gamma$  [20ng/ml] in An- oder Abwesenheit von 10ng/ml IL-27 inkubiert. Die Konzentration von IL-12p40 in zellfreiem Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen ist dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (**B**). ns: nicht signifikant.

### 3.2.5 Humane PBMCs sind IL-27 responsiv

Abschließend wurde die IL-27 Responsivität von humanen Immunzellen überprüft. *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) eines gesunden männlichen Spenders wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und *in vitro* für 30 Minuten mit rekombinantem humanen IL-27 stimuliert. Sowohl in allen Lymphozyten-Populationen (T Zellen, B Zellen, CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK Zellen) als auch in CD16<sup>+</sup> Monozyten induzierte IL-27 STAT3<sub>Y705</sub> Phosphorylierung (Abbildung 18).



**Abbildung 18: IL-27 induziert eine robuste STAT3-Phosphorylierung in humanen PBMCs.**

*Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) eines gesunden männlichen Blutspenders wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Isolierte PBMCs wurden für 30 Minuten *in vitro* mit rekombinantem humanen IL-27 [20ng/ml] stimuliert und die STAT3-Phosphorylierung in T- und B-Lymphozyten, in Monozyten sowie in CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der STAT3-Phosphorylierung sind dargestellt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass IL-27 in naiven T Zellen aus C57BL/6 Mäusen erwartungsgemäß eine robuste Aktivierung von STAT1- und STAT3-Signalwegen induzierte. Die Aktivierung der T Zellen in Anwesenheit von IL-27 resultierte dabei in einer signifikant erhöhten IL-10 Produktion. Weder eine Aktivierung von MAP-Kinasen noch von Proteinkinase B durch IL-27 konnte beobachtet werden. Im Unterschied zu T Zellen war die IL-27 Responsivität von naiven NK Zellen abhängig vom Reifegrad der Zellen. Nur in CD27<sup>+</sup> NK Zellen konnte IL-27 eine STAT1- und STAT3-Phosphorylierung induzieren. Primäre murine Makrophagen wiesen keine IL-27 Responsivität auf. In humanen PBMCs konnte IL-27 dagegen zusätzlich zu den verschiedenen Lymphozyten-Populationen auch in Monozyten eine Phosphorylierung von STAT3<sub>Y705</sub> induzieren.

### 3.3 Etablierung eines murinen Modells der Legionellose zur Untersuchung von IL-27 vermittelten Effekten

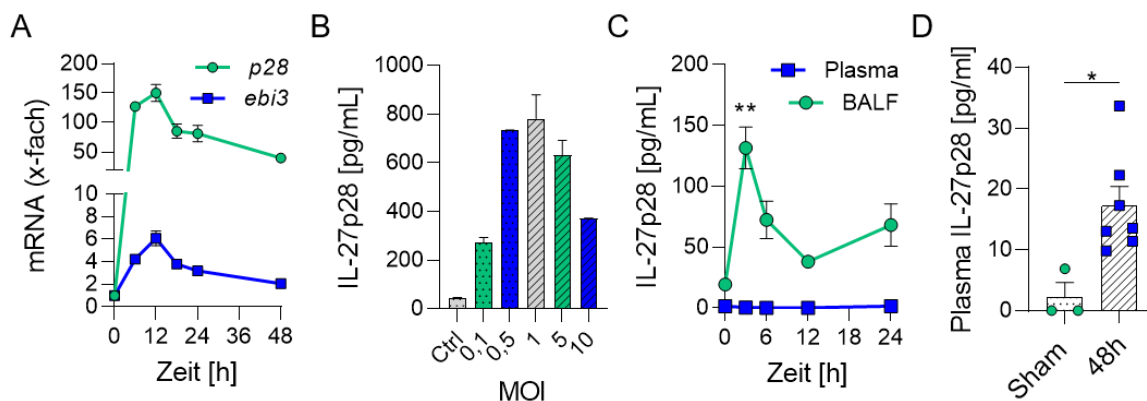
*Legionella pneumophila* sind gramnegative fakultativ intrazelluläre Bakterien [157]. In den Lungen von Infizierten können sie in Alveolarmakrophagen replizieren und die Krankheitsbilder der Legionärskrankheit oder des Pontiac-Fiebers hervorrufen [160]. Die Beteiligung von IL-27 im Rahmen der Immunantwort einer Legionellen-Infektion ist weitgehend ungeklärt.

#### 3.3.1 *Legionella pneumophila* induziert IL-27 Expression *in vitro* und *in vivo*

Im Rahmen der Etablierung eines murinen Modells der Legionellose wurde zunächst die Frage beantwortet, ob *Legionella pneumophila* die Expression von IL-27 induziert. BMDMs wurden dazu *in vitro* mit *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert. *Legionella pneumophila* induzierte eine schnelle Genexpression der beiden Zytokin-Untereinheiten *p28* und *ebi3* mit einem Expressionsmaximum zwischen 6 Stunden und 12 Stunden nach Infektion (Abbildung 19A). In den Kulturüberständen von infizierten BMDMs konnte zudem nach 24 Stunden in Abhängigkeit der zur Infektion verwendeten *Multiplicity of Infection* (MOI) auch die Expression von IL-27p28 auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 19B). Für die Untersuchung der IL-27 Expression *in vivo* wurden C57BL/6 Mäuse intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs von JR32 infiziert. *Legionella pneumophila* induzierte eine signifikante Expression von IL-27p28 in der BALF von infizierten Mäusen mit einem Konzentrationsmaximum 3 Stunden nach Infektion (Abbildung 19C). Die Konzentration von IL-27p28 in der BALF blieb über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden erhöht. Im Plasma konnte dagegen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektion keine messbare Expression von IL-27 detektiert werden. Erst 48 Stunden nach Infektion wurde ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration von IL-27p28 beobachtet (Abbildung 19D).

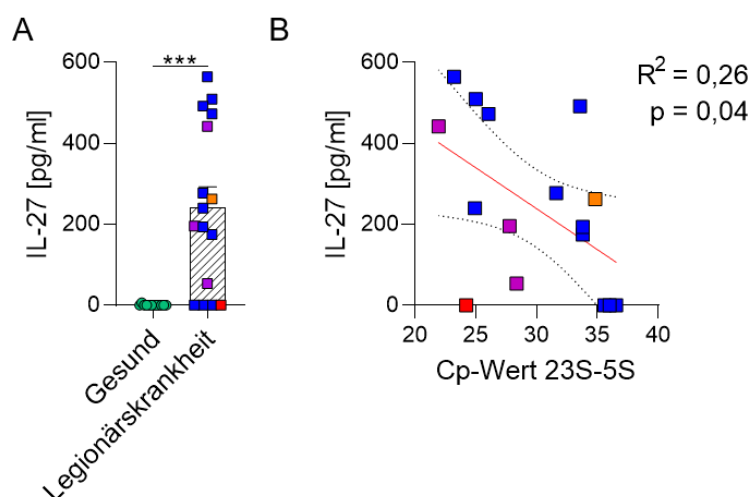
Um die murinen *in vitro* und *in vivo* Befunde zu bestätigen, wurden in einem translationalen Ansatz auch die IL-27 Konzentrationen in der BALF von Patienten mit Legionärskrankheit untersucht. Durch einen Kollaborationspartner ( [REDACTED], UZ Brussels) konnten Proben von insgesamt 16 Patienten mit einer Legionellen-Infektion verschiedener bakterieller Spezies zur Verfügung gestellt werden. Die IL-27 Konzentrationen in der BALF der Patienten waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 20A). Sie korrelierten zudem mit dem quantitativen Nachweis der ribosomalen Nukleinsäure von *Legionella* als Marker

für das Ausmaß der bakteriellen Belastung ( $p=0,04$ ,  $R^2 = 0,26$ ) (Abbildung 20B).



**Abbildung 19: *Legionella pneumophila* induziert IL-27 Expression *in vitro* und *in vivo*.**

(A) BMDMs wurden *in vitro* mit *Legionella pneumophila* Stamm JR32 (MOI=1) infiziert. Die Genexpression beider IL-27 Untereinheiten wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qPCR analysiert. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen ist dargestellt. (B) BMDMs wurden für 24h mit verschiedenen MOIs von *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert. Die IL-27p28 Konzentration in zellfreien Kulturüberständen wurde mittels ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen dargestellt. (C+D) C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs (*Colony-forming units*) JR32 infiziert oder erhielten eine äquivalente Menge steriles PBS als Scheinbehandlung. (C) Die IL-27p28 Konzentration in zellfreier BALF und Plasma wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt ( $n=3$  je Zeitpunkt). (D) Die Plasma-Konzentration von IL-27p28 wurde 48h nach Infektion mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (C) oder zweiseitigem t-Test (D). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , MOI: Multiplicity of infection.



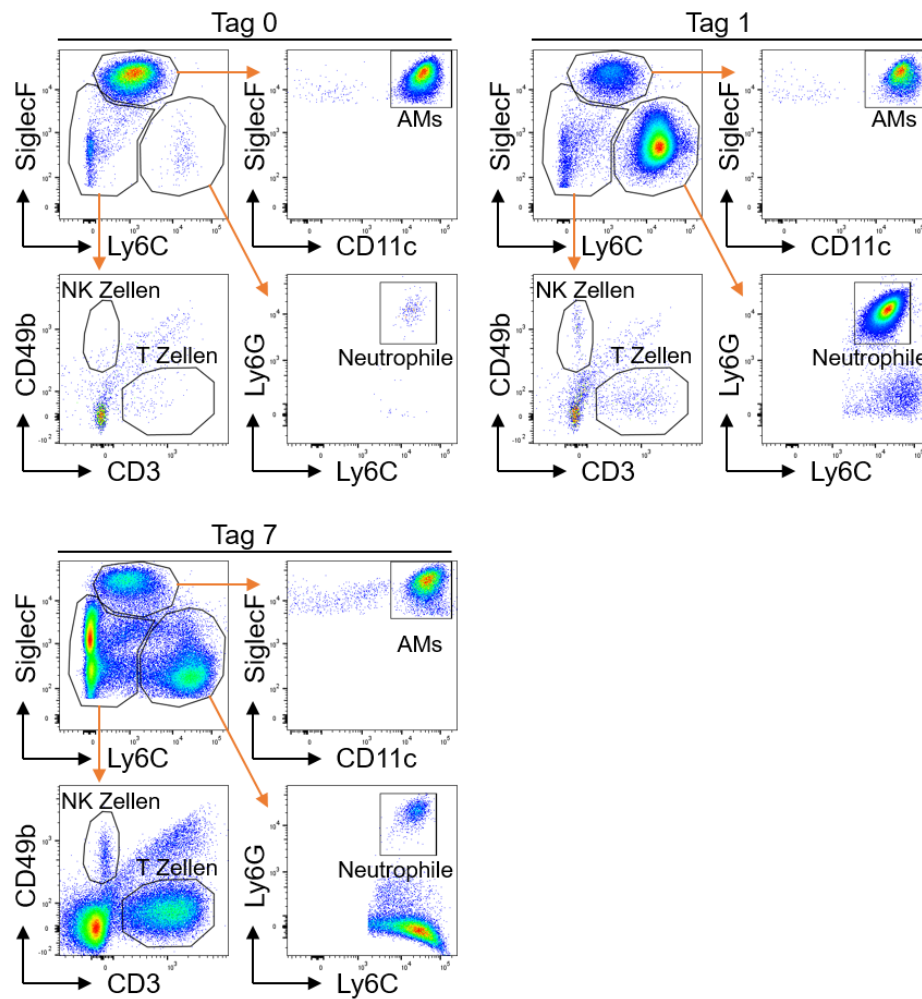
**Abbildung 20: Die IL-27 Konzentration ist in der BALF von Patienten mit Legionärskrankheit signifikant erhöht.**

(A) In humanen BALF Proben von Patienten mit Legionärskrankheit ( $n=16$ ) und gesunden Kontrollen ( $n=12$ ) wurde IL-27 mittels ELISA gemessen. (B) Die IL-27 Konzentration wurde mit dem Cp (*Crossing point*)-Wert für die bakterielle ribosomale RNA korreliert (Blau: *Legionella pneumophila* Serogruppe 1, Lila: *Legionella pneumophila* Serogruppe 2, Rot: *Legionella bozemanæ*, Orange: *Legionella* spp.). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (A). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A) oder durch einfache lineare Regression (B). \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 3.3.2 IL-27 responsive NK Zellen und T-Lymphozyten werden während der Legionellen-Pneumonie in die Alveolarräume rekrutiert

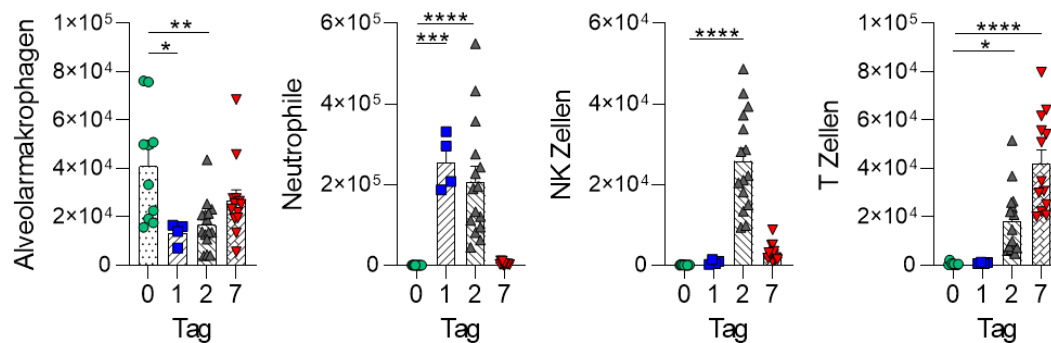
Nachdem festgestellt worden war, dass die IL-27 Expression während der Legionellen-Infektion induziert wird, wurden Immunzellpopulationen mit zentraler Bedeutung für die Immunantwort des Wirts untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf Alveolarmakrophagen, Neutrophile, NK Zellen und T Zellen aus den Alveolarräumen von infizierten Mäusen gelegt. Eine repräsentative Gating-Strategie zur Identifizierung der genannten Immunzellpopulationen bevor bzw. 1 und 7 Tage nach der Infektion ist in [Abbildung 21](#) gezeigt. Alveolarmakrophagen wurden als CD11c<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup> Zellen und Neutrophile als Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Zellen identifiziert. Die spezifischen Marker CD49b und CD3 wurden zur Identifizierung von NK Zellen und T Zellen verwendet.

BALF Immunzellen wurden nach Scheinbehandlung und 1, 2 oder 7 Tage nach Infektion quantifiziert ([Abbildung 22](#)). In scheinbehandelten Mäusen bestand der zelluläre Anteil der BALF zu über 95% aus ortsständigen Alveolarmakrophagen ([Abbildung 21](#)). Neutrophile, NK Zellen und T Zellen waren dagegen nahezu gänzlich abwesend ([Abbildung 21](#) und [Abbildung 22](#)). Die Infektion mit *Legionella pneumophila* induzierte im zeitlichen Verlauf zunächst eine massive Rekrutierung von Neutrophilen an Tag 1 einhergehend mit einer signifikanten Reduzierung der Anzahl an Alveolarmakrophagen. Im weiteren Verlauf der Infektion folgte eine starke Einwanderung von NK Zellen an Tag 2 nach Infektion. T Zellen erreichten ihr quantitatives Maximum 7 Tage nach Infektion. Die Anzahl an Neutrophilen und NK Zellen war zu diesem Zeitpunkt beinahe vollständig zu ihrem homöostatischen Zustand zurückgekehrt. Auch die Anzahl an Alveolarmakrophagen näherte sich dem Ausgangszustand ([Abbildung 22](#)).



**Abbildung 21: Gating-Strategie von BALF Immunzellen nach *Legionella pneumophila* Infektion.**

C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert oder einer Scheinbehandlung mit sterilem PBS unterzogen (Tag 0). In die Alveolarräume rekrutierte Neutrophile, NK und T Zellen sowie ortsständige Alveolarmakrophagen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Repräsentative Plots für jeden Zeitpunkt sind dargestellt.



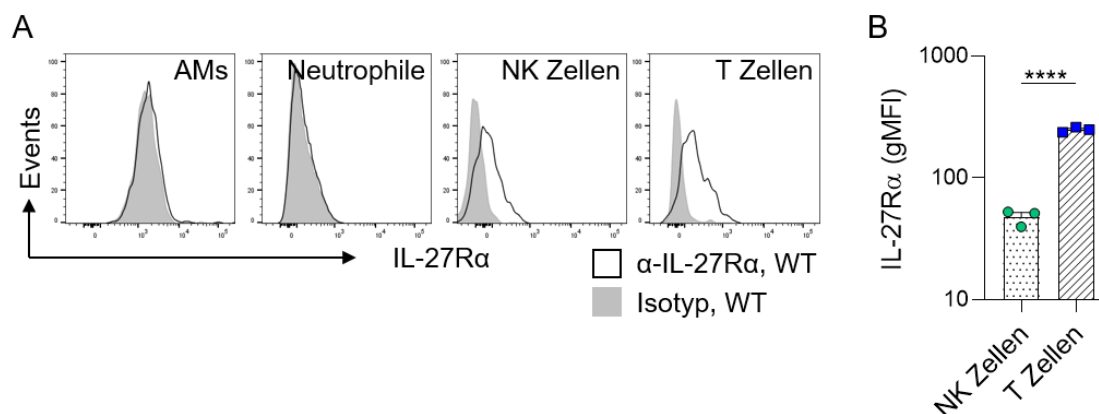
**Abbildung 22: Kinetik rekrutierter BALF Immunzellen nach *Legionella pneumophila* Infektion.**

C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert oder erhielten eine äquivalente Menge steriles PBS als Scheinbehandlung (Tag 0). BALF Alveolarmakrophagen, Neutrophile sowie NK und T Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

Neben der quantitativen Erfassung der in die Alveolarräume eingewanderten Immunzellen wurden Alveolarmakrophagen, Neutrophile sowie NK und T Zellen auch qualitativ hinsichtlich ihrer Expression der beiden IL-27 Rezeptor-Untereinheiten untersucht.

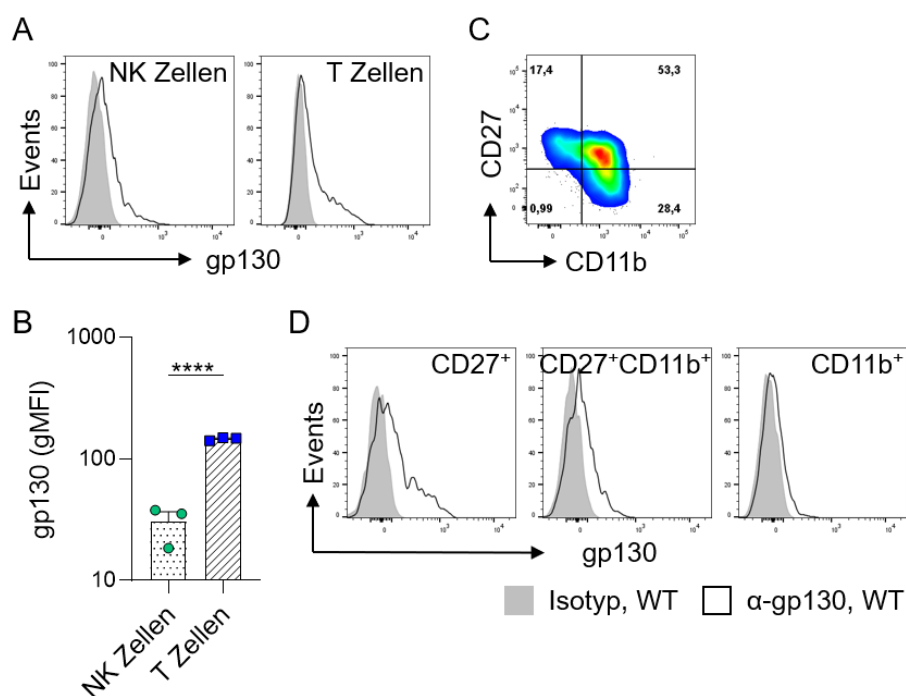
Wildtyp und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse wurden intranasal mit *Legionella pneumophila* JR32 infiziert. 24 Stunden nach Infektion konnte in der BALF auf den rekrutierten NK und T Zellen die Expression der Zytokin-spezifischen Rezeptorkette IL-27R $\alpha$  nachgewiesen werden (Abbildung 23A). Alveolarmakrophagen und Neutrophile wiesen dagegen keine Expression auf. Die Expression von IL-27R $\alpha$  war hierbei in T Zellen signifikant höher als in NK Zellen (Abbildung 23B).

Auch die Expression der zweiten Rezeptor-Untereinheit gp130 für eine funktionale Signaltransduktion wurde untersucht. 48 Stunden nach Infektion exprimierten sowohl NK Zellen als auch T Zellen gp130 auf ihrer Oberfläche (Abbildung 24A). T Zellen exprimierten dabei signifikant mehr gp130 als NK Zellen (Abbildung 24B). Die rekrutierten NK Zellen wurden im Folgenden hinsichtlich ihres Reifegrads untersucht (Abbildung 24C). Sowohl CD27 $^{+}$ , CD27 $^{+}$ CD11b $^{+}$  als auch CD11b $^{+}$  NK Zellen exprimierten allesamt die gp130 Rezeptoruntereinheit. Die Expression von gp130 war dabei in reifen CD11b $^{+}$  NK Zellen geringer als in CD27 $^{+}$  NK Zellen (Abbildung 24D).



**Abbildung 23: Rekrutierte BALF NK Zellen und T Zellen exprimieren IL-27Rα.**

C57BL/6 Mäuse (n=3) wurden für 24h intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert und die Expression von IL-27Rα auf rekrutierten BALF Immunzellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Histogramme der IL-27Rα Expression auf Alveolarmakrophagen (AMs), Neutrophilen, NK Zellen und T Zellen. (B) Quantifizierung der IL-27Rα Expression auf NK und T Zellen anhand ihrer gMFI. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (B). \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .



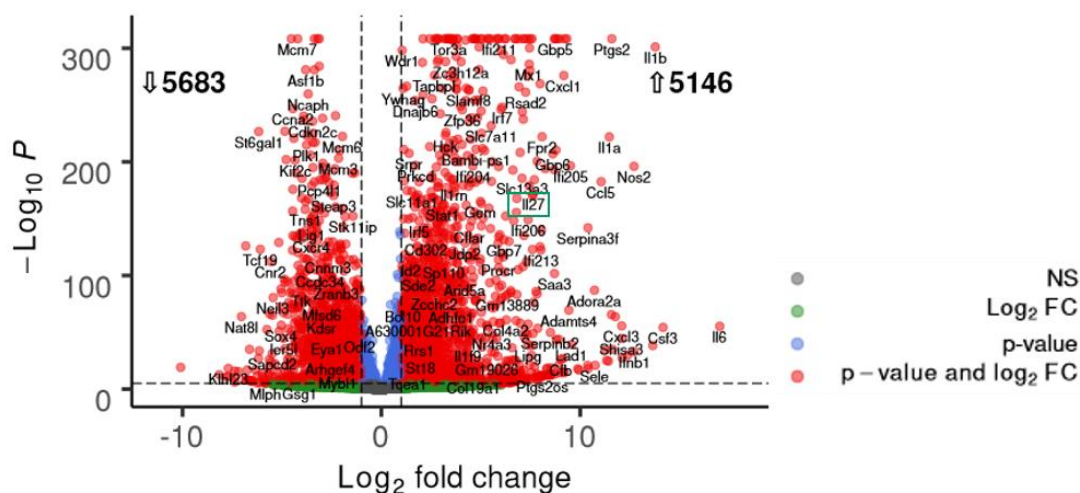
**Abbildung 24: Rekrutierte BALF NK Zellen und T Zellen exprimieren gp130.**

C57BL/6 Mäuse (n=3) wurden für 48h intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert und die gp130 Expression auf rekrutierten BALF NK und T Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Histogramme der gp130 Expression auf NK und T Zellen. (B) Quantifizierung der gp130 Expression auf NK und T Zellen anhand der gMFI. (C+D) Der Reifegrad der rekrutierten NK Zellen wurde anhand der Expression der Marker CD27 und CD11b überprüft. (C) Repräsentativer Plot der Expression der Marker CD27 und CD11b auf CD49b+ NK1.1+ NK Zellen. (D) Repräsentative Histogramme der gp130 Expression während verschiedener Stadien der NK Zellreifung. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (B). \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

### 3.3.3 *Legionella pneumophila* induziert eine protektive IFN $\gamma$ -vermittelte Immunantwort

Neben der Induktion von IL-27 durch *Legionella pneumophila* wurde weiter untersucht, welche Immunantworten darüber hinaus während einer Legionellen-Infektion in Makrophagen induziert werden.

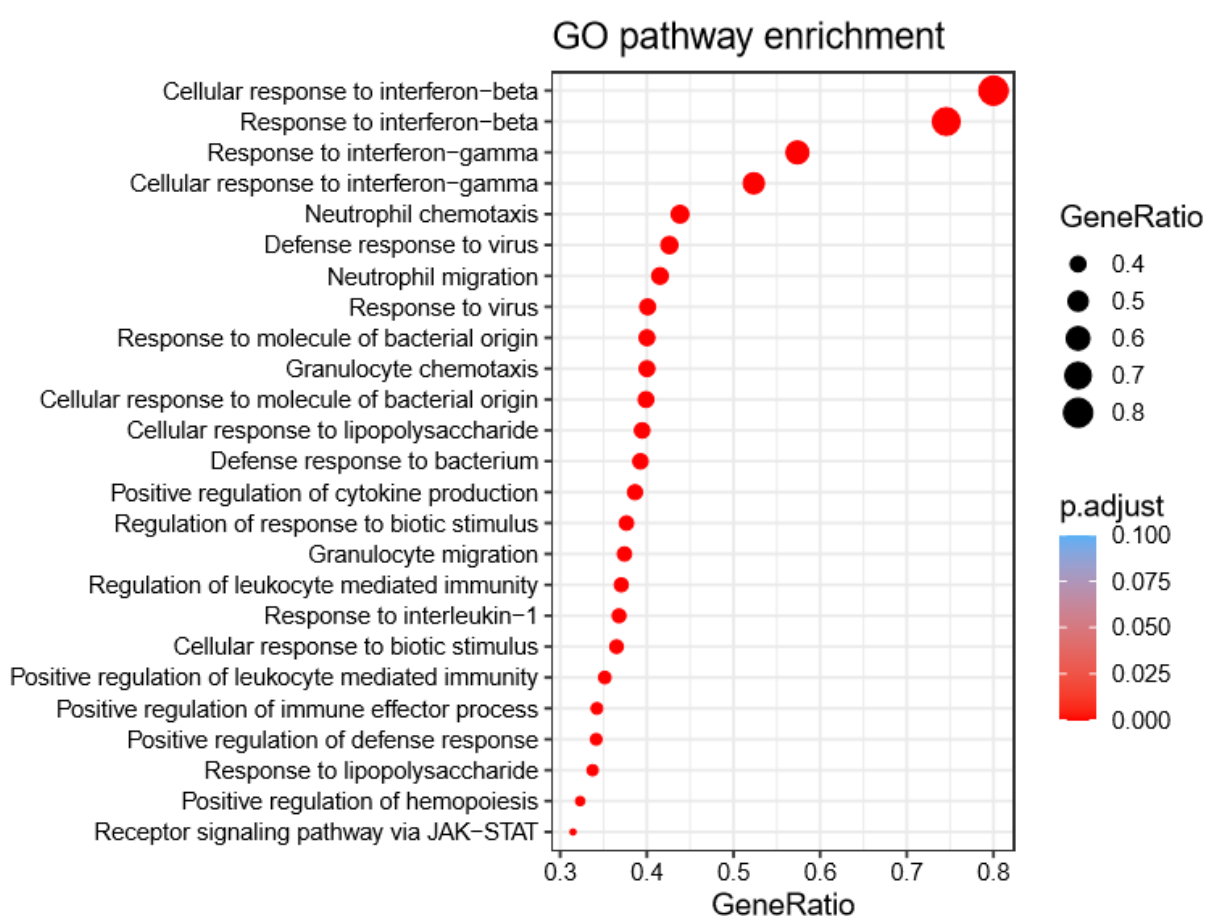
Zu diesem Zweck wurden BMDMs *in vitro* für 10 Stunden mit *Legionella pneumophila* JR32 infiziert. Gesamt-RNA wurde isoliert und sequenziert. Im Vergleich zu unbehandelten BMDMs war in JR32 infizierten Makrophagen die Expression von 5146 Genen signifikant ( $p < 0,05$ ) hochreguliert (Abbildung 25). In Übereinstimmung mit den vorherigen Daten gehörten *Il-27p28* ( $p = 1,03 \times 10^{-170}$ ,  $\text{Log}_2 \text{ fold change} = 7,63$ ) und *ebi3* ( $p = 3,38 \times 10^{-62}$ ,  $\text{Log}_2 \text{ fold change} = 2,49$ ) zu diesen induzierten Genen. Bei 5683 Genen war die Expression nach *Legionella pneumophila* Infektion dagegen signifikant herunterreguliert.



**Abbildung 25: Volcano Plot von differentiell exprimierten Genen nach *Legionella pneumophila* Infektion.**

BMDMs wurden für 10h *in vitro* mit *Legionella pneumophila* Stamm JR32 (MOI=1) infiziert (n=6) oder unbehandelt belassen (n=5). Gesamt-RNA wurde isoliert und eine Sequenzierung der aufbereiteten Proben wurde mit einer Leseweite von 150 Nukleotiden nach einem *paired-end* Verfahren durchgeführt. Differentiell exprimierte Gene sind grafisch als *Volcano Plot* dargestellt. ns: nicht signifikant, FC: *fold change*.

Eine *gene set enrichment*-Analyse (GSEA) zur Identifizierung von induzierten inflammatorischen Signalwegen wurde durchgeführt. Die 25 Signalwege mit der höchsten Induktion sind in [Abbildung 26](#) dargestellt. Die stärkste Induktion konnte für die beiden Signalwege „(cellular) response to interferon-beta“ und „(cellular) response to interferon-gamma“ beobachtet werden. Weitere induzierte Signalwege waren zudem Immunantworten auf bakterielle Bestandteile wie LPS, die Rekrutierung von Neutrophilen, die Interleukin 1-vermittelte Immunantwort sowie die Induktion von JAK-STAT Signalwegen.

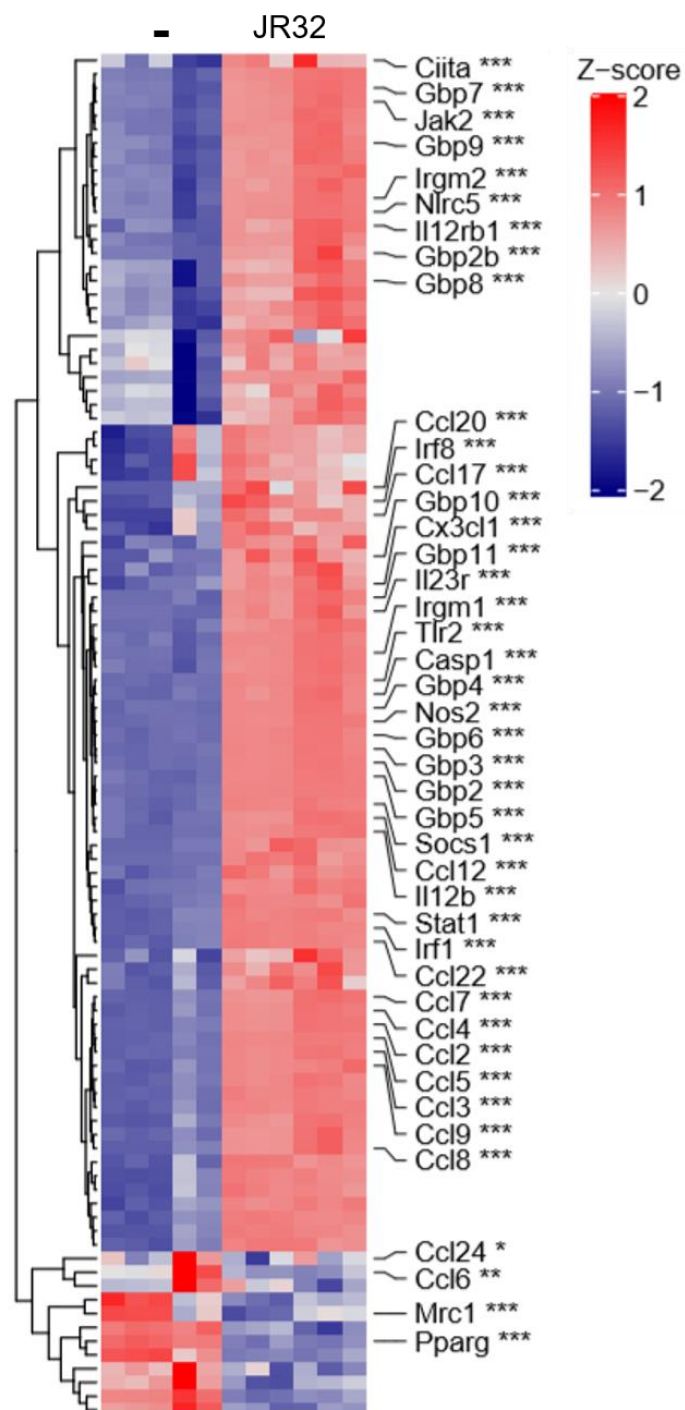


**Abbildung 26: Identifizierung induzierter zellulärer Signalwege nach *Legionella pneumophila* Infektion.**

BMDMs wurden für 10h *in vitro* mit *Legionella pneumophila* Stamm JR32 (MOI=1) infiziert (n=6) oder unbehandelt belassen (n=5). Gesamt-RNA wurde isoliert und eine Sequenzierung der aufbereiteten Proben wurde mit einer Leseweite von 150 Nukleotiden nach einem *paired-end* Verfahren durchgeführt. Eine *gene set enrichment*-Analyse zur Identifizierung von induzierten zellulären Signalwegen wurde durchgeführt. GO: *gene ontology*.

Die IFN $\gamma$ -vermittelte Immunantwort im Rahmen der Legionellen-Infektion wurde weitergehend untersucht. *Legionella pneumophila* induzierte die Expression der Familie der *Interferon-induced guanylate-binding* Proteine (Gbp) sowie die *Interferon regulatory factors* (IRF) 1 und IRF8 (Abbildung 27). Die Induktion einer proinflammatorischen Gensignatur zur Abwehr von intrazellulären Erregern war in infizierten BMDMs erkennbar (*Ciita, Nos2, Nlrc5, Casp1, Il12b, Il12rb1, Stat1*). Ebenso war die Expression zahlreicher Chemokine signifikant erhöht (*Ccl20, Ccl17, Cx3cl1, Ccl12, Ccl22, Ccl7, Ccl4, Ccl2, Ccl5, Ccl3, Ccl9, Ccl8*). Gene, die mit einem anti-inflammatorischen Phänotyp von Makrophagen assoziiert sind, waren dagegen signifikant herunterreguliert (*Mrc1, Pparg*).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Expression und Freisetzung von IL-27 während einer Infektion mit *Legionella pneumophila* sowohl in der Maus als auch im Menschen induziert wird. Im murinen Modell erfolgte die IL-27 Freisetzung dabei in einer zeitlich und räumlich definierten Art und Weise in Alveolarräumen und Plasma. Während es in den Alveolen zu einer schnellen Induktion von IL-27 kam, konnte IL-27 erst zu späteren Zeitpunkten der Infektion auch im Blutplasma der infizierten Mäuse detektiert werden. Auch die Rekrutierung verschiedener Immunzellen erfolgte in einer zeitlich definierten Abfolge. Auf eine erste Einwanderungswelle von Neutrophilen folgten NK Zellen und T Zellen im weiteren Verlauf der Infektion. Sowohl NK Zellen als auch T Zellen exprimierten dabei beide Untereinheiten des IL-27 Rezeptors. Darüber hinaus wurde durch Transkriptom-Analysen von infizierten BMDMs festgestellt, dass IFN $\beta$ - und IFN $\gamma$ -vermittelten Signalwegen eine besondere Bedeutung im Rahmen der Immunantwort auf eine intrazelluläre Infektion mit *Legionella pneumophila* zukommt.



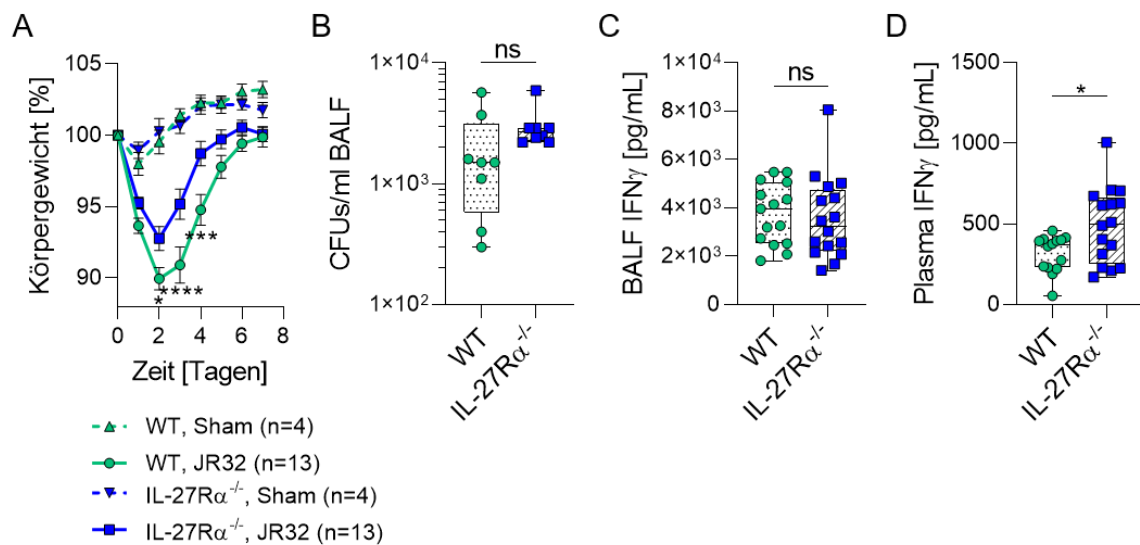
**Abbildung 27: *Legionella pneumophila* induziert eine IFN $\gamma$ -vermittelte Immunantwort.** BMDMs wurden für 10h *in vitro* mit *Legionella pneumophila* Stamm JR32 (MOI=1) infiziert (n=6) oder unbehandelt belassen (n=5). Gesamt-RNA wurde isoliert und eine Sequenzierung der aufbereiteten Proben wurde mit einer Leseweite von 150 Nukleotiden nach einem *paired-end* Verfahren durchgeführt. Differenziell exprimierte Gene mit Beteiligung in der IFN $\gamma$ -vermittelten Immunantwort sind als Heatmap dargestellt.  
 \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

### 3.4 Infektionsstudien mit *Legionella pneumophila*

Nach der erfolgreichen Etablierung des murinen Modells der Legionellose wurde der Frage nach der funktionellen Beteiligung von IL-27/IL-27R $\alpha$  Signalwegen nachgegangen.

#### 3.4.1 IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen milderen Verlauf nach Infektion mit *Legionella pneumophila*

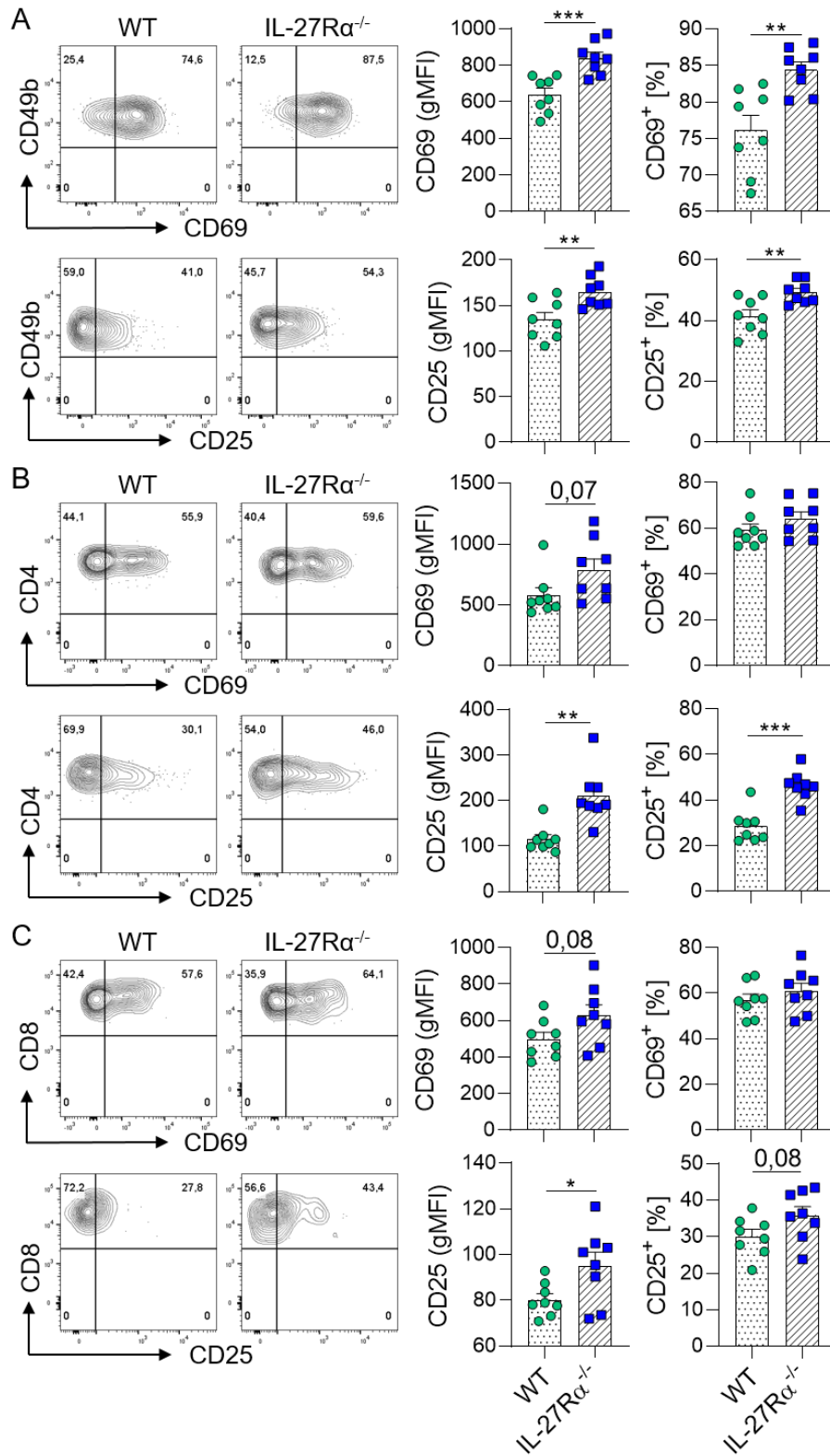
Wildtyp und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs von *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert. Mäuse mit einer globalen Defizienz von IL-27R $\alpha$  zeigten 2 bis 4 Tage nach Infektion einen signifikant geringeren Gewichtsverlust als Kontrolltiere (Abbildung 28A). Sowohl Wildtyp als auch IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse erlangten nach überstandener Infektion innerhalb von 7 Tagen ihr jeweiliges Ausgangsgewicht zurück. Da eine maximale Gewichtsabnahme an Tag 2 nach Infektion zu beobachten war, wurde dieser Zeitpunkt im Folgenden zur weiteren Charakterisierung der ablaufenden Immunantwort verwendet. In der BALF von Wildtyp und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen konnten 48 Stunden nach Infektion keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl bakterieller Kolonien nachgewiesen werden (Abbildung 28B). Ebenso war die bakterielle Last in den Lungen von Wildtyp und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen unverändert. Darüber hinaus wurde die Konzentration von IFN $\gamma$  als wichtiges Zytokin für die zelluläre Immunantwort gegen *Legionella pneumophila* in BALF und Plasma untersucht. In der BALF konnten keine signifikanten Unterschiede in den IFN $\gamma$  Konzentrationen festgestellt werden (Abbildung 28C). Im Blutplasma wiesen Mäuse mit einer globalen Defizienz von IL-27R $\alpha$  dagegen eine signifikant erhöhte Konzentration von IFN $\gamma$  auf (Abbildung 28D).



**Abbildung 28: IL-27Rα defiziente Mäuse zeigen einen milderen Verlauf nach Infektion mit *Legionella pneumophila*.**

WT und IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intranasal mit 1×10<sup>6</sup> CFUs JR32 infiziert oder einer Scheinbehandlung mit sterilem PBS unterzogen. **(A)** Das Körpergewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von einer Woche täglich bestimmt. **(B-D)** BALF und Plasma wurden 48 Stunden nach Infektion isoliert. **(B)** Die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF wurde durch Kultivieren von seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten bestimmt (n=8 je Genotyp). **(C+D)** Die IFN<sub>γ</sub> Konzentration in zellfreier BALF **(C)** und Plasma **(D)** wurde mittels ELISA gemessen (WT: n=15, IL-27Rα<sup>-/-</sup>: n=16). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt **(A)**. Box-Plots präsentieren den Median mit Interquartilenabstand und Spannweite der Daten **(B-D)**. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse **(A)** oder zweiseitigem t-Test **(B-D)**. \* P<0,05, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001, ns: nicht signifikant.

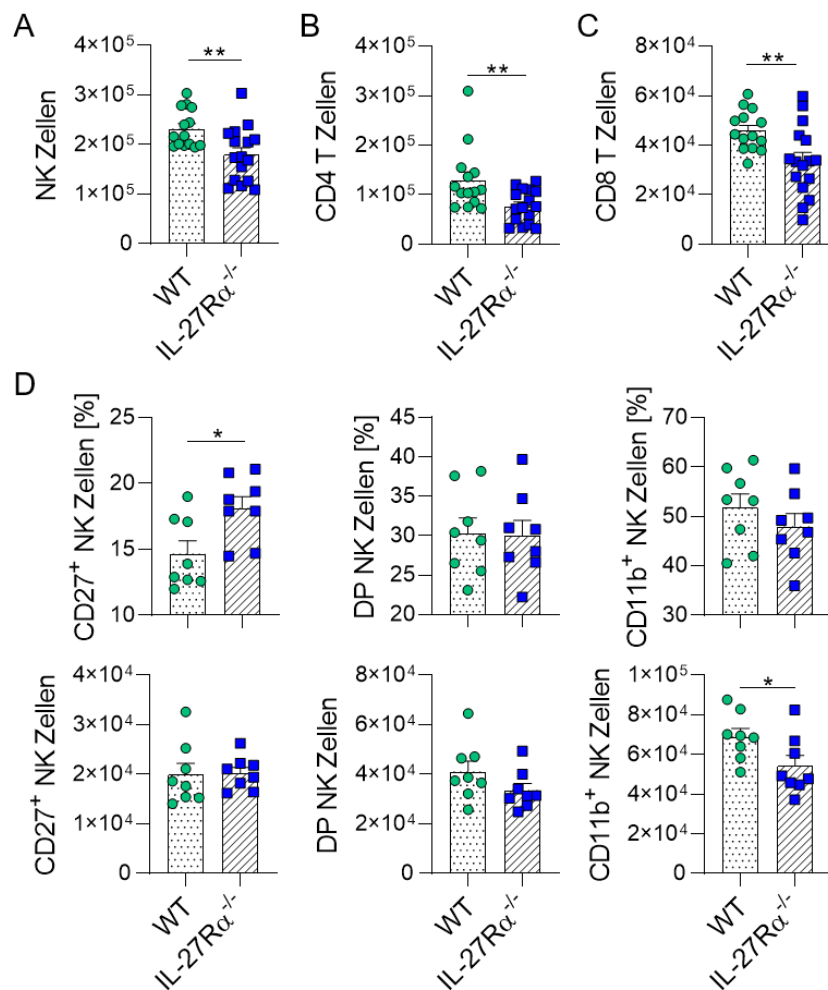
Als potenzielle zelluläre Quelle der erhöhten IFN<sub>γ</sub> Freisetzung wurde der Aktivierungsgrad von NK Zellen und T Zellen 2 Tage nach Infektion mit *Legionella pneumophila* untersucht. In die Alveolarräume rekrutierte NK Zellen wiesen in IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant höhere Expression der beiden Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf (Abbildung 29A). Zudem war der relative Anteil CD69- und CD25-positiver NK Zellen signifikant erhöht. Ebenso zeigten CD4<sup>+</sup> T Zellen (Abbildung 29B) und CD8<sup>+</sup> T Zellen (Abbildung 29C) aus IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant höhere CD25 Expression als CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen aus Kontrolltieren. Zudem war ein klarer Trend zu einer erhöhten CD69 Expression in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen aus IL-27Rα<sup>-/-</sup> Mäusen zu beobachten.



**Abbildung 29: NK- und T-Lymphozyten in der BALF von infizierten IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen weisen eine höhere Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf.**

WT und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert (n=8 je Genotyp). (A-C) Die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf CD49b<sup>+</sup>NCR1<sup>+</sup> NK Zellen (A), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen (B) und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T Zellen (C) aus der BALF wurde 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der CD69 und CD25 Expression auf den jeweiligen Lymphozyten-Populationen sind dargestellt. Die Expression beider Aktivierungsmarker wurde anhand ihrer gMFI quantifiziert und der Anteil an CD25<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup> Zellen wurde ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A-C). \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

Neben der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 wurde die Anzahl an NK und T Zellen in den Lungen von infizierten Mäusen bestimmt. 48 Stunden nach Infektion mit *Legionella pneumophila* JR32 war die Anzahl an NK Zellen sowie an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen in den Lungen von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 30A-C). Eine weiterführende Charakterisierung der NK Zellen zeigte, dass die reduzierte Gesamtanzahl der NK Zellen insbesondere auf eine signifikante Reduktion der reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellpopulation in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen zurückzuführen war (Abbildung 30D). Dagegen war der relative Anteil unreifer CD27<sup>+</sup> NK Zellen in IL-27R $\alpha$  defizienten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren.



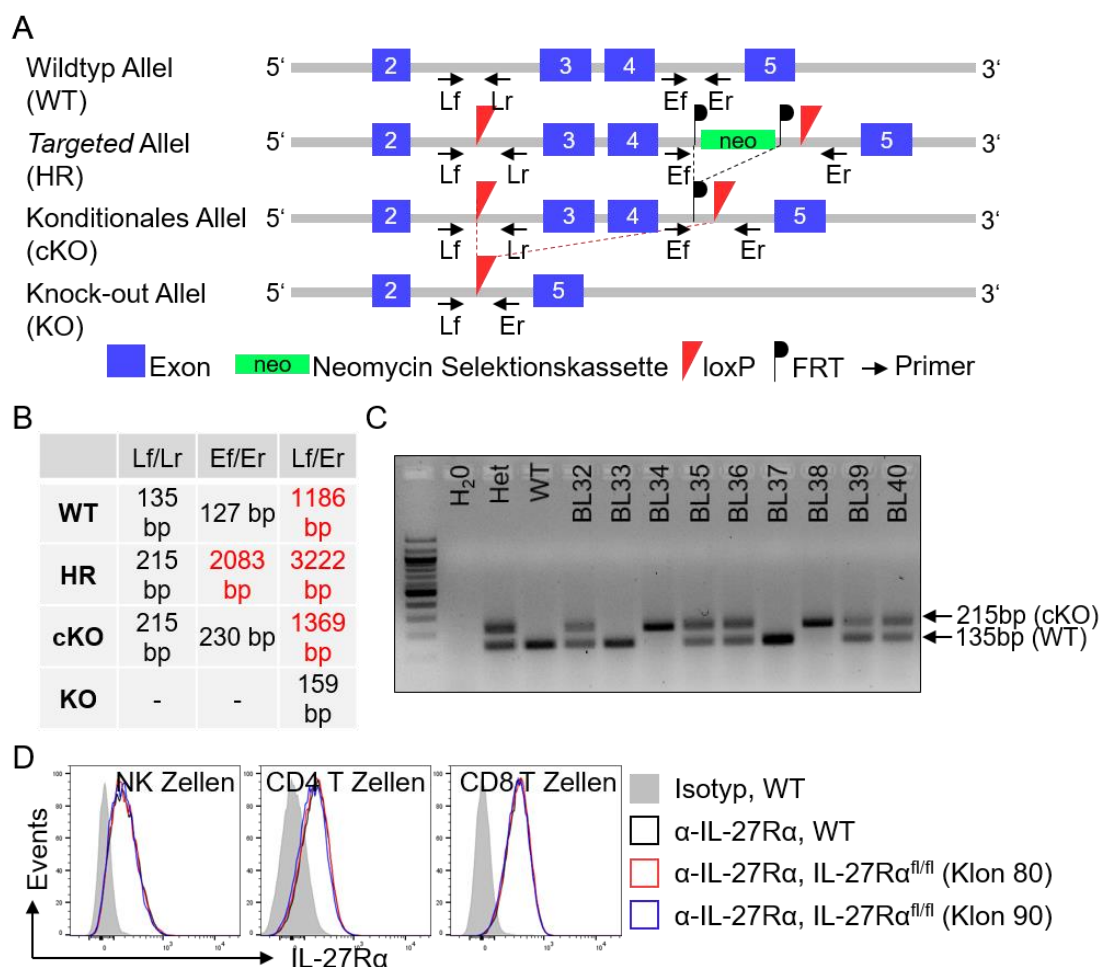
**Abbildung 30: Unterschiede in der Anzahl an NK und T Zellen in der Lunge von infizierten IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen.**

WT und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert. (A-C) NK Zellen (A), CD4<sup>+</sup> T Zellen (B) und CD8<sup>+</sup> T Zellen (C) in den Lungen infizierter Mäuse wurden 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (WT: n=15, IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup>: n=16). (D) Absolute und relative Zellzahlen von CD27<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (DP) und CD11b<sup>+</sup> NK Zellen in den Lungen infizierter Mäuse wurden 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n=8 je Genotyp). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A-D). \* P<0,05, \*\* P<0,01. DP: CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> doppelt-positive Zellen.

### 3.4.2 Herstellung von konditionalen Knockouts mit NK Zell-spezifischer oder CD8-spezifischer Defizienz von IL-27R $\alpha$

Für eine zellspezifische Untersuchung von IL-27 vermittelten Effekten während der Legionellen-Infektion sollten mittels Cre/loxP-System IL-27R $\alpha$  Knockout-Stämme mit Zelltypspezifität generiert werden.

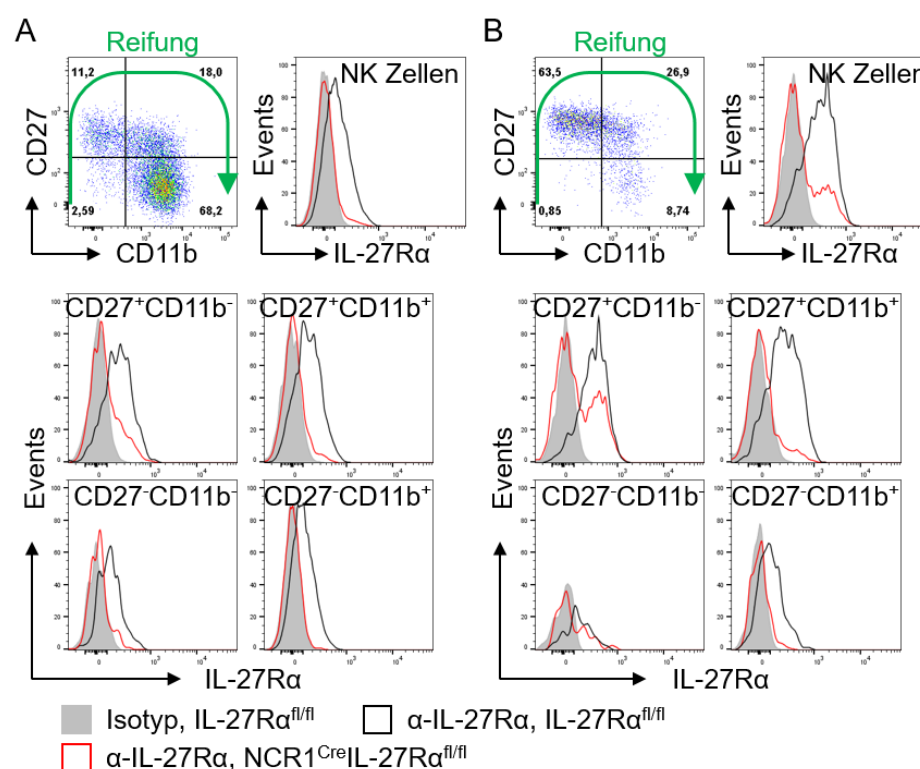
Ein neuer IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Stamm (*Il27ra<sup>tm1.1Bosm</sup>*) wurde extern von Charles River Laboratories hergestellt. Die Herstellung erfolgte mittels homologer Rekombination in C57BL/6N embryonalen Stammzellen. Der verwendete Vektor wurde derart konstruiert, dass loxP-Stellen flankierend um die Exons 3 und 4 von *Il27ra* eingefügt wurden. Die Neomycin Selektionskassette wurde im Herstellungsprozess deletiert. Das genaue Vorgehen ist schematisch in [Abbildung 31A](#) dargestellt. Das Vorliegen der beiden loxP-Stellen *upstream* und *downstream* der flankierten Exons wurde mittels Genotypisierungs-PCR mit spezifischen Primerpaaren bestätigt. Die theoretischen PCR Fragmentgrößen sowie ein repräsentatives Gel der Genotypisierung sind dargestellt ([Abbildung 31B+C](#)). IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse, die zwei verschiedenen embryonalen Zellklonen entstammten (Klon 80 & Klon 90), wurden separat homozygot gezüchtet. Beide IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mauslinien wurden hinsichtlich ihrer IL-27R $\alpha$  Expression charakterisiert, um auszuschließen, dass bereits die genomische Insertion der loxP Sequenzen in einer verminderten Genexpression von *Il27ra* resultierte. Das Vorliegen der eingeführten loxP-Stellen hatte weder bei Klon 80 noch bei Klon 90 einen Einfluss auf die Expression von IL-27R $\alpha$  auf NK und T Zellen aus der Milz der Mäuse ([Abbildung 31D](#)). Für alle folgenden Experimente wurden ausschließlich IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse von Stammzellklon 80 verwendet.



**Abbildung 31: Herstellung einer neuen  $IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mauslinie ( $IL27ra^{tm1.1Bosm}$ ) für konditionale Knockouts.**

Ein neuer  $IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mausstamm wurde mittels homologer Rekombination in C57BL/6N embryonalen Stammzellen hergestellt (Charles River Laboratories). **(A)** Schematisches Vorgehen für das Einfügen von flankierenden loxP-Stellen um die Exons 3 und 4. **(B)** Tabellarische Darstellung der theoretischen PCR Fragmentgrößen zur Genotypisierung. Mit den verschiedenen Primerpaaren lässt sich das Vorhandensein der loxP-Stellen *upstream* (Lf/Lr) und *downstream* (Ef/Er) von Exon 3 und 4 sowie eine Deletion der betreffenden Exons (Lf/Er) nachweisen. PCR-Produkte in roter Schrift sind mit dem verwendeten PCR-Protokoll nicht zu erwarten. **(C)** Beispielhaftes Gel der Genotypisierung von mehreren Mäusen (BL32-BL40) inklusive Wasserkontrolle, Heterozygoten-Kontrolle und Wildtyp-Kontrolle. **(D)** Die Expression von  $IL-27R\alpha$  auf NK und T Zellen aus der Milz von  $IL-27R\alpha^{fl/fl}$  und WT Mäusen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.  $IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mäuse aus zwei verschiedenen embryonalen Zellklonen wurden verwendet. Repräsentative Histogramme der  $IL-27R\alpha$  Expression sind dargestellt. FRT: *flippase recognition target*, loxP: *locus of X-over*.

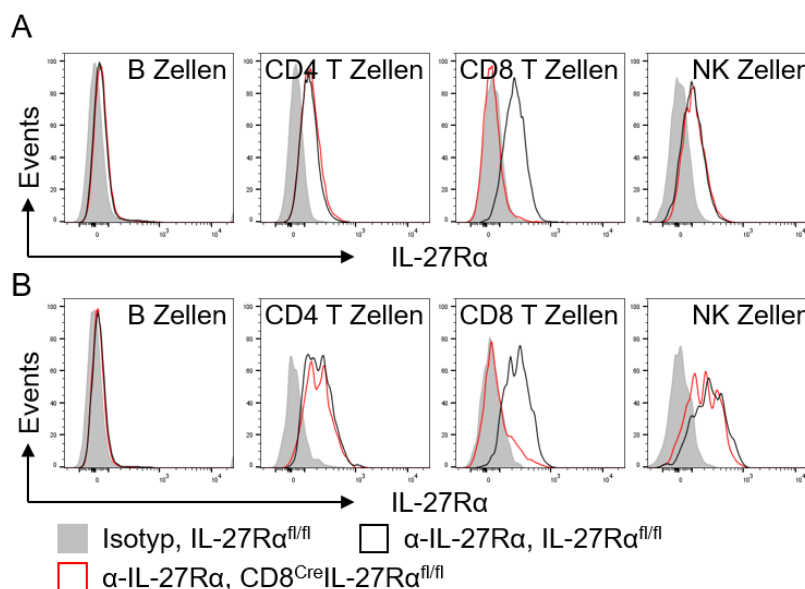
Zur Herstellung eines NK Zell-spezifischen IL-27R $\alpha$  Knockout-Stammes wurden die konditionalen IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse mit einem Mausstamm verpaart, der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Ncr1* Promotors exprimiert [247]. Die Deletionseffizienz von IL-27R $\alpha$  in NK Zellen aus der Milz (Abbildung 32A) und dem Knochenmark (Abbildung 32B) von NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen wurde untersucht. Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark war die Deletion von IL-27R $\alpha$  hoch effizient in reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellen. In unreifen CD27<sup>+</sup> NK Zellen war die Deletion dagegen teilweise unvollständig. Zusätzlich zur Deletion in NK Zellen wurde IL-27R $\alpha$  auch in einer Subpopulation von CD127<sup>+</sup>T-Bet<sup>+</sup> ILC1 aus peripheren Lymphknoten teilweise deletiert. ILC2, ILC3 sowie B und T Zellen waren hiervon nicht betroffen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 32: Deletionseffizienz von IL-27R $\alpha$  in NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen.**

Milz (**A**) und Knochenmark (**B**) naiver IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse (n=3 je Genotyp) wurden isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Die Deletion von IL-27R $\alpha$  während verschiedener Stadien der Zellreifung von CD49b<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Gating-Strategien zur Unterscheidung von vier NK Zell Reifungsstadien in Milz (**A**) und Knochenmark (**B**) anhand der Expression der Marker CD27 und CD11b. Repräsentative Histogramme der Deletion von IL-27R $\alpha$  in den entsprechenden Reifungsstadien sind dargestellt.

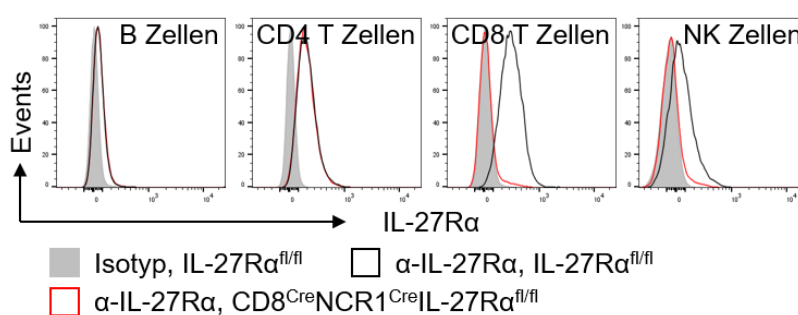
Zusätzlich wurde ein weiterer IL-27R $\alpha$  Knockout-Stamm mit spezifischer Deletion in zytotoxischen T Zellen generiert. Hierfür wurde ein CD8 $\alpha$ -Cre *deleter* Mausstamm verwendet [248]. Die Deletionseffizienz und -spezifität wurden in Lymphozyten aus Milz (Abbildung 33A) und Knochenmark (Abbildung 33B) von CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen untersucht. In CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz erfolgte die Deletion von IL-27R $\alpha$  hoch effizient. In CD8<sup>+</sup> T Zellen aus dem Knochenmark war die Deletionseffizienz nur geringfügig niedriger. Trotz des CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelpositiven Entwicklungsstadiums von T-Lymphozyten im Thymus war die Deletion von IL-27R $\alpha$  darüber hinaus sehr spezifisch. Weder in CD4<sup>+</sup> T Zellen noch in B Zellen oder NK Zellen war eine Deletion von IL-27R $\alpha$  erkennbar.



**Abbildung 33: Deletionseffizienz und Deletionsspezifität von IL-27R $\alpha$  in CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen.**

Milz (A) und Knochenmark (B) naiver IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> und CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse (n=3 je Genotyp) wurden isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Die Deletion von IL-27R $\alpha$  in CD19<sup>+</sup> B Zellen, CD49b<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK Zellen und CD3<sup>+</sup> T Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der IL-27R $\alpha$  Expression in den jeweiligen Zellpopulationen sind dargestellt.

Zur Generierung eines dritten Stamms mit konditionaler Deletion von IL-27R $\alpha$  wurden CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse verpaart. Die Nachkommen der Verpaarungen wurden hinsichtlich des Vorliegens beider Cre-Transgene genotypisiert. In den Lymphozyten aus der Milz von bestätigten CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen wurde die Deletion von IL-27R $\alpha$  überprüft. Die simultane Expression beider Cre-Rekombinasen in CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen resultierte in einer gemeinsamen Deletion von IL-27R $\alpha$  sowohl in NK Zellen als auch in CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen (Abbildung 34). Dagegen war weder in B Zellen noch in CD4<sup>+</sup> T Zellen eine Deletion von IL-27R $\alpha$  erkennbar.



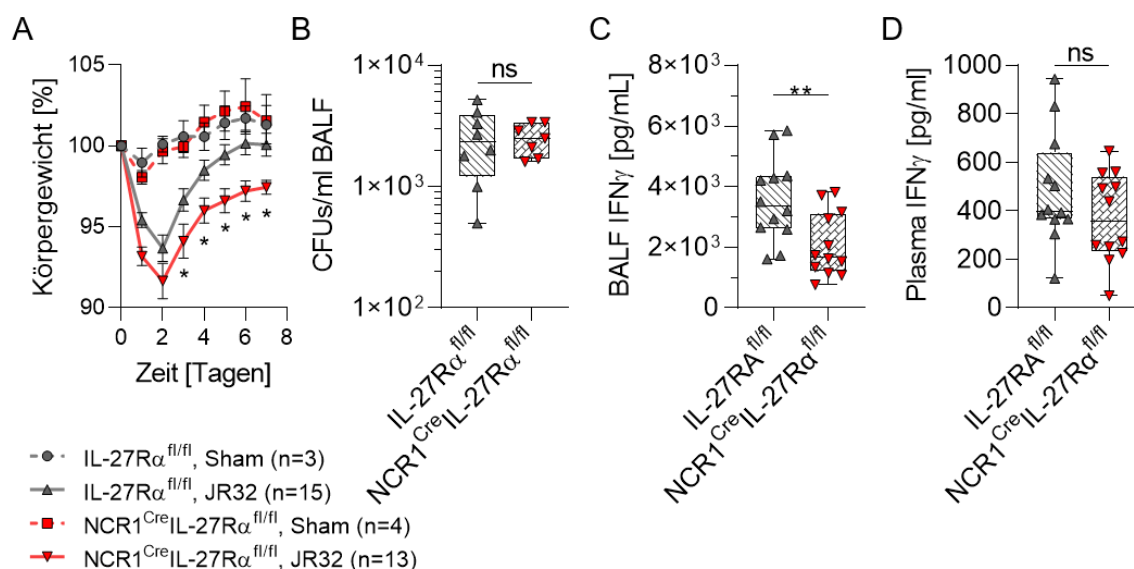
**Abbildung 34: Deletionseffizienz und Deletionsspezifität von IL-27R $\alpha$  in CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen.**

Die Milz von naiven IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  und CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen (n=2 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. Die Deletion von IL-27R $\alpha$  in CD19<sup>+</sup> B Zellen, CD49b<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK Zellen und CD3<sup>+</sup> T Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der IL-27R $\alpha$  Expression in den jeweiligen Zellpopulationen sind dargestellt.

### 3.4.3 Mäuse mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$ sind anfälliger während einer *Legionella pneumophila* Infektion

Analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise wurden Mäuse mit einer zellspezifischen Deletion von IL-27R $\alpha$  in NK Zellen oder CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen und Kontrolltiere intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs von *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert.

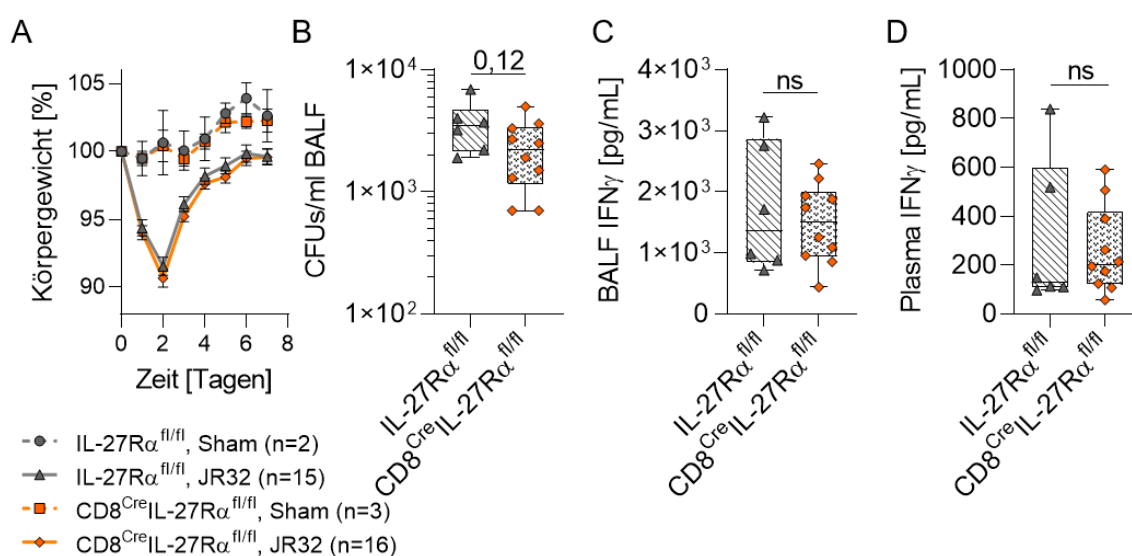
NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren einen signifikant größeren Gewichtsverlust zwischen Tag 3 und Tag 7 der Infektion auf (Abbildung 35A). Die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF von NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen und Kontrolltieren war 48 Stunden nach Infektion unverändert (Abbildung 35B). Die Konzentration von IFN $\gamma$  in der BALF von Mäusen mit NK Zell-spezifischer IL-27R $\alpha$  Deletion war dagegen zu diesem Zeitpunkt signifikant reduziert (Abbildung 35C). Im Plasma zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend zu einer geringeren IFN $\gamma$  Konzentration in NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen (Abbildung 35D).



#### Abbildung 35: Mäuse mit NK Zell-spezifischer Defizienz des IL-27R $\alpha$ verlieren mehr Gewicht während einer Infektion mit *Legionella pneumophila*.

IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert oder einer Scheinbehandlung mit sterilem PBS unterzogen. (A) Das Körpergewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von einer Woche täglich bestimmt. (B-D) BALF und Plasma wurden 48 Stunden nach Infektion isoliert. (B) Die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF wurde durch Kultivieren von seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten bestimmt (IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>: n=8, NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>: n=7). (C+D) Die IFN $\gamma$  Konzentration in zellfreier BALF (C) und Plasma (D) wurde mittels ELISA gemessen (n=12 je Genotyp). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt (A). Box-Plots präsentieren den Median mit Interquartilenabstand und Spannweite der Daten (B-D). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (A) oder zweiseitigem t-Test (B-D). \* P<0,05, \*\* P<0,01, ns: nicht signifikant.

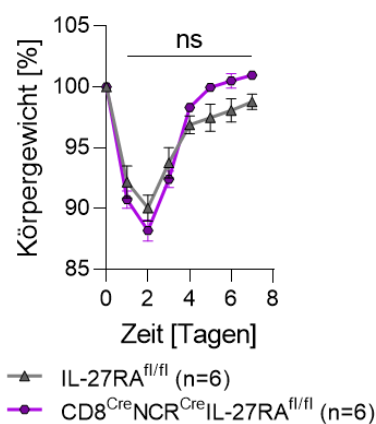
Mäuse mit CD8<sup>+</sup> T Zell-spezifischer Defizienz von IL-27R $\alpha$  wiesen dagegen keine Unterschiede im Schweregrad der Infektion mit *Legionella pneumophila* auf. Bezüglich des Gewichtsverlusts von infizierten CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen und Kontrolltieren war kein Unterschied erkennbar (Abbildung 36A). Ebenso war die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF 48 Stunden nach Infektion nicht signifikant verändert (Abbildung 36B). Auch hinsichtlich der IFN $\gamma$  Konzentration in BALF und Plasma von CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen war kein signifikanter Unterschied zu der von Kontrolltieren zu beobachten (Abbildung 36C+D).



**Abbildung 36: CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse zeigen keine Unterschiede im Schweregrad während einer Infektion mit *Legionella pneumophila*.**

IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  und CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert oder einer Scheinbehandlung mit sterilem PBS unterzogen. (A) Das Körpergewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von einer Woche täglich bestimmt. (B-D) BALF und Plasma wurden 48 Stunden nach Infektion isoliert (IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ : n=6, CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ : n=10). (B) Die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF wurde durch Kultivieren von seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten bestimmt. (C+D) Die IFN $\gamma$  Konzentration in zellfreier BALF (C) und Plasma (D) wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt (A). Box-Plots präsentieren den Median mit Interquartilenabstand und Spannweite der Daten (B-D). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (A) oder zweiseitigem t-Test (B-D). ns: nicht signifikant.

In einem Pilot-Versuch wurde zudem die Auswirkung einer dualen Deletion von IL-27R $\alpha$  für den Verlauf einer Infektion mit *Legionella pneumophila* untersucht. CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse wiesen im Verlauf der Infektion keine signifikanten Unterschiede in ihrer Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 37). In der Spätphase der Infektion (Tag 5 bis Tag 7) war lediglich ein geringfügiger Trend zu einem erhöhten Körpergewicht in CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen zu beobachten.

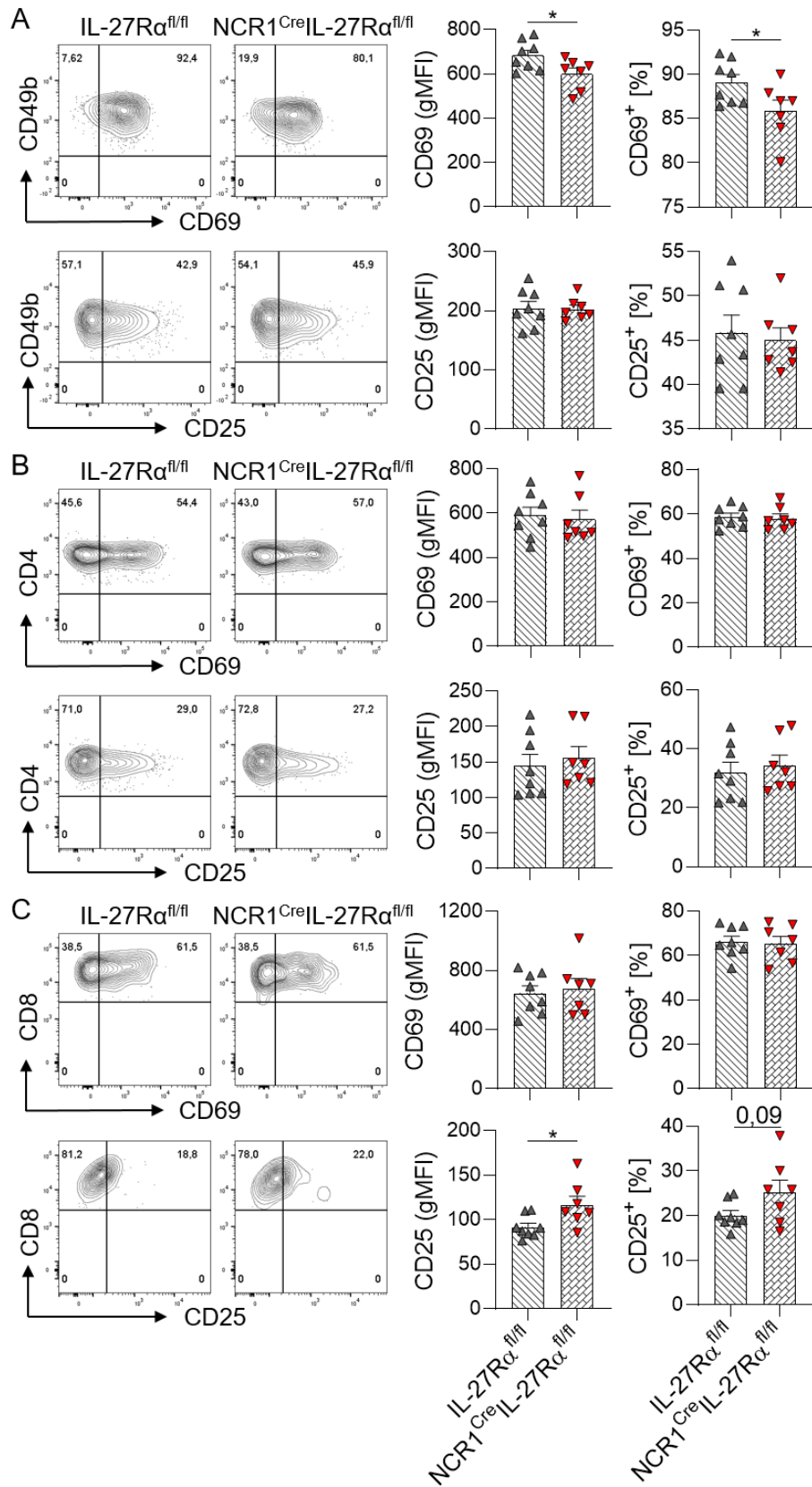


**Abbildung 37: CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse weisen keine signifikanten Gewichtsunterschiede während einer Infektion mit *Legionella pneumophila* auf.**

IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> und CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse (n=6 je Genotyp) wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert. Das Körpergewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von einer Woche täglich bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse. ns: nicht signifikant.

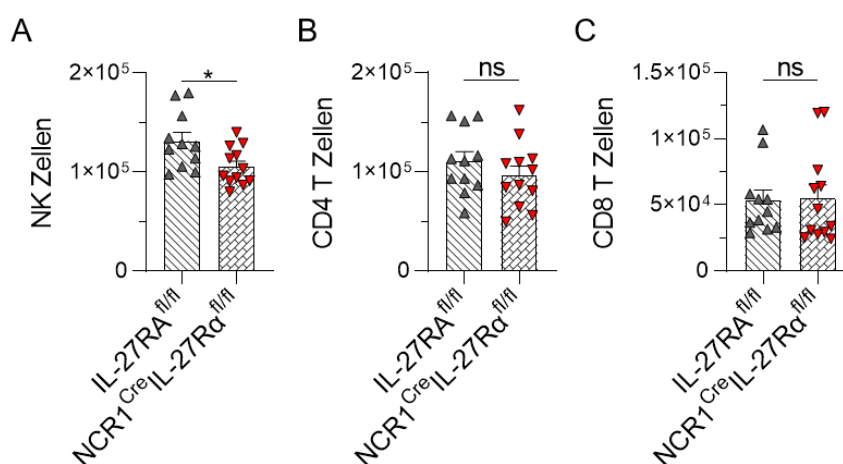
Aufgrund des erhöhten Gewichtsverlusts und der reduzierten BALF IFN $\gamma$  Konzentration in NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen (siehe Abbildung 35) wurde der Aktivierungsgrad von BALF NK und T Zellen 48 Stunden nach Infektion untersucht. NK Zellen, bei denen IL-27R $\alpha$  zellspezifisch deletiert war, exprimierten signifikant geringere Mengen des frühen Aktivierungsmarkers CD69 im Vergleich zu NK Zellen aus Kontrolltieren (Abbildung 38A). Ebenso war der Anteil CD69 positiver NK Zellen signifikant reduziert. Für die Expression von CD25 konnten keine Unterschiede beobachtet werden. CD4<sup>+</sup> T Zellen aus NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen wiesen keine Unterschiede in der Expression der beiden Aktivierungsmarker CD69 und CD25 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 38B). Bei CD8<sup>+</sup> T Zellen aus NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen konnte eine erhöhte Expression von CD25 detektiert werden (Abbildung 38C). Die Expression von CD69 war unverändert.

Die absoluten Zellzahlen von NK und T Zellen in den Lungen infizierter NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse und Kontrolltiere wurden 48 Stunden nach Infektion quantifiziert. In Mäusen mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  war die Anzahl von NK Zellen signifikant reduziert (Abbildung 39A). Die Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen war dagegen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (Abbildung 39B+C).



**Abbildung 38: NK Zellen in der BALF von infizierten  $NCR1^{Cre}IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mäusen zeigen eine reduzierte Expression des Aktivierungsmarkers CD69.**

$IL-27R\alpha^{fl/fl}$  und  $NCR1^{Cre}IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert ( $IL-27R\alpha^{fl/fl}$ : n=8,  $NCR1^{Cre}IL-27R\alpha^{fl/fl}$ : n=7). (A-C) Die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf  $CD49b^+NCR1^+$  NK Zellen (A),  $CD3^+CD4^+$  T Zellen (B) und  $CD3^+CD8^+$  T Zellen (C) aus der BALF wurde 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der CD69 und CD25 Expression auf den jeweiligen Lymphozyten-Populationen sind dargestellt. Die Expression beider Aktivierungsmarker wurde anhand der gMFI quantifiziert und der Anteil an  $CD25^+$  und  $CD69^+$  Zellen wurde ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A-C). \*  $P < 0,05$ .



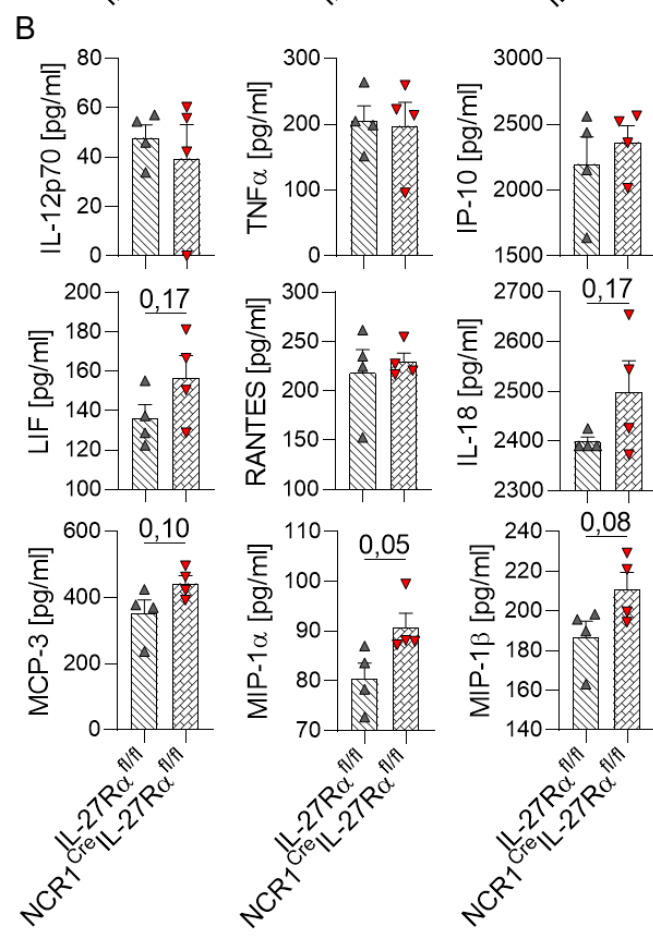
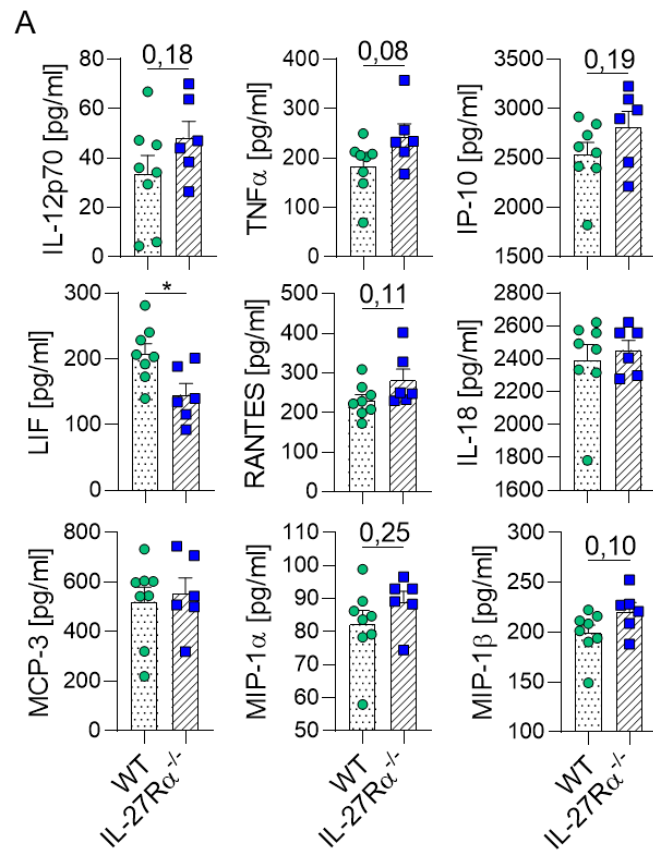
**Abbildung 39: Reduzierte Anzahl an NK Zellen in der Lunge von infizierten  $NCR1^{Cre}IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mäusen.**

$IL-27R\alpha^{fl/fl}$  und  $NCR1^{Cre}IL-27R\alpha^{fl/fl}$  Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert ( $IL-27R\alpha^{fl/fl}$ : n=11,  $NCR1^{Cre}IL-27R\alpha^{fl/fl}$ : n=12). (A-C) NK Zellen (A),  $CD4^+$  T Zellen (B) und  $CD8^+$  T Zellen (C) in den Lungen infizierter Mäuse wurden 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A-C). \*  $P < 0,05$ , ns: nicht signifikant.

Die induzierte Immunantwort in infizierten Mäusen mit globalem IL-27R $\alpha$  Knockout oder konditionalem Knockout in NK Zellen wurde weiter untersucht. Mittels Multiplex Immunoassay wurde die Konzentration von 26 Chemokinen und Zytokinen in der BALF von 2 Tage infizierten Mäusen gemessen.

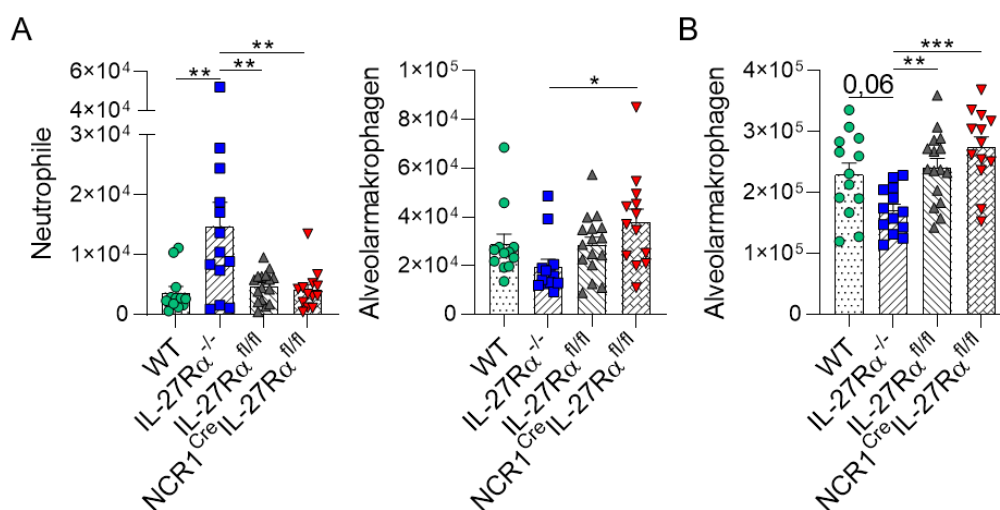
In IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen war die Konzentration von IL-12p70 und TNF $\alpha$  im Trend gegenüber der von Wildtyp-Kontrollen erhöht (Abbildung 40A). Die Konzentration des *Leukemia inhibitory factor* (LIF) war dagegen signifikant reduziert. Trends zu einer erhöhten Konzentration in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen konnten zudem für die Chemokine IP-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  festgestellt werden. In NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen war dagegen der Trend zu höheren IL-12p70, TNF $\alpha$ , RANTES und IP-10 Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu beobachten (Abbildung 40B). Wie in der BALF von Mäusen mit globaler IL-27R $\alpha$  Defizienz waren in NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen die MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  Konzentrationen tendenziell erhöht. Zudem zeigten IL-18 und MCP-3 eine im Trend höhere Konzentration. Entgegengesetzt zu der Regulation in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen war die Konzentration von LIF in der BALF von Mäusen mit konditionalem IL-27R $\alpha$  Knockout in NK Zellen ebenfalls im Trend erhöht.

Aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen hinsichtlich ihrer BALF Chemokin- und Zytokinkonzentrationen wurden auch die Zellzahlen von rekrutierten Neutrophilen und ortsständigen Alveolarmakrophagen untersucht. In der BALF von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen konnten 7 Tage nach Infektion signifikant höhere Neutrophilen-Zellzahlen festgestellt werden (Abbildung 41A). Zwischen Wildtyp, IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen waren dagegen keine Unterschiede zu beobachten. Darüber hinaus war die Anzahl von Alveolarmakrophagen in der BALF von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert. Auch in der Lunge von infizierten IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen konnten signifikant weniger Alveolarmakrophagen detektiert werden (Abbildung 41B). NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigten dagegen einen gegenläufigen Trend zu erhöhten Alveolarmakrophagen-Zellzahlen im Vergleich zu Wildtyp und IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Kontrollen.



### Abbildung 40: Konzentrationen von Chemokinen und Zytokinen in BALF nach Infektion mit *Legionella pneumophila*.

WT, IL-27R $\alpha^{-/-}$ , IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert. BALF wurde 48h nach Infektion isoliert und die Konzentrationen von 26 Zytokinen und Chemokinen wurden mittels Multiplex Immunoassay bestimmt. Das Ergebnis von 9 ausgewählten Zytokinen und Chemokinen für WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse (**A**, WT: n=8, IL-27R $\alpha^{-/-}$ : n=6) und für IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse (**B**, IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ : n=4, NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$ : n=4) ist dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (**A+B**). \* P<0,05.



### Abbildung 41: Zellzahlen in BALF und Lunge 7 Tage nach *Legionella pneumophila* Infektion.

WT (n=13), IL-27R $\alpha^{-/-}$  (n=13), IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  (n=16) und NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  (n=13) Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert. BALF (**A**) und Lungen (**B**) der infizierten Tiere wurden 7 Tage nach Infektion isoliert. Neutrophile und Alveolarmakrophagen wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (**A+B**). \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

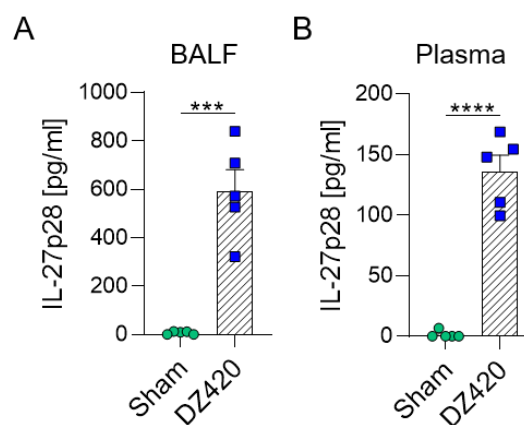
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *Legionella pneumophila* in Mäusen mit globaler IL-27R $\alpha$  Defizienz einen milderen Infektionsverlauf verursachte. Der Gewichtsverlust war in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu Kontrolltieren. Einhergehend mit erhöhten Plasmaspiegeln von IFN $\gamma$  in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen war auch die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf NK und T Zellen signifikant erhöht. Die Anzahl an NK und T Zellen war 48 Stunden nach Infektion in der Lunge von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen dagegen signifikant reduziert. Darüber hinaus war die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-12p70 und TNF $\alpha$  in der BALF von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen als nicht signifikanter Trend geringfügig erhöht. Die Anzahl von Neutrophilen in BALF und Lunge war in IL-27R $\alpha$  defizienten Mäusen eine Woche nach Infektion signifikant erhöht. Die Anzahl an Alveolarmakrophagen war dagegen reduziert.

Konditionale Knockout-Stämme mit spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  in NK und/oder CD8<sup>+</sup> T Zellen konnten erfolgreich generiert werden. Während CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse und CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse keine Unterschiede im Schweregrad der Infektion zeigten, resultierte die Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  auf NK Zellen in einem erhöhten Gewichtsverlust. Die IFN $\gamma$  Konzentrationen in der BALF von NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen waren signifikant reduziert und NK Zellen exprimierten signifikant weniger CD69. Wie in Mäusen mit einer globalen Defizienz von IL-27R $\alpha$  war auch in NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen die Anzahl an NK Zellen in der Lunge reduziert. Die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen war dagegen unverändert.

### 3.5 Überlebensstudien mit *Legionella longbeachae*

Da *Legionella pneumophila* in C57BL/6 Mäusen nur milde Krankheitsverläufe verursacht [157], wurden im Folgenden Infektionsexperimente mit *Legionella longbeachae* durchgeführt. Im Gegensatz zu *Legionella pneumophila* sind Legionellen der Art *longbeachae* verkapselte Erreger ohne bakterielle Flagellen, welche hierdurch den schnellen und protektiven pyroptotischen Zelltod der infizierten Makrophagen unterlaufen. *Legionella longbeachae* weisen damit eine deutlich erhöhte Virulenz gegenüber C57BL/6 Mäusen auf und können auch letale Infektionsverläufe hervorrufen [238].

Zunächst wurde erneut überprüft, ob IL-27 Expression auch im Rahmen einer Infektion mit *Legionella longbeachae* induziert wird. C57BL/6 Mäuse wurden dazu intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs von *Legionella longbeachae* Stamm DZ420 infiziert. BALF und Plasma wurden 48 Stunden nach Infektion isoliert. Sowohl in der BALF ([Abbildung 42A](#)) als auch im Plasma ([Abbildung 42B](#)) konnte eine signifikante Stimulation der IL-27 Freisetzung im Vergleich zu scheinbehandelten Mäusen festgestellt werden.



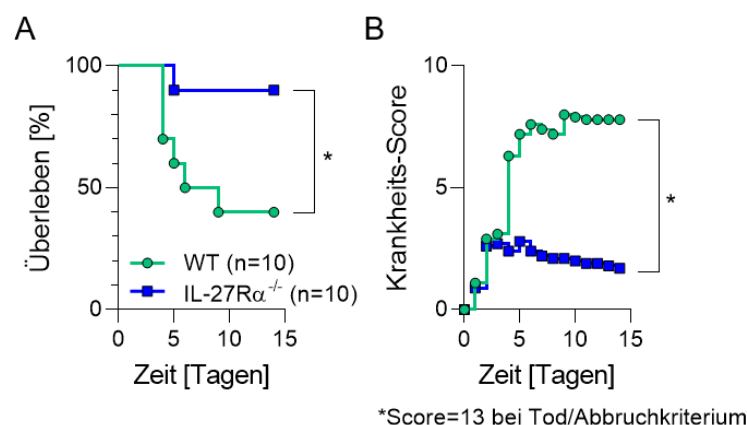
**Abbildung 42: *Legionella longbeachae* induziert IL-27 Expression *in vivo*.**

C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs *Legionella longbeachae* Stamm DZ420 infiziert (n=5) oder erhielten eine äquivalente Menge steriles PBS als Scheinbehandlung (n=5). BALF (A) und Plasma (B) wurden 48h nach Infektion isoliert und die IL-27p28 Konzentration wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A+B). \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001.

### 3.5.1 IL-27R $\alpha^{-/-}$ Mäuse haben ein besseres Überleben nach einer Infektion mit *Legionella longbeachae*

Um die biologische Relevanz von IL-27/IL-27R $\alpha$  Signalwegen für den Verlauf einer Legionellen-Infektion zweifelsfrei nachzuweisen, wurde das Überleben von WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen als aussagekräftiger Endpunkt betrachtet.

WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs von *Legionella longbeachae* Stamm DZ420 infiziert. In der Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  war das Überleben der infizierten Mäuse im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen signifikant höher (9/10 bei IL-27R $\alpha^{-/-}$  gegenüber 4/10 bei WT, [Abbildung 43A](#)). Ebenso wurde täglich der Allgemeinzustand, die Augen, das Spontanverhalten, die Atmung, die Haltung sowie das Reaktionsverhalten der Mäuse auf externe Stimuli untersucht und ein kumulativer Krankheits-Score erstellt. IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse wiesen einen signifikant geringeren Krankheits-Score im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ([Abbildung 43B](#)).

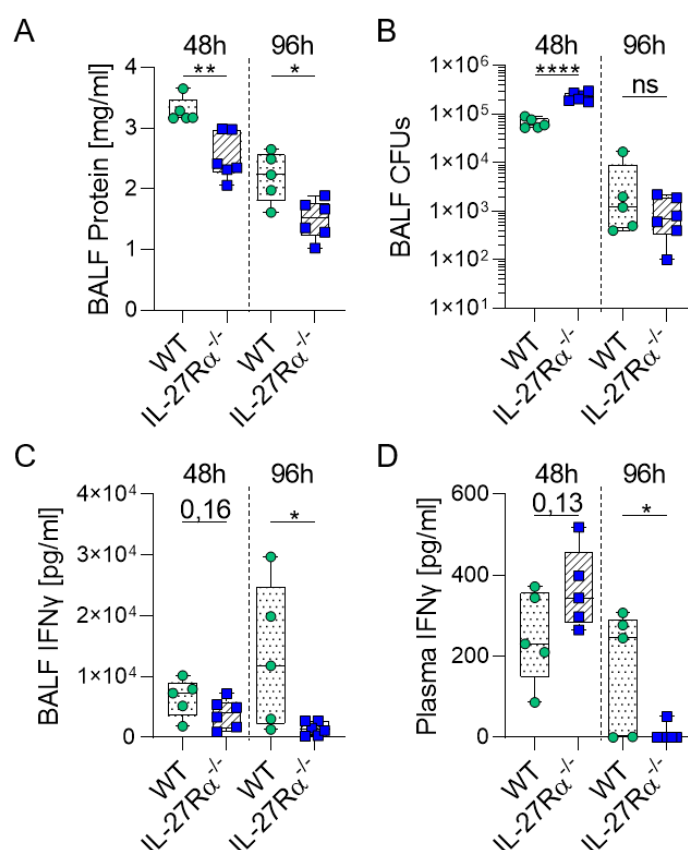


#### Abbildung 43: IL-27R $\alpha$ defiziente Mäuse haben ein besseres Überleben während einer Infektion mit *Legionella longbeachae*.

(A+B) WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs DZ420 infiziert (n=10 je Genotyp). Das Überleben (A) und der Krankheits-Score (B) der infizierten Mäuse wurden über 14 Tage ermittelt. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve wurde mittels Log-rank Test analysiert (A). Die statistische Auswertung des Krankheits-Scores erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (B). \* P<0,05.

Zur tiefergehenden Charakterisierung des Infektionsgeschehens wurden der induzierte Lungenschaden, die Anzahl bakterieller Kolonien sowie die IFN $\gamma$  Konzentration in BALF und Plasma von WT und IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen 48 Stunden und 96 Stunden nach Infektion untersucht.

Die Gesamt-Proteinkonzentration in der BALF wurde als Indikator für den im Rahmen der Infektion induzierten Lungenschaden verwendet. IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse wiesen sowohl 48 Stunden als auch 96 Stunden nach Infektion eine signifikant geringere Proteinmenge in der BALF auf als Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 44A). Die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF war 48 Stunden nach Infektion in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 44B). 96 Stunden nach Infektion waren dagegen keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Während die IFN $\gamma$  Konzentration zum frühen Zeitpunkt der Infektion in der BALF von IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen im Trend leicht reduziert war, wies das Plasma der Tiere eine höhere IFN $\gamma$  Konzentration auf (Abbildung 44C+D). Nach 96 Stunden waren die IFN $\gamma$  Konzentrationen in BALF und Plasma von IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen weitestgehend auf einen homöostatischen Ausgangszustand zurückgekehrt. In BALF und Plasma von WT Mäusen waren dagegen auch zum späten Zeitpunkt signifikant höhere IFN $\gamma$  Mengen detektierbar (Abbildung 44C+D).



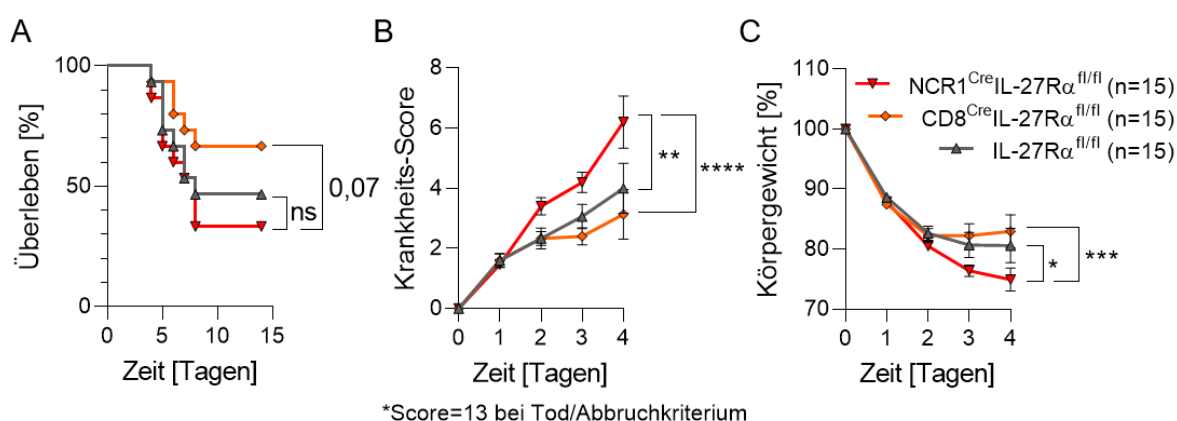
**Abbildung 44: IL-27R $\alpha$  defiziente Mäuse haben einen reduzierten Lungenschaden während einer Infektion mit *Legionella longbeachae*.**

WT und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs DZ420 infiziert (WT: n=5, IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup>: n=6). BALF und Plasma wurden 48h bzw. 96h nach Infektion isoliert. (A+B) Die Gesamtprotein-Konzentration in der BALF wurde mittels Bradford-Test gemessen (A) und die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF wurde durch Kultivieren von seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten bestimmt (B). (C+D) Die IFN $\gamma$  Konzentration wurde in der BALF (C) und im Plasma (D) mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind als Box-Plot mit Median, Interquartilenabstand und Spannweite dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A-D). \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\*\* P<0,0001, ns: nicht signifikant.

### 3.5.2 NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigen einen schwereren Krankheitsverlauf in der Frühphase einer Infektion mit *Legionella longbeachae*

Auch das Überleben von Mäusen mit konditionalem IL-27R $\alpha$  Knockout in NK Zellen oder zytotoxischen T Zellen wurde untersucht.

NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> und CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse sowie IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Kontrollmäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs von *Legionella longbeachae* Stamm DZ420 infiziert. Mäuse mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  wiesen keine signifikanten Unterschiede im Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (5/15 bei NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> gegenüber 7/15 bei IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>, Abbildung 45A). Mäuse mit CD8<sup>+</sup> T Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  zeigten dagegen ein im Trend besseres Überleben als NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse (10/15 bei CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>). Zudem wurde der Krankheits-Score und der Gewichtsverlust infizierter Mäuse ermittelt. In der Frühphase der Infektion (bis Tag 4) wiesen NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse einen signifikant höheren Krankheits-Score (Abbildung 45B) und einen signifikant größeren Gewichtsverlust (Abbildung 45C) im Vergleich zu beiden anderen Gruppen auf. Zwischen CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen und der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

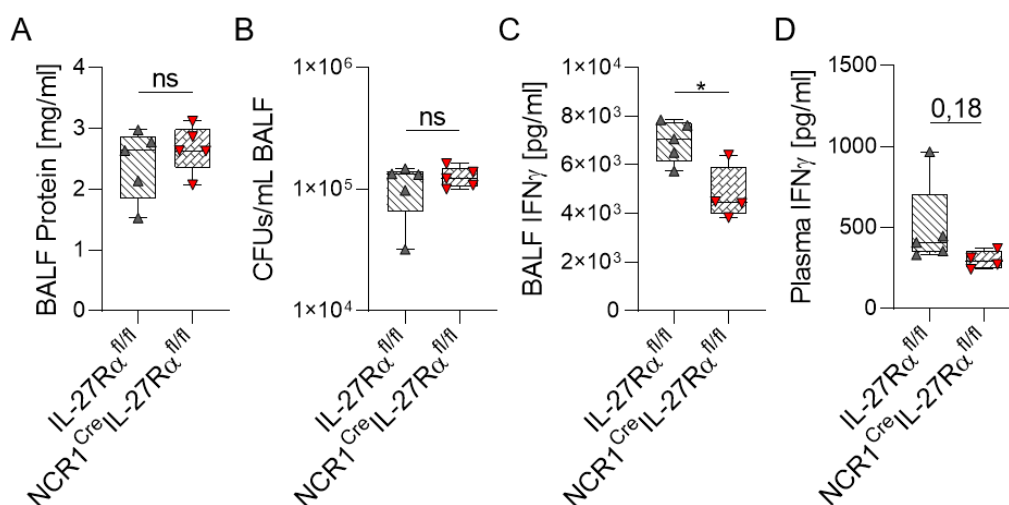


**Abbildung 45: Mäuse mit NK Zell-spezifischer IL-27R $\alpha$  Defizienz zeigen einen schlechteren Krankheitsverlauf in der Frühphase einer Infektion mit *Legionella longbeachae*.**

(A-C) IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>, NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> und CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs DZ420 infiziert (n=15 je Genotyp). Das Überleben (A), der Krankheits-Score (B) und der Gewichtsverlust (C) der infizierten Mäuse wurden über 14 Tage ermittelt. Krankheits-Score und Körpergewicht sind bis Tag 4 nach Infektion dargestellt. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve wurde mittels Log-rank Test analysiert (A). Die statistische Auswertung des Krankheits-Scores und des Gewichtsverlusts erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (B+C). \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001, ns: nicht signifikant.

Aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen  $\text{NCR1}^{\text{Cre}}\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  Mäusen in der Frühphase der Infektion wurde die Rolle der NK Zell-spezifischen IL-27 vermittelten Signalwege weiter untersucht.

Der Lungenschaden, die Anzahl bakterieller Kolonien sowie die IFN $\gamma$  Konzentration in BALF und Plasma von infizierten Mäusen wurde 48 Stunden nach Infektion bestimmt. Die Gesamt-Proteinkonzentration in der BALF von  $\text{NCR1}^{\text{Cre}}\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 46A). Ebenso war die Anzahl der bakteriellen Kolonien in der BALF unverändert (Abbildung 46B). Hinsichtlich der freigesetzten IFN $\gamma$  Konzentration konnte eine signifikant geringere Menge in der BALF von Mäusen mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  nachgewiesen werden (Abbildung 46C). Auch im Plasma war ein klarer Trend zu reduzierten IFN $\gamma$  Spiegeln in  $\text{NCR1}^{\text{Cre}}\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  Mäusen erkennbar (Abbildung 46D).



**Abbildung 46:  $\text{NCR1}^{\text{Cre}}\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  Mäuse weisen keinen erhöhten Lungenschaden während einer Infektion mit *Legionella longbeachae* auf.**

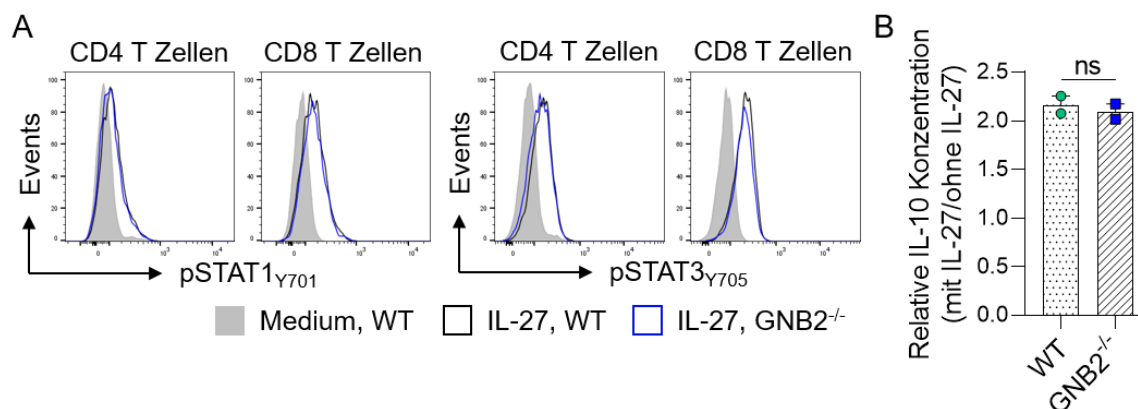
$\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{NCR1}^{\text{Cre}}\text{IL-27R}\alpha^{\text{fl/fl}}$  Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^6$  CFUs DZ420 infiziert (n=5 je Genotyp). BALF und Plasma wurden 48h nach Infektion isoliert. (A+B) Die Gesamtprotein-Konzentration in der BALF wurde mittels Bradford-Test gemessen (A) und die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF wurde durch Kultivieren von seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten bestimmt (B). Die IFN $\gamma$  Konzentration in der BALF (C) und im Plasma (D) wurde 48h nach Infektion mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind als Box-Plot mit Median, Interquartilenabstand und Spannweite dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (A-D). \*  $P < 0,05$ , ns: nicht signifikant.

Insgesamt bestätigten die Infektionsexperimente mit *Legionella longbeachae* die vorangegangenen Befunde bei mild-symptomatischen Infektionen. IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse zeigten ein deutlich besseres Überleben als Wildtyp-Kontrollen und wiesen im Verlauf der Infektion einen signifikant besseren allgemeinen Gesundheitszustand mit einem reduzierten Lungenschaden auf. Ebenso konnten 48 Stunden nach Infektion erhöhte Plasmaspiegel von IFN $\gamma$  in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen detektiert werden. Mäuse mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  präsentierten einen entgegengesetzten Phänotyp. Sie wiesen in den ersten Tagen der Infektion einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust und Krankheits-Score sowie signifikant reduzierte BALF IFN $\gamma$  Konzentrationen auf. CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigten ein geringfügig verbessertes Überleben und ähnelten damit dem Phänotyp von Mäusen mit globaler IL-27R $\alpha$  Defizienz.

### 3.6 GNB2 reguliert die Expression von IL-27p28 in Makrophagen

GNB2 ist eine  $\beta$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen und als solche an der transmembranen Signaltransduktion beteiligt [226]. Darüber hinaus wird GNB2 in frei verfügbaren Interaktionsdatenbanken als Bindungspartner von IL-27R $\alpha$  beschrieben [237]. Eine mögliche regulatorische Funktion von GNB2 in IL-27 induzierten Signalwegen wurde daher in T Zellen untersucht.

Splenozyten aus Wildtyp und GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen wurden *in vitro* für 45 Minuten mit rekombinantem murinen IL-27 stimuliert. In GNB2 defizienten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen induzierte IL-27 eine Phosphorylierung von STAT1<sub>Y701</sub> und STAT3<sub>Y705</sub>, die der von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen aus Wildtyp-Kontrollen vergleichbar war (Abbildung 47A). Als weiterer Endpunkt wurde die IL-10 Konzentration in Zellkulturüberständen von Wildtyp und GNB2<sup>-/-</sup> Splenozyten 48 Stunden nach  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Stimulation von T Zellen in An- und Abwesenheit von IL-27 betrachtet. Die IL-27 vermittelte Induktion von IL-10 betrug in etwa den Faktor 2,1 und war unverändert zwischen aktivierten Wildtyp und GNB2 defizienten T Zellen (Abbildung 47B).

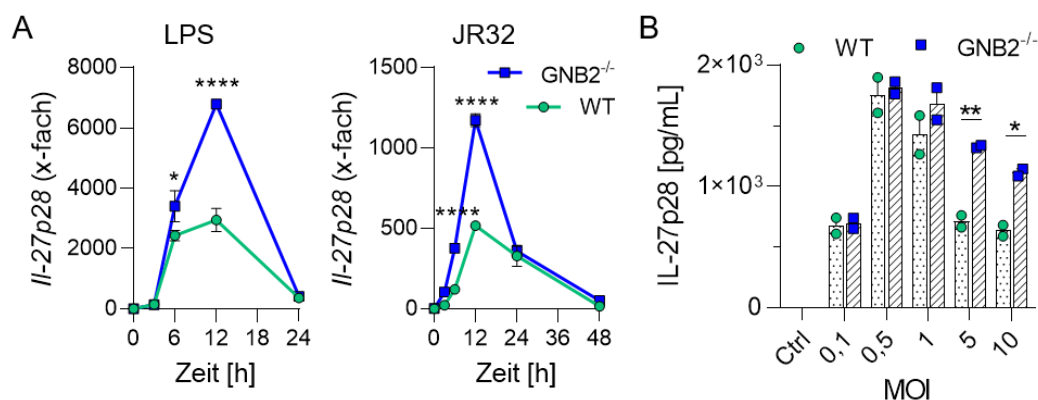


**Abbildung 47: Die IL-27 vermittelte STAT-Phosphorylierung und IL-10 Induktion ist unverändert in GNB2 defizienten T Zellen.**

Die Milz naiver WT und GNB2<sup>-/-</sup> Mäuse (n=3 je Genotyp) wurde isoliert und Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt. (A) Isolierte Splenozyten wurden für 45 Minuten *in vitro* mit rekombinantem IL-27 [10ng/ml] stimuliert und verschiedene STAT-Phosphorylierungsstellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen (TCR $\beta$ <sup>+</sup>) sind dargestellt. (B) Splenozyten wurden für 48h mit plattengebundenem  $\alpha$ -CD3 [2 $\mu$ g/ml] und gelöstem  $\alpha$ -CD28 [2 $\mu$ g/ml] in An- und Abwesenheit von 20ng/ml IL-27 stimuliert und die IL-10 Konzentration in zellfreiem Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die IL-27 vermittelte Induktion ist als Quotient der IL-10 Konzentrationen in An- und Abwesenheit von IL-27 dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (B). ns: nicht signifikant.

Öffentlich einsehbare Datensätze (z.B. Human Protein Atlas) zur Expression von GNB2 in murinen Lungen und in humanen PBMCs belegen eine hohe Expression von GNB2 in myeloiden Zellen (Neutrophile, Alveolarmakrophagen, Dendritische Zellen, Monozyten) im Besonderen. Aufgrund dieser Befunde wurde die Rolle von GNB2 in Makrophagen im Rahmen der *Legionella pneumophila* induzierten IL-27 Freisetzung untersucht.

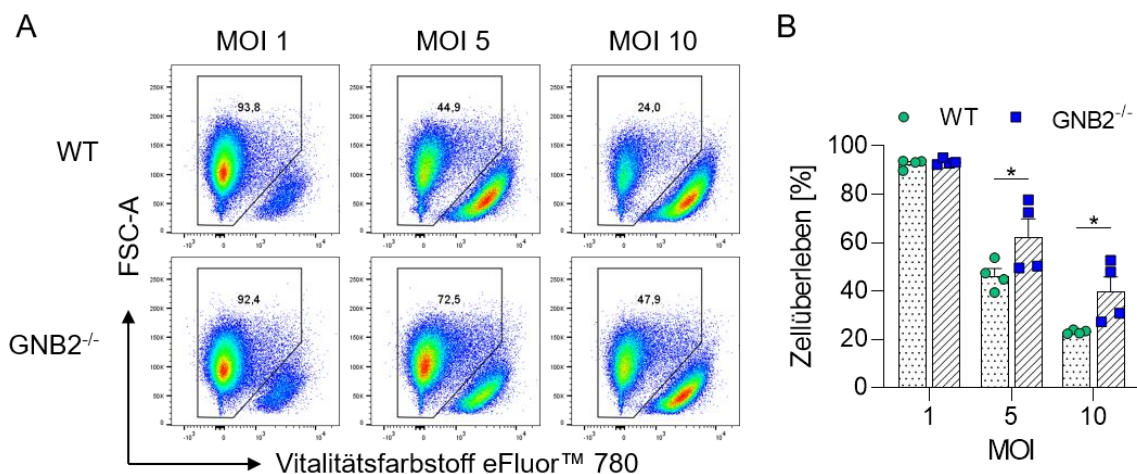
Wildtyp und GNB2 defiziente BMDMs wurden *in vitro* mit *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert oder mit bakteriellem LPS stimuliert. In Abwesenheit von GNB2 war die Expression von *Il-27p28* 6 Stunden und 12 Stunden nach Stimulation signifikant erhöht (Abbildung 48A). Auch auf Proteinebene konnte eine signifikant erhöhte IL-27p28 Freisetzung in GNB2 defizienten BMDMs nach Infektion mit *Legionella pneumophila* mit MOI=5 oder MOI=10 beobachtet werden (Abbildung 48B).



**Abbildung 48: GNB2 reguliert die Expression von IL-27p28 in BMDMs nach LPS-Stimulation und Infektion mit *Legionella pneumophila*.**

(A) WT und GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs wurden *in vitro* mit LPS [100ng/ml] stimuliert oder mit *Legionella pneumophila* JR32 (MOI=1) infiziert. Die Genexpression von *Il-27p28* wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qPCR analysiert. (B) WT und GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs wurden für 24h mit verschiedenen MOIs von *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert. Die IL-27p28 Konzentration in zellfreien Kulturüberständen wurde mittels ELISA gemessen. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt je drei unabhängigen Wiederholungen ist dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (A+B). \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\*\* P<0,0001, MOI: Multiplicity of infection.

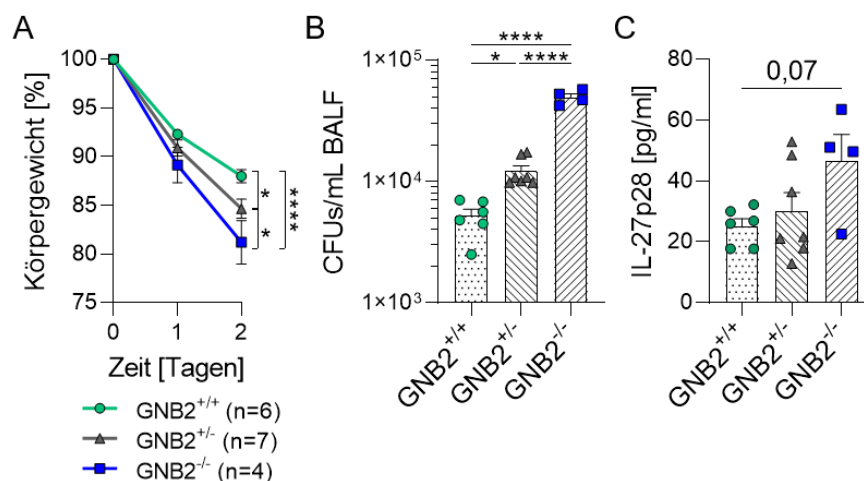
Neben der Expression von IL-27p28 wurde auch das Überleben von GNB2 defizienten BMDMs nach *Legionella pneumophila* Infektion betrachtet. Dafür wurden Wildtyp und GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs *in vitro* für 24 Stunden mit verschiedenen MOIs von JR32 infiziert und der Anteil lebender Zellen wurde mithilfe des Vitalitätsfarbstoff eFluor™ bestimmt. Nach einer Infektion mit einer MOI=1 betrug das Überleben von Wildtyp und GNB2 defizienten BMDMs gleichermaßen über 90% (Abbildung 49A). Höhere Infektionsdosen (MOI=5, MOI=10) resultierten dagegen in einer massiven Induktion von Zelltod. In der Abwesenheit von GNB2 war das Zellüberleben unter diesen Bedingungen signifikant erhöht (Abbildung 49B).



**Abbildung 49: GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs haben ein erhöhtes Überleben nach *Legionella pneumophila* Infektion.**

WT und GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs wurden *in vitro* für 24h mit verschiedenen MOIs von *Legionella pneumophila* Stamm JR32 infiziert. Das Zellüberleben wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Ein repräsentativer Plot je Infektionsbedingung von insgesamt zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei biologischen Replikaten ist dargestellt. (B) Der Anteil an lebenden BMDMs wurde als Anteil eFluor™ 780 negativer Zellen quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (B). \* P<0,05.

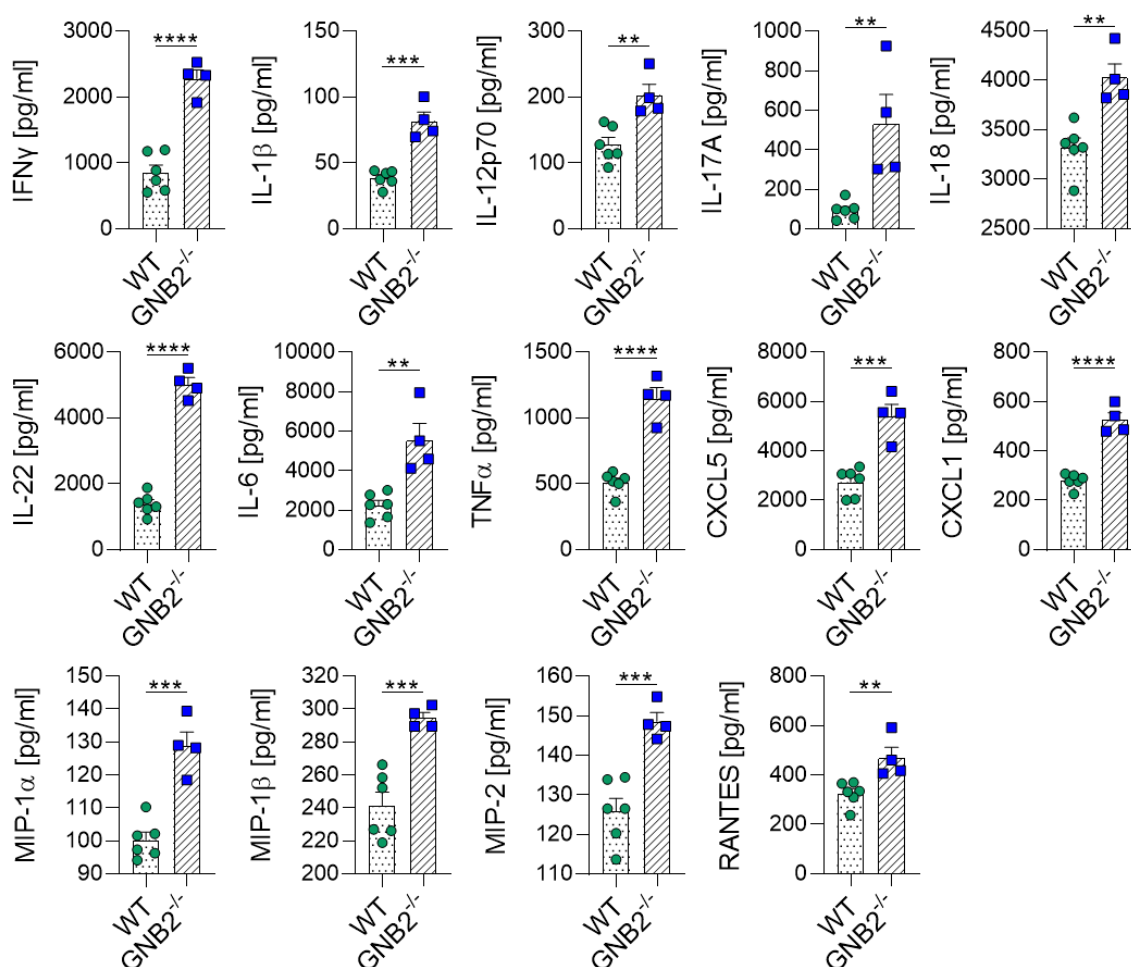
Die Rolle von GNB2 wurde weiter im etablierten Infektionsmodell mit *Legionella pneumophila* untersucht. GNB2<sup>-/-</sup>, heterozygote GNB2<sup>+/-</sup> Mäuse sowie Wildtyp-Kontrollen (GNB2<sup>+/+</sup>) wurden intranasal mit 1x10<sup>6</sup> CFUs JR32 infiziert. GNB2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten an Tag 2 nach Infektion einen signifikant erhöhten Verlust von Körpergewicht im Vergleich zu heterozygoten Mäusen oder Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 50A). In heterozygoten Mäusen war der Gewichtsverlust ebenfalls signifikant größer als bei der Kontrollgruppe. Darüber hinaus wies die BALF von GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen 48 Stunden nach Infektion eine signifikant erhöhte Anzahl bakterieller Kolonien auf (Abbildung 50B). Bereits in heterozygoten Mäusen war die bakterielle Last in der BALF im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. In der BALF von GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen war zudem ein deutlicher Trend zu einer erhöhten IL-27p28 Konzentration erkennbar (Abbildung 50C).



**Abbildung 50: GNB2 defiziente Mäuse haben einen schwereren Krankheitsverlauf nach Infektion mit *Legionella pneumophila*.**

WT (n=6), GNB2<sup>+/-</sup> (n=7) und GNB2<sup>-/-</sup> (n=4) Mäuse wurden intranasal mit 1x10<sup>6</sup> CFUs JR32 infiziert. **(A)** Das Körpergewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 2 Tagen täglich bestimmt. **(B+C)** BALF wurde 48 Stunden nach Infektion isoliert. **(B)** Die Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF wurde durch Kultivieren von seriellen Verdünnungen auf CYE-Agarplatten bestimmt. **(C)** Die IL-27p28 Konzentration in zellfreier BALF wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse **(A)** oder einfacher Varianzanalyse **(B+C)**. \* P<0,05, \*\*\*\* P<0,0001.

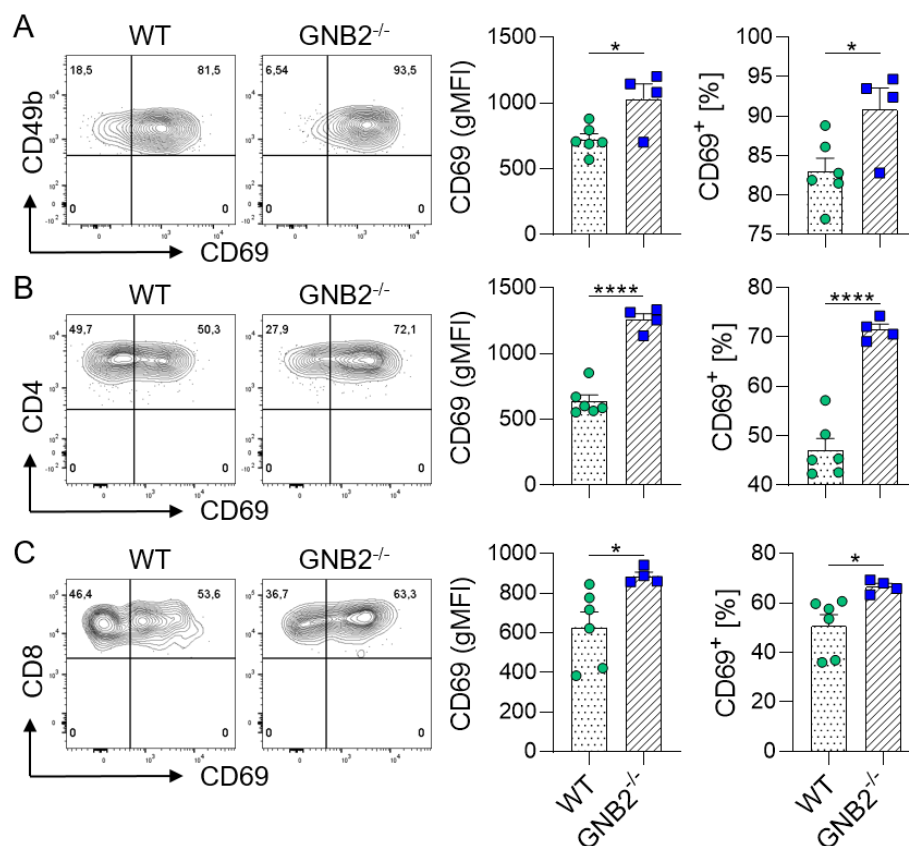
Neben IL-27p28 wurde die Konzentration von 26 weiteren Chemokinen und Zytokinen in der BALF von infizierten Wildtyp und GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen 48 Stunden nach Infektion mittels Multiplex Immunoassay gemessen. In GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen war die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-6 und TNF $\alpha$  signifikant erhöht (Abbildung 51). Ebenso wiesen zahlreiche Chemokine (CXCL1, CXCL5, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES) signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.



**Abbildung 51: Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen in der BALF von WT und GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen nach *Legionella pneumophila* Infektion**

WT (n=6) und GNB2<sup>-/-</sup> (n=4) Mäuse wurden intranasal mit 1x10<sup>6</sup> CFUs JR32 infiziert. BALF wurde 48h nach Infektion isoliert und die Konzentrationen von 26 Zytokinen und Chemokinen wurden mittels Multiplex Immunoassay bestimmt. Das Ergebnis von 14 ausgewählten Zytokinen und Chemokinen ist dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test. \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001.

Auf zellulärer Ebene wurde zusätzlich der Aktivierungsgrad von rekrutierten NK Zellen und T Zellen 48 Stunden nach Infektion untersucht. In der BALF von GNB2 defizienten Mäusen war die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 dabei sowohl auf NK Zellen als auch auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen signifikant erhöht (Abbildung 52A-C). Ebenso war der Anteil CD69 positiver NK und T Zellen in GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 52: NK Zellen und T Zellen in der BALF von infizierten GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen weisen eine signifikant erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf.**

WT (n=6) und GNB2<sup>-/-</sup> (n=4) Mäuse wurden intranasal mit  $1 \times 10^6$  CFUs JR32 infiziert. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD49b<sup>+</sup>NCR1<sup>+</sup> NK Zellen (**A**), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen (**B**) und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T Zellen (**C**) aus der BALF wurde 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie untersucht. Repräsentative Histogramme der CD69 Expression auf den jeweiligen Lymphozyten-Populationen sind dargestellt. Die Expression von CD69 wurde anhand des gMFI quantifiziert und der Anteil an CD69<sup>+</sup> Zellen wurde ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (**A-C**). \* P<0,05, \*\*\*\* P<0,0001.

## 4 Diskussion

IL-27 ist ein heterodimeres Zytokin der IL-12 Familie mit sowohl proinflammatorischen als auch anti-inflammatorischen Funktionen [7, 32]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Beteiligung von zellspezifischen IL-27/IL-27R $\alpha$  Signalwegen bei Infektionen mit *Legionella pneumophila* und *Legionella longbeachae* im Mausmodell untersucht. Ebenso konnte erstmals in humanen Proben von Patienten mit Legionärskrankheit ein Anstieg von IL-27 gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Rolle der G Protein  $\beta$ -Untereinheit GNB2 an der Regulation von IL-27 induzierten Signalwegen und während der Legionellen-Infektion betrachtet.

### 4.1 Zellspezifische Untersuchungen der Expression von IL-27R $\alpha$ und IL-27 induzierter Signalwege

Die Expression der Zytokin-spezifischen Rezeptorkette IL-27R $\alpha$  wurde bereits in verschiedenen Immunzellpopulationen und nicht-hämatopoetischen Gewebezellen beschrieben [2, 45-47, 249]. Die Aussagekraft dieser Studien ist dabei in vielen Fällen dahingehend begrenzt, dass entweder lediglich *Il-27 $\alpha$*  Gen-Expression oder aber die Expression auf Proteinebene mittels Western Blot in heterogenen Zelllysaten betrachtet wurde. Als Ausgangspunkt für eine Charakterisierung zellspezifischer Funktionen wurde daher zunächst die Expression von IL-27R $\alpha$  in C57BL/6 Mäusen mittels Durchflusszytometrie und unter Verwendung eines spezifischen PE-markierten Antikörpers systematisch auf Einzelzellebene untersucht. Sämtliche untersuchten Lymphozyten-Populationen in primären (Knochenmark) und sekundären lymphatischen Organen (Milz, periphere Lymphknoten) exprimierten IL-27R $\alpha$  auf ihrer Oberfläche. Die Expression war dabei in  $\gamma\delta$  T Zellen und CD8<sup>+</sup> T Zellen am höchsten, gefolgt von CD4<sup>+</sup> T Zellen und NK Zellen. Auch ILCs wiesen eine hohe Expression von IL-27R $\alpha$  auf. Auf B Zellen war IL-27R $\alpha$  dagegen nur vergleichsweise schwach exprimiert. Die Beobachtungen einer hohen IL-27R $\alpha$  Expression auf Lymphozyten sind wenig überraschend und stimmen mit den frühen Publikationen, dass IL-27 ein Zytokin mit wichtigen Funktionen bei ablaufenden T Zell-Antworten darstellt, überein [44, 60]. Sie stützen damit die These, dass in Mäusen Immunzellen der lymphozytären Linie die primären zellulären Responder für IL-27 vermittelte Immunantworten sind, wohingegen myeloide Zellen (insbesondere APCs wie Makrophagen und Dendritische Zellen) die primären zellulären Quellen von IL-27 Expression darstellen [4, 27].

Aufgrund der komplexen immunmodulatorischen Natur von IL-27, welches Kontext-abhängig entweder Immunantworten stimulieren oder auch inhibieren kann, wurde die Fragestellung nach zellspezifisch induzierten Signalwegen als zellulärem Mechanismus der Kontext-abhängigen Funktionen von IL-27 untersucht. Die Stimulation von Lymphozyten aus der Milz oder dem Knochenmark mit rekombinantem murinen IL-27 resultierte sowohl in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen als auch in CD27<sup>+</sup> NK Zellen und B Zellen in der Phosphorylierung und Aktivierung von STAT1 und STAT3 Signalmolekülen. Interessanterweise zeigten sich reife CD11b<sup>+</sup> NK Zellen, welche in der Milz einen Anteil von über 60% der gesamten NK Zellen ausmachten, nicht IL-27 responsiv. Als naheliegende Erklärung konnte eine Herunterregulation der signaltransduzierenden gp130 Rezeptoruntereinheit in reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellen identifiziert werden. In CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen wurde bereits ein ähnlicher Mechanismus zur Regulation von IL-27 Responsivität beschrieben [250]. In viralen Infektionsstudien sekretierten CD8<sup>+</sup> T Zellen IL-10 im Rahmen des Erstkontakts mit dem Virus. In Übereinstimmung mit der Herunterregulation von gp130 produzierten CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen kein IL-10 bei einer späteren Re-Infektion. Die retrovirale Expression von gp130 stellte die IL-27 Responsivität und die CD8<sup>+</sup> T Zell vermittelte IL-10 Expression dagegen wieder her [250]. Neben der Abwesenheit von gp130 auf reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellen wurde darüber hinaus auch eine signifikant geringere Expression von IL-27R $\alpha$  gegenüber CD27<sup>+</sup> NK Zellen festgestellt. Wenngleich in der Milz von naiven IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen und Wildtyp Kontrollen keine signifikanten Unterschiede im relativen Anteil unreifer CD27<sup>+</sup> und reifer CD11b<sup>+</sup> NK Zellen berichtet wurden [251], legt der Verlust der IL-27 Responsivität in naiven CD11b<sup>+</sup> NK Zellen die Vermutung nahe, dass IL-27 möglicherweise bei der Reifung von NK Zellen funktionell beteiligt sein könnte. Neben STAT Signalwegen wurde auch eine Induktion verschiedener MAP-Kinasen (ERK1/2, MEK1, p38) und AKT durch IL-27 in murinen Lymphozyten untersucht. In keiner der untersuchten Zellpopulationen konnte eine Phosphorylierung der betrachteten Signalmoleküle beobachtet werden. Im Gegensatz zu humanen Epithelzellen, in denen die Induktion von ERK1/2, p38 oder AKT Signalwegen durch IL-27 bereits beschrieben wurde [47, 51], beschränkte sich die Responsivität von murinen Lymphozyten bei den durchgeführten Arbeiten demnach auf STAT1 und STAT3 Signalwege. Wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese oder andere Signalwege unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen nicht doch durch IL-27 induziert werden könnten, stellt sich die Frage,

wie durch die Aktivierung der immer gleichen STAT1 und STAT3 Signalwege derart unterschiedliche Immunantworten hervorgerufen werden können. Verkompliziert wird die Frage zusätzlich dadurch, dass auch andere Zytokine wie IL-10, der Prototyp eines anti-inflammatorischen Zytokins oder IL-6, ein proinflammatorisches Zytokin, ebenfalls über STAT3 Signalwege ihre biologischen Funktionen vermitteln [252-254]. Ebenso induzieren sowohl das proinflammatorische IL-12 als auch das immunregulatorische IL-35 STAT4 Signalwege [4]. Als entscheidender Unterschied für die funktionelle Diversität der beiden Zytokine konnte das Auftreten von STAT1/STAT4 Heterodimeren nach IL-35 Stimulation nicht aber nach IL-12 Stimulation in T Zellen nachgewiesen werden [16]. In T Zellen induzierte IL-27 in der vorliegenden Arbeit STAT1 und STAT3 in vergleichbarem Ausmaß und auf Einzelzellebene korrelierte eine starke Phosphorylierung von STAT1 mit einer starken Phosphorylierung von STAT3 und umgekehrt. Ein Auftreten von STAT1/STAT3 Heterodimeren scheint in diesem Zusammenhang daher ebenfalls wahrscheinlich und wurde bereits an anderer Stelle nachgewiesen [255, 256]. Darüber hinaus belegen Transkriptionsstudien mit IL-27 und IL-6 stimulierten T Zellen, dass Dauer, Intensität und Komposition der STAT Signalwege zwischen beiden Zytokinen verschieden sind. STAT3 Homodimere und STAT1/STAT3 Heterodimere sind für die funktionelle Überschneidung des transkriptionellen Outputs von IL-27 und IL-6 verantwortlich, wohingegen STAT1 Homodimere eine IL-27 spezifische Gensignatur vermitteln [257, 258]. Eine kürzlich erschienene Studie mit humanen T Zellen bestätigt, dass eine länger andauernde Phosphorylierung von STAT1 durch IL-27 im Vergleich zu IL-6 bei vergleichbaren STAT3-Phosphorylierungsleveln für die unterschiedlichen biologischen Funktionen beider Zytokine verantwortlich ist [259]. Mithilfe von mathematischen Modellierungen zeigen die Autoren, dass STAT3 mit gp130 und STAT1 mit IL-27R $\alpha$  assoziiert und dass eine Mutation von Y613 bei IL-27R $\alpha$  in einer 80%igen Reduktion von STAT1 Phosphorylierung nicht aber von STAT3 resultiert. Eine starke IL-27R $\alpha$ /STAT1 Interaktion ist in diesem Zusammenhang für die Induktion eines exklusiv durch IL-27 induzierten genetischen Programms, charakterisiert durch IRF1 Expression und eine anhaltende STAT1 Phosphorylierung, verantwortlich [259]. Das heutige Verständnis über die Dynamik der verschiedenen STAT Signalwege wächst damit immer weiter über das lange Zeit geltende Dogma „Ein Zytokin, eine Funktion“ heraus [7]. Die Expressionslevel von Rezeptoruntereinheiten und STAT-Molekülen, die Affinität von Zytokinen und STATs zu den entsprechenden Rezeptorketten sowie die Bildung von

Homo- oder Heterodimeren tragen maßgeblich dazu bei, wie ein äußeres Signal durch Immunzellen interpretiert wird und liefern den Ansatz einer Erklärung für die funktionelle Vielfalt von IL-27 [257, 259].

Neben der Expression von IL-27R $\alpha$  auf Lymphozyten wurde auch die Expression des Rezeptors auf myeloiden Zellen betrachtet. Weder Neutrophile, Monozyten, Makrophagen noch Eosinophile aus Milz und Knochenmark exprimierten IL-27R $\alpha$ . Ebenso konnte keine Expression von IL-27R $\alpha$  auf LPS- oder IL-4 stimulierten BMDMs nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  zeigten BMDMs keine IL-27 Responsivität. IL-27 induzierte weder STAT Phosphorylierung noch inhibierte es die LPS und LPS/IFN $\gamma$  induzierte Sekretion von IL-12p40. Auch auf rekrutierten Neutrophilen aus der Bauchhöhle von C57BL/6 Mäusen war IL-27R $\alpha$  abwesend. PEMs exprimierten IL-27R $\alpha$  dagegen geringfügig. Im Gegensatz zu einer publizierten Studie mit PEMs, in der IL-27 die Freisetzung von IL-12p40 nach LPS und LPS/IFN $\gamma$  Stimulation inhibierte, konnten entsprechende Effekte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden [45]. Möglicherweise sind die beschriebenen inhibitorischen Funktionen von IL-27 hier auf eine Kontamination mit verbliebenen T Zellen und eine Induktion von inhibitorischen Rezeptoren als indirektem Mechanismus zurückzuführen. Insgesamt bestätigen die Expressionsuntersuchungen von IL-27R $\alpha$  den Eindruck, dass murine Makrophagen Dendritische Zellen und Neutrophile mit C57BL/6 Hintergrund keine oder lediglich eine minimale IL-27 Responsivität aufweisen [32, 124]. Im Unterschied dazu zeigte ein Pilot-Versuch mit humanen PBMCs dagegen, dass humane Monozyten IL-27 responsiv sind und dass IL-27 eine schnelle Phosphorylierung von STAT3 induziert. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen berichten eine Reihe von Studien, dass IL-27 in humanen Monozyten aus PBMCs oder in der humanen monozytären Zelllinie THP-1 zuverlässig STAT1 und STAT3 Phosphorylierungen induziert [124, 255, 260]. Ebenso wurde bereits publiziert, dass auch humane Neutrophile konstitutiv IL-27R $\alpha$  und gp130 exprimieren und dass IL-27 Effektorfunktionen von Neutrophilen inhibiert [132, 261]. Im Fall von murinen Neutrophilen berichtet eine Studie, dass IL-27 Vorläuferzellen von Neutrophilen im Knochenmark in Richtung eines anti-inflammatorischen Phänotyps polarisieren kann [262]. Die hier beschriebene Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  auf reifen murinen Neutrophilen in der Milz oder nach Legionellen-Infektion in den Alveolarräumen stützt daher die These, dass in C57BL/6

Mäusen Immunzellen der myeloiden Linie während ihrer Reifung möglicherweise die Expression von IL-27R $\alpha$  herunterregulieren und damit ihre IL-27 Responsivität verlieren. Weitere Divergenzen zwischen Maus und Mensch scheinen auch für Epithel- und Endothelzellen zu bestehen. Während im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Expression von IL-27R $\alpha$  auf murinen Epithel- und Endothelzellen aus der Lunge detektiert werden konnte, wurde die IL-27 Responsivität von humanen Zelllinien und Primärzellen vielfach beschrieben [47, 51, 125, 263-265]. Die beobachteten Gegensätze deuten auf eine Spezies-abhängige Regulation von IL-27 vermittelten Immunantworten hin. Die IL-27 Responsivität von humanen Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen sowie Epithel- und Endothelzellen könnte daher einen evolutionär vorteilhaften autokrinen oder parakrinen Feedback-Mechanismus darstellen. Wenngleich im Rahmen der durchgeführten Arbeiten auch während einer bakteriellen Legionellen-Infektion keine Expression von IL-27R $\alpha$  auf murinen Alveolarmakrophagen oder rekrutierten Neutrophilen nachgewiesen werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass andere immunologische Stimuli unter bestimmten Bedingungen nicht dennoch die Expression der Zytokin-spezifischen Rezeptorkette induzieren könnten. Darüber hinaus ist auch die Frage, ob IL-27 möglicherweise weitere Rezeptorkomplexe auf der Zelloberfläche ohne IL-27R $\alpha$  binden und aktivieren kann, nicht abschließend geklärt. Beispielsweise berichtet eine Studie, dass murines IL-27p28 den löslichen IL-6R $\alpha$  binden und über gp130 Homodimere Signalwege induzieren kann [41]. Ebenso wurde die Existenz eines löslichen IL-27R $\alpha$  beschrieben [58]. Die Tatsache, dass murines IL-27p28 zudem unabhängig von Ebi3 sekretiert werden kann, stellt einen weiteren klaren Gegensatz in der Biologie von IL-27 zwischen Maus und Mensch dar [7]. Mehrere Studien belegen, dass monomeres IL-27p28 als natürlicher Antagonist von gp130 Signalwegen wirken kann [40, 266-268]. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure zwischen murinem und humanem IL-27p28 konnte als entscheidender Unterschied für eine unabhängige Sekretion als Monomer identifiziert werden [269]. Während in murinem IL-27p28 zwei benachbarte Cystein-Reste die Ausbildung einer Protein-stabilisierenden Disulfidbrücke ermöglichen, fehlt der zweite Cystein-Rest im humanen Protein. Humanes IL-27p28 ist daher zwingend auf eine gemeinsame Sekretion mit Ebi3 angewiesen [269]. Insgesamt deuten die Ergebnisse der IL-27R $\alpha$  Expressionsanalysen in murinen Immunzellen und nicht-hämatopoetischen Zellen gemeinsam mit den bereits publizierten Differenzen bei der Sekretion von IL-27p28 auf Spezies-spezifische

Eigenschaften bei der IL-27 vermittelten Immunantwort hin. Bei der Interpretation von experimentellen Daten aus Mausmodellen sollte ihre allgemeingültige Übertragbarkeit auf den Menschen und die Ableitbarkeit von potenziellen Therapieansätzen daher mit Vorsicht betrachtet werden.

#### **4.2 Die Rolle der IL-27 vermittelten Immunantwort im Rahmen der bakteriellen Legionellen-Pneumonie**

Zur funktionellen Beteiligung von IL-27/IL-27R $\alpha$  Signalwegen während einer bakteriellen Legionellen-Infektion liegen bis heute keine Publikationen vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl im murinen Modell als auch in humanen BALF-Proben nachgewiesen, dass *Legionella spp.* IL-27 Expression induzieren. In der Maus erfolgte eine rasche lokale Induktion von IL-27 in der Lunge, gefolgt von einer verzögerten systemischen IL-27 Expression im Plasma. Auf zellulärer Ebene konnte auf rekrutierten NK und T Zellen, nicht aber auf ortsständigen Alveolarmakrophagen und Neutrophilen die Expression beider IL-27 Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen werden. Im Unterschied zu naiven NK Zellen wurde die Rezeptorkette gp130 auch auf reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellen exprimiert. Eine Induktion des IL-27 Rezeptors auf NK Zellen wurde bereits im Rahmen einer viralen Influenza-Infektion beschrieben und könnte auf eine funktionelle Relevanz des IL-27 Rezeptors bei Infektionen mit intrazellulären Pathogenen hindeuten [120]. In der genannten Studie konnten insbesondere CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> NK Zellen als zelluläre Quelle für die IL-27 vermittelte Induktion des anti-viralen Zytokins IFN $\gamma$  in den oberen Atemwegen von infizierten Mäusen identifiziert werden [120]. Auch im Rahmen der bakteriellen Legionellen-Infektion wurde IFN $\gamma$  vielfach als protektives Zytokin mit zentraler Bedeutung für eine zelluläre Immunantwort beschrieben [175, 207, 270, 271]. Die Relevanz von IFN $\gamma$  Signalwegen bei den durchgeführten Infektionsexperimenten wurde *in vitro* durch Transkriptomanalysen von infizierten BMDMs bestätigt. Lokale und systemische IFN $\gamma$  Konzentrationen wurden daher im etablierten Mausmodell als Endpunkt betrachtet.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Funktion von IL-27/IL-27R $\alpha$  Signalwegen bei der murinen Legionellen-Pneumonie. IL-27R $\alpha$  defiziente Mäuse wiesen nach intranasaler Infektion mit *Legionella pneumophila* einen reduzierten Gewichtsverlust, eine erhöhte Aktivität von NK sowie von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen und signifikant erhöhte Plasmaspiegel von IFN $\gamma$  auf. Nach Infektion mit dem virulenteren

Erreger *Legionella longbeachae* übertrug sich die in Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  gesteigerte zelluläre Immunantwort auf ein verbessertes Überleben, einen niedrigeren Krankheits-Score und einen reduzierten Lungenschaden. Diese Befunde stehen in einer Linie mit einer Reihe von Studien, die eine schädliche Funktion von IL-27 in verschiedenen bakteriellen Sepsis-Modellen berichten [63, 110, 111, 132, 272, 273]. Einige Studien identifizieren hierbei einen gesteigerten oxidativen Burst durch Makrophagen und Neutrophile und eine verbesserte bakterielle Clearance in der Abwesenheit von IL-27 als protektiven Mechanismus [110, 111, 132]. Wenngleich im Rahmen dieser Arbeit keine IL-27R $\alpha$  Expression auf Neutrophilen oder inflammatorischen Monozyten beobachtet werden konnte, könnte ihre Aktivität in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen durch einen indirekten Mechanismus ebenfalls gesteigert sein und einer systemischen Verbreitung der Legionellen effektiv entgegenwirken. So belegen verschiedene Studien eine bakterizide Aktivität von Monozyten als zelluläre Antwort auf eine IFN $\gamma$  Stimulation [175, 271, 274]. Ebenso besitzen Neutrophile nach Legionellen-Infektion eine direkte antibakterielle Aktivität durch eine zell-intrinsische Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die im Gegensatz zu Monozyten keine IFN $\gamma$  Signalwege benötigt [271, 275, 276]. Darüber hinaus wurde auch in einem murinen Modell zur Sekundärinfektion mit *Staphylococcus aureus* nach vorangegangener Influenza-Infektion eine verbesserte bakterielle Beseitigung in Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  festgestellt [277]. Die Autoren machen dafür eine verminderte IL-10 Expression und eine gesteigerte Th17 Antwort in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich. Auch in einem intranasalen Infektionsmodell mit dem gramnegativen Bakterium *Chlamydia muridarum* wurde eine gesteigerte Th17 T Zell-Antwort in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen berichtet [278]. Die Abwesenheit von IL-27R $\alpha$  resultierte hier allerdings in einem schwereren Krankheitsverlauf mit einem erhöhten Gewichtsverlust und einer gesteigerten Immunpathologie. Ebenso weisen IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse im Infektionsmodell mit dem *Mycobacterium tuberculosis* zwar eine gesteigerte TNF $\alpha$  und IL-12p40 Expression und eine reduzierte Bakterien-Anzahl in der Lunge auf [45]. Sie versterben im chronischen Infektionsverlauf allerdings an einer dysregulierten hyperaktiven Immunantwort. Die Frage, ob sich eine Defizienz des immunregulatorischen Zytokins IL-27 durch eine gesteigerte bakterielle Clearance protektiv oder durch eine erhöhte Immunpathologie nachteilig auf den Krankheitsverlauf auswirkt, scheint daher unter anderem abhängig vom jeweiligen Pathogen zu sein.

Neben der Verwendung von Mäusen mit einer globalen IL-27R $\alpha$  Defizienz wurden in der vorliegenden Arbeit auch konditionale Knockout-Stämme mittels Cre/loxP-System hergestellt. NCR1-Cre und CD8 $\alpha$ -Cre transgene Mäuse wurden für eine zellspezifische Deletion von IL-27R $\alpha$  in NK Zellen und CD8 $^+$  T Zellen verwendet. Nach aktuellem Kenntnisstand stellen sie damit die ersten konditionalen Knockout-Linien mit einer zellspezifischen Deletion von IL-27R $\alpha$  in den beiden genannten Zellpopulationen dar. Interessanterweise zeigten NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse einen entgegengesetzten Phänotyp zu IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen. Nach Infektion mit *Legionella pneumophila* wiesen NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse einen erhöhten Gewichtsverlust, eine reduzierte Aktivität von NK Zellen und ebenfalls reduzierte BALF IFN $\gamma$  Konzentrationen auf. Im Infektionsmodell mit *Legionella longbeachae* bestätigten sich der erhöhte Gewichtsverlust und die in der BALF reduzierte Expression von IFN $\gamma$ . Zusätzlich hatten Mäuse mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  in der Frühphase der Infektion einen höheren Krankheits-Score und ein geringfügig verschlechtertes Überleben. Die lokale IL-27 vermittelte Stimulation von IFN $\gamma$  Expression in NK Zellen stellt somit eine protektive Immunantwort im Rahmen der bakteriellen Legionellen-Pneumonie dar. Ähnliches wurde bereits während einer viralen Influenza-Infektion beschrieben [120]. Mechanistisch stimuliert IL-27 die Transkriptionsfaktoren NRF2 (*Nuclear factor E2-related factor 2*) und Mafk (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma*) und sensitiviert NK Zellen für die Aktivierung über den NKG2D (*NKG2-D type II integral membrane protein*) Rezeptor [120]. Darüber hinaus wurde auch in humanen NK Zellen eine *priming*-Funktion für NK Zell-Effektorfunktionen und die Induktion der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durch IL-27 beobachtet [118, 119, 279]. Überraschenderweise konnten in NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen trotz erhöhtem Gewichtsverlust, reduzierter NK Zell-Aktivität und verminderten BALF IFN $\gamma$  Konzentrationen 48 Stunden nach *Legionella longbeachae* Infektion keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl bakterieller Kolonien festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte auf protektive Effekte von IFN $\gamma$  hindeuten, welche nicht unmittelbar mit einer verbesserten bakteriellen Clearance in Verbindung stehen [280]. Neben der Aktivierung von NK Zellen scheint IL-27 außerdem zellreifungsspezifische Einflüsse auf CD11b $^+$  NK Zellen zu haben [120]. Sowohl in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen als auch in Mäusen mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  war die Anzahl an NK Zellen 48 Stunden nach Legionellen-Infektion in der Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Zusätzlich konnte in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen nachgewiesen werden, dass die

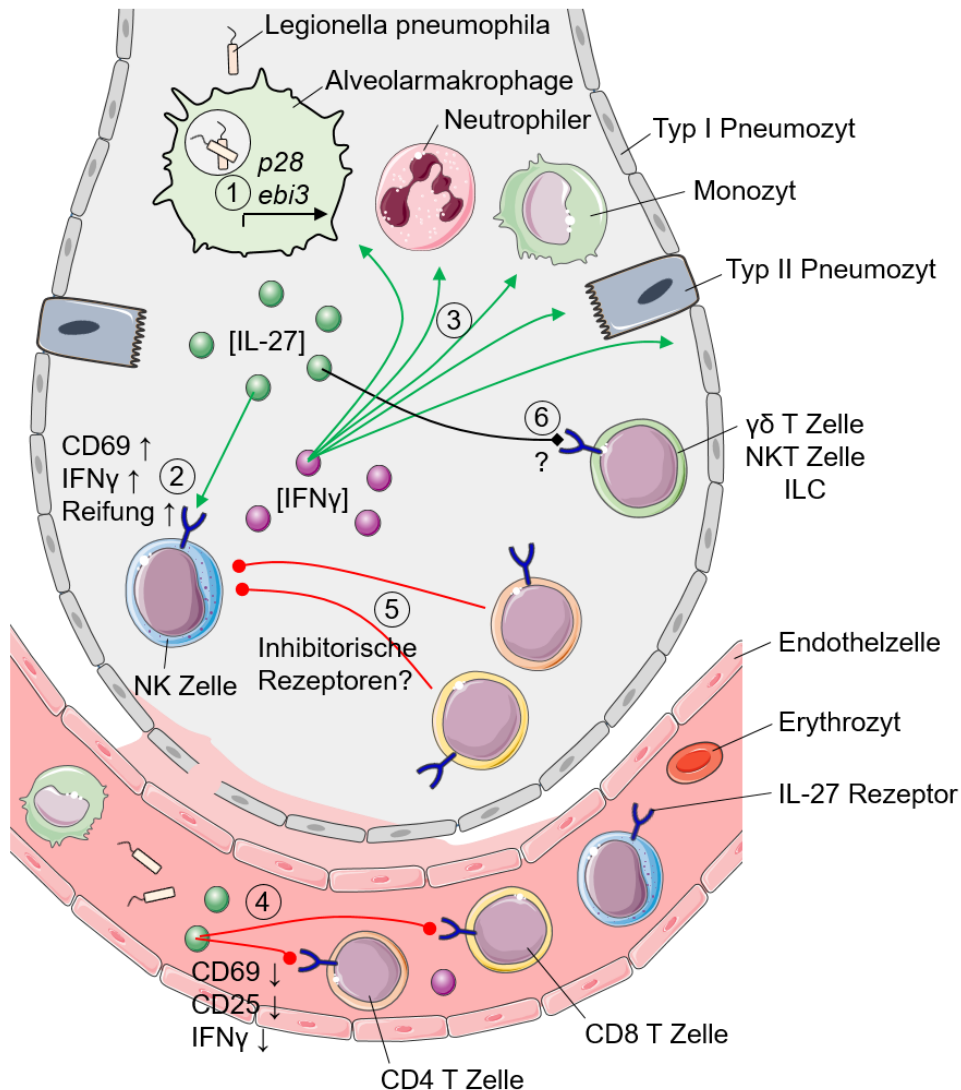
Reduktion der Gesamtzahl primär auf eine verminderte Zahl an reifen CD11b<sup>+</sup> NK Zellen zurückzuführen war. Der relative Anteil unreifer CD27<sup>+</sup> NK Zellen war in Abwesenheit von IL-27 dagegen signifikant erhöht. Außer einer reduzierten Zahl an NK Zellen wurde in den Lungen von infizierten IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen auch eine verminderte Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen festgestellt. Die Stimulation der Proliferation von naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen durch IL-27 wurde bereits im Rahmen der frühen funktionellen Untersuchungen von IL-27 beschrieben [1, 49, 67, 68].

Die Tatsache, dass NK Zellen in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen eine gesteigerte Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 aufweisen, obwohl IL-27 NK Zell-Aktivität selbst direkt stimuliert, bekräftigt die Hypothese, dass ein indirekter IL-27 vermittelter Mechanismus zur Regulation der NK Zell-Aktivität existieren muss. Aufgrund der bisherigen weitreichenden Literatur zur Rolle von IL-27 bei T Zell-Antworten stellen T Zellen die wahrscheinlichste Immunzellpopulation dar, die den beschriebenen indirekten inhibitorischen Effekt von IL-27 vermitteln könnten. Zwei mögliche Szenarien erscheinen in diesem Zusammenhang offensichtlich. IL-27 könnte erstens IL-10 Expression in T Zellen induzieren [32, 87, 281, 282], welches dann die Aktivität der NK Zellen limitiert. Oder IL-27 könnte zweitens die Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf T Zellen induzieren [7, 95, 101], welche dann ihrerseits die Aktivität der NK Zellen inhibieren. Signifikante IL-10 Konzentrationen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Infektion mit *Legionella pneumophila* zu verschiedenen Zeitpunkten weder in der BALF noch im Plasma mittels ELISA oder Multiplex Immunoassay detektiert werden. Überhaupt ist bis heute wenig zur Rolle von IL-10 für die Immunreaktion bei Infektionen mit *Legionella pneumophila* bekannt [175]. Aus den genannten Gründen erscheint daher eine Induktion von inhibitorischen Rezeptoren auf T Zellen durch IL-27 als der wahrscheinlichere zugrundeliegende Mechanismus. Wenngleich die generelle immunregulatorische Funktion von IL-27 auf dem Zusammenspiel der verschiedenen inhibitorischen Signalwege beruht, stellt sich die Frage, ob möglicherweise präferierte Signalwege in Abhängigkeit des jeweiligen Pathogens existieren. Beispielsweise beruht die Entwicklung einer letalen Immunpathologie nach *Toxoplasma gondii* Infektion in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen auf einer mangelnden Induktion von IL-10 Expression [74]. Die Expression des inhibitorischen Rezeptors TIGIT auf T Zellen spielt dagegen in *Toxoplasma gondii* Infektionen nur eine untergeordnete Rolle und TIGIT $^{-/-}$  Mäuse weisen vergleichbare NK und T Zell

Immunantworten auf [283]. In anderen Infektionsmodellen könnte TIGIT wiederum entscheidend für die Regulation der Immunantwort sein [100].

Zusätzlich zu einer Mauslinie mit NK Zell-spezifischer Deletion von IL-27R $\alpha$  wurde auch ein neuer Stamm mit einer CD8<sup>+</sup> T Zell-spezifischen Deletion etabliert. Im milden Infektionsmodell mit *Legionella pneumophila* konnten keine signifikanten Unterschiede im Schweregrad des Krankheitsverlaufs im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse wiesen dagegen nach Infektion mit *Legionella longbeachae* ein verbessertes Überleben, einen niedrigeren Krankheits-Score und ein höheres Körpergewicht im Vergleich zu NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen auf. Diese Befunde belegen, dass IL-27 zellspezifische Immunantworten im Rahmen einer bakteriellen Legionellen-Pneumonie induziert. Weiter konnte in einem Pilot-Versuch beobachtet werden, dass eine gemeinsame Deletion von IL-27R $\alpha$  sowohl in NK als auch in CD8<sup>+</sup> T Zellen in CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen im Infektionsmodell mit *Legionella pneumophila* den erhöhten Gewichtsverlust von NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen egalisiert und dass CD8<sup>Cre</sup>NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse keine Unterschiede in ihrem Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. IL-27 Signalwege in CD8<sup>+</sup> T Zellen scheinen daher unmittelbar an der oben beschriebenen Inhibition von NK Zell-Aktivität beteiligt zu sein. Auch für CD8<sup>+</sup> T Zellen im Speziellen wurde bereits die Induktion inhibitorischer Rezeptoren durch IL-27 als möglicher Mechanismus beschrieben [95, 101]. CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäuse konnten dagegen nicht den vollständigen Phänotyp geschützter IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäuse kopieren und sie wiesen im Vergleich zu IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Kontrollmäusen nur ein geringfügig verbessertes Überleben auf. Dies bekräftigt die Hypothese, dass IL-27 Signalwege sowohl in CD4<sup>+</sup> als auch in CD8<sup>+</sup> T Zellen gemeinsam an der Inhibition der Aktivität von NK Zellen beteiligt sind. Für die zellspezifischen Funktionen von IL-27 auf Zytotoxizität-vermittelnde NK und CD8<sup>+</sup> T Zellen lässt sich daher festhalten, dass sie im Legionellen-Modell keineswegs als redundant, sondern möglicherweise sogar als konträr betrachtet werden sollten.

Insgesamt zeichnen die Daten aus dem murinen Legionellen-Modell ein Bild, welches zeitlich und räumlich definierte Funktionen von IL-27 vorsieht und ein kürzlich publiziertes biphasisches Modell zur Rolle von IL-27 stützt [284]. Das hypothetische Modell soll im Folgenden skizziert werden: Der Kontakt mit dem bakteriellen Erreger induziert in Alveolarmakrophagen eine schnelle und lokale IL-27 Produktion (Abbildung 53). In den Alveolen stimuliert IL-27 in der frühen Phase der Infektion proinflammatorische Immunantworten. In schnell rekrutierten NK Zellen fördert IL-27 die Aktivierung, die Reifung und die Expression von IFN $\gamma$  [120]. Lokales IFN $\gamma$  stimuliert eine protektive zelluläre Immunantwort durch Alveolarmakrophagen, Neutrophile, Monozyten und Pneumozyten [285-289]. Systemisches IL-27, möglicherweise freigesetzt durch inflammatorische Monozyten, limitiert dagegen die Aktivität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen und induziert inhibitorische Signalwege. Über einen noch unklaren Mechanismus inhibieren CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen die Aktivität von NK Zellen sowohl im Plasma als auch nach ihrer Einwanderung in die Lunge lokal in den Alveolen. Reduzierte Plasmaspiegel von IFN $\gamma$  und eine verminderte systemische Kontrolle der Legionellen sind die Folge der T Zell-vermittelten immunregulatorischen Signalwege. Unklar ist dagegen, welche Rolle IL-27 Signalwegen in weiteren ortsständigen Lymphozyten-Populationen der angeborenen Immunität in der Lunge ( $\gamma\delta$  T Zellen, NKT Zellen, ILCs) zukommt [290-292]. Sowohl auf  $\gamma\delta$  T Zellen als auch auf ILCs konnte eine hohe Expression von IL-27R $\alpha$  nachgewiesen werden. Während für IL-27 insbesondere bei ILC2 inhibitorische Funktionen beschrieben wurden, kann IL-27 die Aktivität von  $\gamma\delta$  T Zellen und NKT Zellen stimulieren [115-117, 121, 293]. Eine verminderte Aktivität von  $\gamma\delta$  T Zellen und NKT Zellen in der Lunge von IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen könnte in diesem Zusammenhang auch für die lokal erhöhte Anzahl bakterieller Kolonien zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit *Legionella longbeachae* verantwortlich sein. Trotz reduzierter IFN $\gamma$  Konzentrationen in der BALF von NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha^{fl/fl}$  Mäusen waren ihre bakteriellen Belastungen unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Befunde stützen die Vermutung, dass neben NK Zellen auch weitere Lymphozyten-Populationen der angeborenen Immunität insbesondere im frühen Infektionsgeschehen funktionell beteiligt sein könnten.



**Abbildung 53: Hypothetisches Modell der räumlich und zeitlich definierten Immunantworten durch IL-27 während einer Legionellen-Infektion.**

**1)** Durch Aspiration kontaminierter Aerosole gelangen *Legionella pneumophila* in die Lunge, wo sie ortsständige Alveolarmakrophagen infizieren und IL-27 Expression induzieren. **2)** In der Frühphase der Infektion stimuliert IL-27 lokal die Aktivierung, Reifung und IFN $\gamma$  Expression von rekrutierten NK Zellen. **3)** IFN $\gamma$  fördert eine protektive zelluläre Immunantwort durch Alveolarmakrophagen, Neutrophile, Monozyten und Pneumozyten. **4)** Im weiteren Verlauf der Infektion dominieren anti-inflammatorische Effekte von IL-27. Im Plasma inhibiert IL-27 die Aktivität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen und die systemische IFN $\gamma$  Expression. **5)** In rekrutierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen stimuliert IL-27 ein inhibitorisches Programm zur Regulation der Aktivität von NK Zellen. **6)** Weitere Funktionen von IL-27 für ortsständige Lymphozyten mit IL-27R $\alpha$  Expression ( $\gamma\delta$  T Zellen, NKT Zellen, ILCs) sind darüber hinaus denkbar.

### 4.3 Die Bedeutung von GNB2 im Rahmen einer Infektion mit *Legionella pneumophila*

In der Proteininteraktions-Datenbank BioGRID wird eine Massenspektrometrie-basierte Proteom-Studie geführt, die eine direkte Interaktion der G-Protein  $\beta$ -Untereinheit GNB2 mit IL-27R $\alpha$  identifiziert [237]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Fragestellung nachgegangen, ob GNB2 IL-27 induzierte Signalwege regulieren kann. Entgegen der initialen Arbeitshypothese konnten in IL-27 stimulierten WT und GNB2<sup>-/-</sup> Splenozyten keine Unterschiede hinsichtlich der induzierten STAT1- oder STAT3-Phosphorylierung beobachtet werden. Ebenso war die Induktion der IL-10 Expression von aktivierten T Zellen aus der Milz in Anwesenheit von IL-27 unverändert zwischen WT und GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen. Stattdessen konnte in BMDMs eine Funktion von GNB2 für die Expression von IL-27p28 nachgewiesen werden. Sowohl nach LPS-Stimulation als auch nach Infektion mit *Legionella pneumophila* war die Gen-Expression von *Il-27p28* in Abwesenheit von GNB2 signifikant erhöht. Auch auf Proteinebene konnte eine höhere Expression von IL-27p28 in GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs nach Infektion mit *Legionella pneumophila* bei einer MOI=5 oder einer MOI=10 beobachtet werden. Während der Legionellen-Pneumonie wiesen GNB2 defiziente Mäuse einen signifikant größeren Gewichtsverlust und eine massiv erhöhte Anzahl bakterieller Kolonien in der BALF auf. Wenngleich auch erhöhte BALF IL-27p28 Konzentrationen in GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen detektiert werden konnten, könnten diese möglicherweise lediglich eine Konsequenz der beeinträchtigten bakteriellen Clearance darstellen und für den beobachteten Phänotyp nur eine untergeordnete Rolle spielen. Neben IL-27p28 waren zudem eine Reihe weiterer klar proinflammatorischer Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-6, TNF $\alpha$ ) und Chemokine (CXCL1, CXCL5, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES) sowie die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf rekrutierten NK und T Zellen signifikant erhöht. Die erhöhten bakteriellen Belastungen in den Lungen von Mäusen mit GNB2 Defizienz trotz stark proinflammatorischer Immunantwort deuten auf einen zell-intrinsischen Defekt bei der Beseitigung der Bakterien in infizierten Alveolarmakrophagen hin. Da eine schnelle Induktion des inflammatorischen Zelltods (Pyroptose) in Makrophagen von C57BL/6 Mäusen einen protektiven Mechanismus gegen *Legionella pneumophila* darstellt [157, 175, 198], könnte der beschriebene Phänotyp durch eine funktionelle Beteiligung von GNB2 bei der Inflammasom-

aktivierung oder der Aktivierung von Caspasen erklärt werden. Über die Rolle von heterotrimeren G-Proteinen bei der Inflammasom-Aktivierung ist bis heute vergleichsweise wenig bekannt. Für die G-Protein  $\beta$ -Untereinheit GNB1 wurde in einer Studie eine inhibitorische Rolle für die Aktivierung des NLRP3 (*NLR family pyrin domain-containing 3*)-Inflammasoms beschrieben [294]. Andere Studien berichten dagegen für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entweder NLRP3-Inflammasom stimulierende oder aber inhibierende Eigenschaften [295]. In Übereinstimmung mit diesem Erklärungsansatz war die Zellviabilität von BMDMs nach *in vitro* Infektion mit *Legionella pneumophila* in Abwesenheit von GNB2 signifikant erhöht. Weitere Studien mit GNB2 defizienten Makrophagen werden daher für die Aufklärung des zugrundeliegenden zellulären Mechanismus erforderlich sein. In einem unabhängigen Projekt wird aktuell verschiedenen mechanistischen Erklärungsansätzen nachgegangen. Als naheliegender Mechanismus wurden bereits Unterschiede in der Aktivität von Caspase-1 in WT und GNB2<sup>-/-</sup> BMDMs nach Infektion mit *Legionella pneumophila* untersucht. In der Tat konnte in einem Lumineszenz-basierten Assay eine geringfügig, aber dennoch signifikant reduzierte Aktivität von Caspase-1 in Abwesenheit von GNB2 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine verminderte Aktivierung von Caspase-1 könnte daher zumindest Teil einer Erklärung für den schwerwiegenderen Krankheitsverlauf in GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* sein. Aufgrund der Existenz vieler hunderter verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in Maus und Mensch, in deren Signaltransduktion GNB2 potenziell beteiligt sein könnte, erscheint es als durchaus wahrscheinlich, dass daneben weitere Mechanismen zum beobachteten Phänotyp in GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen beitragen [296]. Beispielsweise wurde ebenfalls eine Funktion von GNB2 für die Induktion der zellulären Apoptose beschrieben [297]. Entscheidend für die Aufklärung weiterer Mechanismen ist zunächst die Identifikation konkreter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die mit GNB2 unter homöostatischen Bedingungen oder aber während inflammatorischer Prozesse interagieren. Der C5a-Rezeptor konnte beispielsweise bereits als Bindungspartner eines heterotrimeren G-Proteins mit GNB2 als  $\beta$ -Untereinheit identifiziert werden und GNB2 defiziente Makrophagen weisen eine verminderte C5a-vermittelte Chemotaxis auf [236]. In Übereinstimmung hiermit zeigen eigene unveröffentlichte Phosphoproteomik-Daten, dass in GNB2 defizienten BMDMs mehrere Phosphorylierungsstellen des C5a-Rezeptors nach *Legionella pneumophila* Infektion im Vergleich zu WT BMDMs herunterreguliert sind. Eine Identifikation von

weiteren GNB2-bindenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ihrer zellulären Effektorproteine könnte daher zum besseren Verständnis der Rolle von GNB2 während einer bakteriellen Legionellen-Infektion beitragen.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten zellspezifische Funktionen von IL-27/IL-27R $\alpha$  Signalwegen in einem Modell der bakteriellen Legionellen-Pneumonie mithilfe von konditionalen und globalen IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden. Die teils gegensätzlichen Infektionsverläufe in Abhängigkeit der Immunzellpopulation mit IL-27R $\alpha$  Deletion unterstreichen die Komplexität und die Kontext-abhängige immunmodulatorische Natur von IL-27. Sie stützen ein Modell, nach dem IL-27 in einer zeitlich und räumlich definierten Art und Weise proinflammatorische Prozesse lokal zunächst unmittelbar stimuliert, ihnen im weiteren Verlauf des Infektionsgeschehens über indirekte Mechanismen allerdings limitierend entgegenwirkt und dadurch zu einem Gleichgewicht zwischen einer effektiven Beseitigung des Pathogens und einer Vermeidung von immuninduzierten Kollateralschäden beiträgt. Unklar ist hierbei, über welche indirekten Mechanismen die Inhibition der NK Zellen im betrachteten Infektionsmodell vermittelt wird. Zum Nachweis einer möglichen Beteiligung von inhibitorischen Rezeptoren auf T Zellen ist daher eine Untersuchung von BALF Zellen aus infizierten WT und IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen mittels CITE-Seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing) geplant. Darüber hinaus liegen aktuell keine Studien zur Rolle von IL-27 bei humanen Legionellen-Infektionen vor. Aufgrund der hohen Letalität von *Legionella pneumophila* besonders bei älteren Menschen und Patienten mit chronischer Lungenerkrankung oder Immunsuppression trotz verfügbarer Antibiotika-Therapien könnte IL-27 ein relevantes Zytokin mit therapeutischem Potenzial darstellen [298]. Insbesondere die Tatsache, dass der reduzierte Lungenschaden in IL-27R $\alpha$  defizienten Mäusen nicht mit einer lokal verbesserten bakteriellen Eradikation einherzugehen scheint, stützt die Vermutung, dass der zugrundeliegende Mechanismus additiv zu einer Antibiotikabehandlung wirken könnte. Zudem könnte eine künftige Verwendung der neuen konditionalen Knockout-Linien von IL-27R $\alpha$  in NK und CD8<sup>+</sup> T Zellen auch in anderen Forschungsbereichen vielversprechende Erkenntnisse liefern. Murine Tumormodelle mit NCR1<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen und CD8<sup>Cre</sup>IL-27R $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen könnten beispielsweise neue Einsichten in die Rolle von IL-27 in der Tumormikroumgebung geben.

Für die G-Protein  $\beta$ -Untereinheit GNB2 konnte in den durchgeführten Arbeiten ebenfalls eine relevante Funktion während der bakteriellen Legionellen-Infektion identifiziert werden, welche nur teilweise mit der Regulation IL-27 vermittelter Immunantworten zusammenhängt. Unklar ist hierbei, welche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Infektionsmodell ihre intrazellulären Signalwege über GNB2 aktivieren und welche defekten Signalwege in GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen für den schwerwiegenderen Krankheitsverlauf verantwortlich sind. In Zukunft sollen daher GNB2-bindende Proteine aus Zelllysaten von unstimulierten und infizierten BMDMs mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Darüber hinaus wird aktuell ein neuer GNB2<sup>fl/fl</sup> Mausstamm hergestellt. Diese konditionalen Knockout-Mäuse sollen in anstehenden Infektionsexperimenten verwendet werden, um nachzuweisen, ob der in GNB2<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtete Phänotyp auf zellintrinsische Funktionen von GNB2 speziell in Makrophagen zurückzuführen ist.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] S. Pflanz *et al.*, "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells," *Immunity*, vol. 16, no. 6, pp. 779-90, 2002.
- [2] S. Pflanz *et al.*, "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27," (in eng), *J Immunol*, vol. 172, no. 4, pp. 2225-31, Feb 15 2004. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764690>.
- [3] L. L. Jones and D. A. Vignali, "Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily," (in eng), *Immunol Res*, vol. 51, no. 1, pp. 5-14, Oct 2011, doi: 10.1007/s12026-011-8209-y.
- [4] D. A. Vignali and V. K. Kuchroo, "IL-12 family cytokines: immunological playmakers," *Nat Immunol*, vol. 13, no. 8, pp. 722-8, Aug 2012, doi: 10.1038/ni.2366.
- [5] R. A. Kastelein, C. A. Hunter, and D. J. Cua, "Discovery and Biology of IL-23 and IL-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation," *Annual Review of Immunology*, vol. 25, no. 1, pp. 221-242, 2007, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104758.
- [6] X. Wang *et al.*, "A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 46, no. 6, pp. 1343-50, Jun 2016, doi: 10.1002/eji.201546095.
- [7] E. D. Tait Wojno, C. A. Hunter, and J. S. Stumhofer, "The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery," (in eng), *Immunity*, vol. 50, no. 4, pp. 851-870, Apr 16 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.011.
- [8] L. W. Collison and D. A. Vignali, "Interleukin-35: odd one out or part of the family?," (in eng), *Immunol Rev*, vol. 226, pp. 248-62, Dec 2008, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00704.x.
- [9] M. Kobayashi *et al.*, "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes," (in eng), *J Exp Med*, vol. 170, no. 3, pp. 827-45, Sep 1 1989, doi: 10.1084/jem.170.3.827.
- [10] B. Oppmann *et al.*, "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12," (in eng), *Immunity*, vol. 13, no. 5, pp. 715-25, Nov 2000, doi: 10.1016/s1074-7613(00)00070-4.
- [11] L. W. Collison *et al.*, "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function," (in eng), *Nature*, vol. 450, no. 7169, pp. 566-9, Nov 22 2007, doi: 10.1038/nature06306.
- [12] A. O. Chua *et al.*, "Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130," (in eng), *J Immunol*, vol. 153, no. 1, pp. 128-36, Jul 1 1994.
- [13] A. O. Chua, V. L. Wilkinson, D. H. Presky, and U. Gubler, "Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component," (in eng), *J Immunol*, vol. 155, no. 9, pp. 4286-94, Nov 1 1995.
- [14] D. H. Presky *et al.*, "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 24, pp. 14002-7, Nov 26 1996, doi: 10.1073/pnas.93.24.14002.
- [15] C. Parham *et al.*, "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R," (in eng), *J Immunol*, vol. 168, no. 11, pp. 5699-708, Jun 1 2002, doi:

- 10.4049/jimmunol.168.11.5699.
- [16] L. W. Collison *et al.*, "The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 13, no. 3, pp. 290-9, Feb 5 2012, doi: 10.1038/ni.2227.
- [17] Z. Lu, K. Xu, X. Wang, Y. Li, and M. Li, "Interleukin 39: a new member of interleukin 12 family," (in eng), *Cent Eur J Immunol*, vol. 45, no. 2, pp. 214-217, 2020, doi: 10.5114/ceji.2020.97911.
- [18] J. Choi, P. S. Leung, C. Bowlus, and M. E. Gershwin, "IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective," (in eng), *Clin Rev Allergy Immunol*, vol. 49, no. 3, pp. 327-32, Dec 2015, doi: 10.1007/s12016-015-8468-9.
- [19] D. Chow, X. He, A. L. Snow, S. Rose-John, and K. C. Garcia, "Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex," (in eng), *Science*, vol. 291, no. 5511, pp. 2150-5, Mar 16 2001, doi: 10.1126/science.1058308.
- [20] D. M. Floss *et al.*, "Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor  $\beta$ 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 27, no. 14, pp. 2301-16, Jul 15 2016, doi: 10.1091/mbc.E14-12-1645.
- [21] P. C. Heinrich, I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve, "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway," (in eng), *Biochem J*, vol. 334 ( Pt 2), no. Pt 2, pp. 297-314, Sep 1 1998, doi: 10.1042/bj3340297.
- [22] J. W. Tanner, W. Chen, R. L. Young, G. D. Longmore, and A. S. Shaw, "The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 270, no. 12, pp. 6523-30, Mar 24 1995, doi: 10.1074/jbc.270.12.6523.
- [23] W. E. Thierfelder *et al.*, "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells," (in eng), *Nature*, vol. 382, no. 6587, pp. 171-4, Jul 11 1996, doi: 10.1038/382171a0.
- [24] L. Hibbert, S. Pflanz, R. De Waal Malefyt, and R. A. Kastelein, "IL-27 and IFN- $\alpha$  signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12R $\beta$ 2 in naive T cells," (in eng), *J Interferon Cytokine Res*, vol. 23, no. 9, pp. 513-22, Sep 2003, doi: 10.1089/10799900360708632.
- [25] M. Batten and N. Ghilardi, "The biology and therapeutic potential of interleukin 27," (in eng), *J Mol Med (Berl)*, vol. 85, no. 7, pp. 661-72, Jul 2007, doi: 10.1007/s00109-007-0164-7.
- [26] M. Bosmann and P. A. Ward, "Modulation of inflammation by interleukin-27," *J Leukoc Biol*, vol. 94, no. 6, pp. 1159-65, Dec 2013, doi: 10.1189/jlb.0213107.
- [27] A. O. H. Hall, J. S. Silver, and C. A. Hunter, "Chapter 1 - The Immunobiology of IL-27," in *Advances in Immunology*, vol. 115, F. W. Alt Ed.: Academic Press, 2012, pp. 1-44.
- [28] S. Wirtz *et al.*, "EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation," (in eng), *J Immunol*, vol. 174, no. 5, pp. 2814-24, Mar 1 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2814.
- [29] L. Hause, F. M. Al-Salleeh, and T. M. Petro, "Expression of IL-27 p28 by Theiler's virus-infected macrophages depends on TLR3 and TLR7 activation of JNK-MAP-kinases," (in eng), *Antiviral Res*, vol. 76, no. 2, pp. 159-67, Nov 2007, doi: 10.1016/j.antiviral.2007.06.013.
- [30] J. Liu, X. Guan, and X. Ma, "Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways," (in eng), *J Exp Med*, vol. 204, no. 1, pp. 141-52, Jan 22 2007, doi: 10.1084/jem.20061440.

- [31] C. Molle, M. Goldman, and S. Goriely, "Critical role of the IFN-stimulated gene factor 3 complex in TLR-mediated IL-27p28 gene expression revealing a two-step activation process," (in eng), *J Immunol*, vol. 184, no. 4, pp. 1784-92, Feb 15 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0902005.
- [32] H. Yoshida and C. A. Hunter, "The immunobiology of interleukin-27," *Annu Rev Immunol*, vol. 33, pp. 417-43, 2015, doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112134.
- [33] M. A. Curran *et al.*, "Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin," (in eng), *J Exp Med*, vol. 210, no. 4, pp. 743-55, Apr 8 2013, doi: 10.1084/jem.20121190.
- [34] M. Schnurr, T. Toy, A. Shin, M. Wagner, J. Cebon, and E. Maraskovsky, "Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway," *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1582-9, Feb 15 2005, doi: 10.1182/blood-2004-05-1718.
- [35] M. Bosmann, M. D. Haggadone, M. R. Hemmila, F. S. Zetoune, J. V. Sarma, and P. A. Ward, "Complement activation product C5a is a selective suppressor of TLR4-induced, but not TLR3-induced, production of IL-27(p28) from macrophages," (in eng), *J Immunol*, vol. 188, no. 10, pp. 5086-93, May 15 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102914.
- [36] H. Hawlisch, Y. Belkaid, R. Baelder, D. Hildeman, C. Gerard, and J. Köhl, "C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses," (in eng), *Immunity*, vol. 22, no. 4, pp. 415-26, Apr 2005, doi: 10.1016/j.immuni.2005.02.006.
- [37] M. Bosmann *et al.*, "Interruption of macrophage-derived IL-27(p28) production by IL-10 during sepsis requires STAT3 but not SOCS3," *J Immunol*, vol. 193, no. 11, pp. 5668-77, Dec 1 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1302280.
- [38] J. S. Stumhofer and C. A. Hunter, "Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27," *Immunology Letters*, vol. 117, no. 2, pp. 123-130, 2008/05/15/ 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.01.011>.
- [39] J. S. Stumhofer *et al.*, "A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 11, no. 12, pp. 1119-26, Dec 2010, doi: 10.1038/ni.1957.
- [40] O. Shimozato *et al.*, "The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological functions of IL-27 and suppresses anti-allogeneic immune responses," (in eng), *Immunology*, vol. 128, no. 1 Suppl, pp. e816-25, Sep 2009, doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03088.x.
- [41] C. Garbers *et al.*, "An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 288, no. 6, pp. 4346-54, Feb 8 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.432955.
- [42] S. Crabé *et al.*, "The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling," (in eng), *J Immunol*, vol. 183, no. 12, pp. 7692-702, Dec 15 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901464.
- [43] A. V. Villarino *et al.*, "Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation," (in eng), *J Immunol*, vol. 174, no. 12, pp. 7684-91, Jun 15 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.12.7684.
- [44] Q. Chen *et al.*, "Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR," (in eng), *Nature*, vol. 407, no. 6806, pp. 916-20, Oct

- 19 2000, doi: 10.1038/35038103.
- [45] C. Hölscher *et al.*, "The IL-27 Receptor Chain WSX-1 Differentially Regulates Antibacterial Immunity and Survival during Experimental Tuberculosis," *The Journal of Immunology*, vol. 174, no. 6, pp. 3534-3544, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3534.
- [46] S. Wang, Y. Miyazaki, Y. Shinozaki, and H. Yoshida, "Augmentation of Antigen-Presenting and Th1-Promoting Functions of Dendritic Cells by WSX-1(IL-27R) Deficiency," *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 10, pp. 6421-6428, 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.10.6421.
- [47] J. Cao, C. K. Wong, Y. Yin, and C. W. Lam, "Activation of human bronchial epithelial cells by inflammatory cytokines IL-27 and TNF-alpha: implications for immunopathophysiology of airway inflammation," *J Cell Physiol*, vol. 223, no. 3, pp. 788-97, Jun 2010, doi: 10.1002/jcp.22094.
- [48] C. A. Hunter and R. Kastelein, "Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity," (in eng), *Immunity*, vol. 37, no. 6, pp. 960-9, Dec 14 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.003.
- [49] A. Takeda *et al.*, "Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment," (in eng), *J Immunol*, vol. 170, no. 10, pp. 4886-90, May 15 2003, doi: 10.4049/jimmunol.170.10.4886.
- [50] S. Kamiya, T. Owaki, N. Morishima, F. Fukai, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto, "An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 173, no. 6, pp. 3871-7, Sep 15 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3871.
- [51] J. Diegelmann, T. Olszak, B. Göke, R. S. Blumberg, and S. Brand, "A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 287, no. 1, pp. 286-298, Jan 2 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.294355.
- [52] T. Owaki, M. Asakawa, F. Fukai, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto, "IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways," (in eng), *J Immunol*, vol. 177, no. 11, pp. 7579-87, Dec 1 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.11.7579.
- [53] G. Sharma *et al.*, "IL-27 inhibits IFN- $\gamma$  induced autophagy by concomitant induction of JAK/PI3 K/Akt/mTOR cascade and up-regulation of Mcl-1 in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages," (in eng), *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 55, pp. 335-47, Oct 2014, doi: 10.1016/j.biocel.2014.08.022.
- [54] C. Pot *et al.*, "Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 183, no. 2, pp. 797-801, Jul 15 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901233.
- [55] L. Apetoh *et al.*, "The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 11, no. 9, pp. 854-61, Sep 2010, doi: 10.1038/ni.1912.
- [56] Y. Hashimoto, M. Kurita, S. Aiso, I. Nishimoto, and M. Matsuoka, "Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 20, no. 12, pp. 2864-73, Jun 2009, doi: 10.1091/mbc.e09-02-0168.

- [57] A. Pradhan, Q. T. Lambert, and G. W. Reuther, "Transformation of hematopoietic cells and activation of JAK2-V617F by IL-27R, a component of a heterodimeric type I cytokine receptor," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 47, pp. 18502-7, Nov 20 2007, doi: 10.1073/pnas.0702388104.
- [58] C. Dietrich, S. Candon, F. M. Ruemmele, and O. Devergne, "A soluble form of IL-27R $\alpha$  is a natural IL-27 antagonist," (in eng), *J Immunol*, vol. 192, no. 11, pp. 5382-9, Jun 1 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1303435.
- [59] S. A. Jones and B. J. Jenkins, "Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer," *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, no. 12, pp. 773-789, 2018/12/01 2018, doi: 10.1038/s41577-018-0066-7.
- [60] H. Yoshida *et al.*, "WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection," (in eng), *Immunity*, vol. 15, no. 4, pp. 569-78, Oct 2001, doi: 10.1016/s1074-7613(01)00206-0.
- [61] S. Lucas, N. Ghilardi, J. Li, and F. J. de Sauvage, "IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4<sup>+</sup> T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 25, pp. 15047-15052, 2003, doi: 10.1073/pnas.2536517100.
- [62] T. Owaki *et al.*, "A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation," (in eng), *J Immunol*, vol. 175, no. 4, pp. 2191-200, Aug 15 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2191.
- [63] M. Bosmann *et al.*, "Tyrosine kinase 2 promotes sepsis-associated lethality by facilitating production of interleukin-27," *J Leukoc Biol*, vol. 96, no. 1, pp. 123-31, Jul 2014, doi: 10.1189/jlb.3A1013-541R.
- [64] M. Matsui *et al.*, "Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice," (in eng), *J Virol*, vol. 78, no. 17, pp. 9093-104, Sep 2004, doi: 10.1128/jvi.78.17.9093-9104.2004.
- [65] K. D. Mayer *et al.*, "Cutting edge: T-bet and IL-27R are critical for in vivo IFN- $\gamma$  production by CD8 T cells during infection," (in eng), *J Immunol*, vol. 180, no. 2, pp. 693-7, Jan 15 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.2.693.
- [66] T. H. Nguyen, S. Maltby, H. L. Tay, F. Evers, P. S. Foster, and M. Yang, "Identification of IFN- $\gamma$  and IL-27 as Critical Regulators of Respiratory Syncytial Virus-Induced Exacerbation of Allergic Airways Disease in a Mouse Model," (in eng), *J Immunol*, vol. 200, no. 1, pp. 237-247, Jan 1 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1601950.
- [67] N. Morishima, T. Owaki, M. Asakawa, S. Kamiya, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto, "Augmentation of effector CD8<sup>+</sup> T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27," (in eng), *J Immunol*, vol. 175, no. 3, pp. 1686-93, Aug 1 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1686.
- [68] R. Schneider, T. Yaneva, D. Beauseigle, L. El-Khoury, and N. Arbour, "IL-27 increases the proliferation and effector functions of human naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and promotes their development into Tc1 cells," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 41, no. 1, pp. 47-59, Jan 2011, doi: 10.1002/eji.201040804.
- [69] M. Hisada *et al.*, "Potent Antitumor Activity of Interleukin-27," *Cancer Research*, vol. 64, no. 3, pp. 1152-1156, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.Can-03-2084.
- [70] R. Salcedo *et al.*, "Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow," (in eng), *J Immunol*, vol. 182, no. 7, pp. 4328-38, Apr 1 2009, doi:

- 10.4049/jimmunol.0800471.
- [71] R. Salcedo *et al.*, "IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8+ T cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 173, no. 12, pp. 7170-82, Dec 15 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7170.
- [72] A. M. Kilgore *et al.*, "IL-27p28 Production by XCR1(+) Dendritic Cells and Monocytes Effectively Predicts Adjuvant-Elicited CD8(+) T Cell Responses," (in eng), *Immunohorizons*, vol. 2, no. 1, pp. 1-11, Jan 1 2018, doi: 10.4049/immunohorizons.1700054.
- [73] N. D. Pennock, L. Gapin, and R. M. Kedl, "IL-27 is required for shaping the magnitude, affinity distribution, and memory of T cells responding to subunit immunization," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 46, pp. 16472-16477, 2014, doi: 10.1073/pnas.1407393111.
- [74] A. Villarino *et al.*, "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection," (in eng), *Immunity*, vol. 19, no. 5, pp. 645-55, Nov 2003, doi: 10.1016/s1074-7613(03)00300-5.
- [75] S. Hamano *et al.*, "WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production," (in eng), *Immunity*, vol. 19, no. 5, pp. 657-67, Nov 2003, doi: 10.1016/s1074-7613(03)00298-x.
- [76] Z. Chen *et al.*, "IL-4 confers resistance to IL-27-mediated suppression on CD4+ T cells by impairing signal transducer and activator of transcription 1 signaling," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 132, no. 4, pp. 912-21.e1-5, Oct 2013, doi: 10.1016/j.jaci.2013.06.035.
- [77] A. V. Villarino *et al.*, "IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD," (in eng), *Int Immunol*, vol. 20, no. 6, pp. 739-52, Jun 2008, doi: 10.1093/intimm/dxn032.
- [78] A. J. Bancroft, N. E. Humphreys, J. J. Worthington, H. Yoshida, and R. K. Grencis, "WSX-1: a key role in induction of chronic intestinal nematode infection," (in eng), *J Immunol*, vol. 172, no. 12, pp. 7635-41, Jun 15 2004, doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7635.
- [79] J. Yang *et al.*, "Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 38, no. 5, pp. 1204-14, May 2008, doi: 10.1002/eji.200838145.
- [80] C. Diveu *et al.*, "IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 182, no. 9, pp. 5748-56, May 1 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0801162.
- [81] J. S. Stumhofer *et al.*, "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 7, no. 9, pp. 937-45, Sep 2006, doi: 10.1038/ni1376.
- [82] E. G. Findlay *et al.*, "Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection," (in eng), *J Immunol*, vol. 185, no. 4, pp. 2482-92, Aug 15 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0904019.
- [83] K. N. Couper, D. G. Blount, and E. M. Riley, "IL-10: the master regulator of immunity to infection," (in eng), *J Immunol*, vol. 180, no. 9, pp. 5771-7, May 1 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
- [84] J. S. Stumhofer *et al.*, "Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 1363-71, Dec 2007, doi: ni1537 [pii]

- 10.1038/ni1537.
- [85] A. Awasthi *et al.*, "A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 1380-9, Dec 2007, doi: 10.1038/ni1541.
- [86] D. C. Fitzgerald *et al.*, "Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 1372-9, Dec 2007, doi: 10.1038/ni1540.
- [87] M. Batten, N. M. Kljavin, J. Li, M. J. Walter, F. J. de Sauvage, and N. Ghilardi, "Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 180, no. 5, pp. 2752-6, Mar 1 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2752.
- [88] M. Huber *et al.*, "IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3," (in eng), *Int Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 223-34, Feb 2008, doi: 10.1093/intimm/dxm139.
- [89] J. H. Cox, N. M. Kljavin, N. Ramamoorthi, L. Diehl, M. Batten, and N. Ghilardi, "IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms," (in eng), *J Exp Med*, vol. 208, no. 1, pp. 115-23, Jan 17 2011, doi: 10.1084/jem.20100410.
- [90] E. D. Wojno *et al.*, "A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations," (in eng), *J Immunol*, vol. 187, no. 1, pp. 266-73, Jul 1 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1004182.
- [91] A. V. Villarino, J. S. Stumhofer, C. J. M. Saris, R. A. Kastelein, F. J. de Sauvage, and C. A. Hunter, "IL-27 Limits IL-2 Production during Th1 Differentiation," *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 1, pp. 237-247, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.1.237.
- [92] A. O. Hall *et al.*, "The cytokines interleukin 27 and interferon- $\gamma$  promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology," (in eng), *Immunity*, vol. 37, no. 3, pp. 511-23, Sep 21 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.014.
- [93] G. Kim, R. Shinnakasu, C. J. Saris, H. Cheroutre, and M. Kronenberg, "A novel role for IL-27 in mediating the survival of activated mouse CD4 T lymphocytes," (in eng), *J Immunol*, vol. 190, no. 4, pp. 1510-8, Feb 15 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1201017.
- [94] Y. Iwasaki, K. Fujio, T. Okamura, and K. Yamamoto, "Interleukin-27 in T cell immunity," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 2, pp. 2851-63, Jan 27 2015, doi: 10.3390/ijms16022851.
- [95] N. Chihara *et al.*, "Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells," (in eng), *Nature*, vol. 558, no. 7710, pp. 454-459, Jun 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0206-z.
- [96] K. Hirahara *et al.*, "Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1," (in eng), *Immunity*, vol. 36, no. 6, pp. 1017-30, Jun 29 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.024.
- [97] J. S. Do *et al.*, "An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy," (in eng), *Mucosal Immunol*, vol. 9, no. 1, pp. 137-45, Jan 2016, doi: 10.1038/mi.2015.45.
- [98] Q. Y. Ma, D. Y. Huang, H. J. Zhang, S. Wang, and X. F. Chen, "Function and regulation of LAG3 on CD4(+)CD25(-) T cells in non-small cell lung cancer," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 360, no. 2, pp. 358-364, Nov 15 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.09.026.
- [99] C. Zhu *et al.*, "An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression

- and T-cell dysfunction," (in eng), *Nat Commun*, vol. 6, p. 6072, Jan 23 2015, doi: 10.1038/ncomms7072.
- [100] K. N. Morrow *et al.*, "The IL-27 receptor regulates TIGIT on memory CD4(+) T cells during sepsis," (in eng), *iScience*, vol. 24, no. 2, p. 102093, Feb 19 2021, doi: 10.1016/j.isci.2021.102093.
- [101] J. H. DeLong *et al.*, "IL-27 and TCR Stimulation Promote T Cell Expression of Multiple Inhibitory Receptors," (in eng), *Immunohorizons*, vol. 3, no. 1, pp. 13-25, Jan 15 2019, doi: 10.4049/immunohorizons.1800083.
- [102] A. T. Bauquet *et al.*, "The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 10, no. 2, pp. 167-75, Feb 2009, doi: 10.1038/ni.1690.
- [103] R. I. Nurieva *et al.*, "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages," (in eng), *Immunity*, vol. 29, no. 1, pp. 138-49, Jul 18 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.009.
- [104] A. Ballesteros-Tato *et al.*, "Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation," (in eng), *Immunity*, vol. 36, no. 5, pp. 847-56, May 25 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.02.012.
- [105] R. I. Nurieva *et al.*, "STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 287, no. 14, pp. 11234-9, Mar 30 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.324046.
- [106] F. Larousserie, P. Charlot, E. Bardel, J. Froger, R. A. Kastelein, and O. Devergne, "Differential effects of IL-27 on human B cell subsets," (in eng), *J Immunol*, vol. 176, no. 10, pp. 5890-7, May 15 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.10.5890.
- [107] A. Boumendjel, L. Tawk, W. Malefijt Rde, V. Boulay, H. Yssel, and J. Pène, "IL-27 induces the production of IgG1 by human B cells," (in eng), *Eur Cytokine Netw*, vol. 17, no. 4, pp. 281-9, Dec 2006.
- [108] T. Yoshimoto *et al.*, "Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27," (in eng), *J Immunol*, vol. 173, no. 4, pp. 2479-85, Aug 15 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2479.
- [109] J. M. Povroznik and C. M. Robinson, "IL-27 regulation of innate immunity and control of microbial growth," (in eng), *Future Sci OA*, vol. 6, no. 7, p. Fso588, Jun 17 2020, doi: 10.2144/fsoa-2020-0032.
- [110] S. Wirtz *et al.*, "Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of interleukin 27," (in eng), *J Exp Med*, vol. 203, no. 8, pp. 1875-81, Aug 7 2006, doi: 10.1084/jem.20060471.
- [111] M. Bosmann *et al.*, "Interruption of macrophage-derived IL-27(p28) production by IL-10 during sepsis requires STAT3 but not SOCS3," (in eng), *J Immunol*, vol. 193, no. 11, pp. 5668-77, Dec 1 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1302280.
- [112] J. Cao *et al.*, "Activation of IL-27 signalling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia," (in eng), *EMBO Mol Med*, vol. 6, no. 1, pp. 120-40, Jan 2014, doi: 10.1002/emmm.201302890.
- [113] S. T. Passos, J. S. Silver, A. C. O'Hara, D. Sehy, J. S. Stumhofer, and C. A. Hunter, "IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis," (in eng), *J Immunol*, vol. 184, no. 4, pp. 1776-83, Feb 15 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0901843.
- [114] A. Yamanaka *et al.*, "Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis," (in eng), *J Immunol*,

- vol. 172, no. 6, pp. 3590-6, Mar 15 2004, doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3590.
- [115] T. McHedlidze, M. Kindermann, A. T. Neves, D. Voehringer, M. F. Neurath, and S. Wirtz, "IL-27 suppresses type 2 immune responses in vivo via direct effects on group 2 innate lymphoid cells," *Mucosal Immunol*, vol. 9, no. 6, pp. 1384-1394, Nov 2016, doi: 10.1038/mi.2016.20.
- [116] K. Moro *et al.*, "Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 17, no. 1, pp. 76-86, Jan 2016, doi: 10.1038/ni.3309.
- [117] J. Wei *et al.*, "Critical role of dendritic cell-derived IL-27 in antitumor immunity through regulating the recruitment and activation of NK and NKT cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 191, no. 1, pp. 500-8, Jul 1 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1300328.
- [118] A. Ziblat *et al.*, "IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness," *Eur J Immunol*, vol. 45, no. 1, pp. 192-202, Jan 2015, doi: 10.1002/eji.201444699.
- [119] Y. H. Choi, E. J. Lim, S. W. Kim, Y. W. Moon, K. S. Park, and H. J. An, "IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells," (in eng), *J Immunother Cancer*, vol. 7, no. 1, p. 168, Jul 5 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0652-7.
- [120] P. Kumar, K. Rajasekaran, A. Nanbakhsh, J. Gorski, M. Thakar, and S. Malarkannan, "IL-27 promotes NK cell effector functions via Maf-Nrf2 pathway during influenza infection," *Scientific Reports*, vol. 9, 2019.
- [121] F. Morandi, I. Prigione, and I. Airoidi, "Human TCR $\gamma\delta$ + T cells represent a novel target for IL-27 activity," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 42, no. 6, pp. 1547-52, Jun 2012, doi: 10.1002/eji.201142241.
- [122] J. Y. Jung and C. M. Robinson, "Interleukin-27 inhibits phagosomal acidification by blocking vacuolar ATPases," (in eng), *Cytokine*, vol. 62, no. 2, pp. 202-5, May 2013, doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.010.
- [123] S. S. Iyer, A. A. Ghaffari, and G. Cheng, "Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages," (in eng), *J Immunol*, vol. 185, no. 11, pp. 6599-607, Dec 1 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1002041.
- [124] G. D. Kalliolias and L. B. Ivashkiv, "IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38," (in eng), *J Immunol*, vol. 180, no. 9, pp. 6325-33, May 1 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6325.
- [125] X. M. Feng *et al.*, "Interleukin-27 upregulates major histocompatibility complex class II expression in primary human endothelial cells through induction of major histocompatibility complex class II transactivator," (in eng), *Hum Immunol*, vol. 68, no. 12, pp. 965-72, Dec 2007, doi: 10.1016/j.humimm.2007.10.004.
- [126] R. Tokunaga *et al.*, "CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy," (in eng), *Cancer Treat Rev*, vol. 63, pp. 40-47, Feb 2018, doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007.
- [127] A. P. Freitas do Rosário *et al.*, "IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection," (in eng), *J Immunol*, vol. 188, no. 3, pp. 1178-90, Feb 1 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102755.
- [128] E. Ayimba *et al.*, "Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria," (in eng), *Clin Exp Immunol*, vol. 166, no. 2, pp. 218-26, Nov 2011, doi:

- 10.1111/j.1365-2249.2011.04474.x.
- [129] L. E. Rosas *et al.*, "Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 168, no. 1, pp. 158-69, Jan 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.050013.
- [130] C. L. Karp *et al.*, "In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 91, no. 4, pp. 1644-8, Apr 1993, doi: 10.1172/jci116372.
- [131] S. Gautam *et al.*, "IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis," (in eng), *J Infect Dis*, vol. 204, no. 7, pp. 1134-7, Oct 1 2011, doi: 10.1093/infdis/jir461.
- [132] D. Rinchai *et al.*, "Production of interleukin-27 by human neutrophils regulates their function during bacterial infection," *Eur J Immunol*, vol. 42, no. 12, pp. 3280-90, Dec 2012, doi: 10.1002/eji.201242526.
- [133] J. Sun, H. Dodd, E. K. Moser, R. Sharma, and T. J. Braciale, "CD4+ T cell help and innate-derived IL-27 induce Blimp-1-dependent IL-10 production by antiviral CTLs," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 12, no. 4, pp. 327-34, Apr 2011, doi: 10.1038/ni.1996.
- [134] L. Liu *et al.*, "Influenza A virus induces interleukin-27 through cyclooxygenase-2 and protein kinase A signaling," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 287, no. 15, pp. 11899-910, Apr 6 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.308064.
- [135] M. T. de Aquino *et al.*, "IL-27 limits central nervous system viral clearance by promoting IL-10 and enhances demyelination," (in eng), *J Immunol*, vol. 193, no. 1, pp. 285-94, Jul 1 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1400058.
- [136] A. Garg, R. Trout, and S. A. Spector, "Human Immunodeficiency Virus Type-1 Myeloid Derived Suppressor Cells Inhibit Cytomegalovirus Inflammation through Interleukin-27 and B7-H4," (in eng), *Sci Rep*, vol. 7, p. 44485, Mar 24 2017, doi: 10.1038/srep44485.
- [137] Q. Chen *et al.*, "Interleukin-27 is a potent inhibitor of cis HIV-1 replication in monocyte-derived dendritic cells via a type I interferon-independent pathway," (in eng), *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e59194, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0059194.
- [138] L. Liu *et al.*, "Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis," (in eng), *J Exp Med*, vol. 208, no. 8, pp. 1635-48, Aug 1 2011, doi: 10.1084/jem.20110958.
- [139] S. Shibata *et al.*, "IL-27 Activates Th1-Mediated Responses in Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Lesions," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, no. 2, pp. 479-488, 2013/02/01/ 2013, doi: <https://doi.org/10.1038/jid.2012.313>.
- [140] S. Shibata *et al.*, "Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 130, no. 4, pp. 1034-9, Apr 2010, doi: 10.1038/jid.2009.349.
- [141] A. Yoshizaki *et al.*, "Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation," (in eng), *Ann Rheum Dis*, vol. 70, no. 1, pp. 194-200, Jan 2011, doi: 10.1136/ard.2009.121053.
- [142] K. Honda *et al.*, "T helper 1-inducing property of IL-27/WSX-1 signaling is required for the induction of experimental colitis," (in eng), *Inflamm Bowel Dis*, vol. 11, no. 12, pp. 1044-52, Dec 2005, doi: 10.1097/01.mib.0000191611.05466.1f.

- [143] A. E. Troy *et al.*, "IL-27 regulates homeostasis of the intestinal CD4<sup>+</sup> effector T cell pool and limits intestinal inflammation in a murine model of colitis," (in eng), *J Immunol*, vol. 183, no. 3, pp. 2037-44, Aug 1 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0802918.
- [144] M. Imielinski *et al.*, "Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease," (in eng), *Nat Genet*, vol. 41, no. 12, pp. 1335-40, Dec 2009, doi: 10.1038/ng.489.
- [145] Y. Miyazaki *et al.*, "Exacerbation of experimental allergic asthma by augmented Th2 responses in WSX-1-deficient mice," (in eng), *J Immunol*, vol. 175, no. 4, pp. 2401-7, Aug 15 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2401.
- [146] T. Yoshimoto, T. Yoshimoto, K. Yasuda, J. Mizuguchi, and K. Nakanishi, "IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation," (in eng), *J Immunol*, vol. 179, no. 7, pp. 4415-23, Oct 1 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4415.
- [147] M. Batten *et al.*, "Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 7, no. 9, pp. 929-36, Sep 2006, doi: 10.1038/ni1375.
- [148] C. M. Sweeney *et al.*, "IL-27 mediates the response to IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells," (in eng), *Brain Behav Immun*, vol. 25, no. 6, pp. 1170-81, Aug 2011, doi: 10.1016/j.bbi.2011.03.007.
- [149] B. Guo, E. Y. Chang, and G. Cheng, "The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 118, no. 5, pp. 1680-90, May 2008, doi: 10.1172/jci33342.
- [150] W. Niedbala *et al.*, "Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis," (in eng), *Ann Rheum Dis*, vol. 67, no. 10, pp. 1474-9, Oct 2008, doi: 10.1136/ard.2007.083360.
- [151] S. R. Pickens *et al.*, "Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis," (in eng), *Arthritis Rheum*, vol. 63, no. 8, pp. 2289-98, Aug 2011, doi: 10.1002/art.30324.
- [152] S. Tanida *et al.*, "IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration," (in eng), *Cytokine*, vol. 55, no. 2, pp. 237-44, Aug 2011, doi: 10.1016/j.cyto.2011.04.020.
- [153] Y. Cao, P. D. Doodles, T. T. Glant, and A. Finnegan, "IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis," (in eng), *J Immunol*, vol. 180, no. 2, pp. 922-30, Jan 15 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.2.922.
- [154] S. Zahn, S. Wirtz, M. Birkenbach, R. S. Blumberg, M. F. Neurath, and E. von Stebut, "Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 35, no. 4, pp. 1106-12, Apr 2005, doi: 10.1002/eji.200425926.
- [155] J. Do *et al.*, "Treg-specific IL-27R $\alpha$  deletion uncovers a key role for IL-27 in Treg function to control autoimmunity," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 38, pp. 10190-10195, 2017, doi: 10.1073/pnas.1703100114.
- [156] Q. T. Nguyen *et al.*, "IL-27 targets Foxp3<sup>+</sup> Tregs to mediate antiinflammatory functions during experimental allergic airway inflammation," (in eng), *JCI Insight*, vol. 4, no. 2, Jan 24 2019, doi: 10.1172/jci.insight.123216.

- [157] H. J. Newton, D. K. Ang, I. R. van Driel, and E. L. Hartland, "Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*," (in eng), *Clin Microbiol Rev*, vol. 23, no. 2, pp. 274-98, Apr 2010, doi: 10.1128/cmr.00052-09.
- [158] J. E. McDade, C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, and W. R. Dowdle, "Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 297, no. 22, pp. 1197-203, Dec 1 1977, doi: 10.1056/nejm197712012972202.
- [159] D. W. Fraser *et al.*, "Legionnaires' Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 297, no. 22, pp. 1189-1197, 1977, doi: 10.1056/nejm197712012972201.
- [160] A. L. Swart and H. Hilbi, "*Legionella pneumophila*," in *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier, 2020.
- [161] N. Phin *et al.*, "Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease," (in eng), *Lancet Infect Dis*, vol. 14, no. 10, pp. 1011-21, Oct 2014, doi: 10.1016/s1473-3099(14)70713-3.
- [162] M. Sabria and V. L. Yu, "Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection," (in eng), *Lancet Infect Dis*, vol. 2, no. 6, pp. 368-73, Jun 2002, doi: 10.1016/s1473-3099(02)00291-8.
- [163] B. S. Fields, R. F. Benson, and R. E. Besser, "Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation," (in eng), *Clin Microbiol Rev*, vol. 15, no. 3, pp. 506-26, Jul 2002, doi: 10.1128/cmr.15.3.506-526.2002.
- [164] T. H. Glick, M. B. Gregg, B. Berman, G. Mallison, W. W. Rhodes, Jr., and I. Kassanoff, "Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects," (in eng), *Am J Epidemiol*, vol. 107, no. 2, pp. 149-60, Feb 1978, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112517.
- [165] R. R. Muder and L. Y. Victor, "Infection Due to *Legionella* Species Other Than *L. pneumophila*," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 35, no. 8, pp. 990-998, 2002, doi: 10.1086/342884.
- [166] V. L. Yu *et al.*, "Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey," (in eng), *J Infect Dis*, vol. 186, no. 1, pp. 127-8, Jul 1 2002, doi: 10.1086/341087.
- [167] H. Hilbi, C. Hoffmann, and C. F. Harrison, "*Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence," (in eng), *Environ Microbiol Rep*, vol. 3, no. 3, pp. 286-96, Jun 2011, doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x.
- [168] A. L. Swart, C. F. Harrison, L. Eichinger, M. Steinert, and H. Hilbi, "Acanthamoeba and Dictyostelium as Cellular Models for *Legionella* Infection," (in eng), *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 8, p. 61, 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00061.
- [169] J. Barker, M. R. Brown, P. J. Collier, I. Farrell, and P. Gilbert, "Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation," (in eng), *Appl Environ Microbiol*, vol. 58, no. 8, pp. 2420-5, Aug 1992, doi: 10.1128/aem.58.8.2420-2425.1992.
- [170] J. W. Mercante and J. M. Winchell, "Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations," (in eng), *Clin Microbiol Rev*, vol. 28, no. 1, pp. 95-133, Jan 2015, doi: 10.1128/cmr.00029-14.
- [171] A. M. Correia *et al.*, "Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 374, no. 5, pp. 497-8, Feb 4 2016, doi: 10.1056/NEJMc1505356.
- [172] T. Hussell and T. J. Bell, "Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific

- context," *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 2, pp. 81-93, 2014/02/01 2014, doi: 10.1038/nri3600.
- [173] S. Gordon and P. R. Taylor, "Monocyte and macrophage heterogeneity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 12, pp. 953-964, 2005/12/01 2005, doi: 10.1038/nri1733.
- [174] M. Guilliams, B. N. Lambrecht, and H. Hammad, "Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections," (in eng), *Mucosal Immunol*, vol. 6, no. 3, pp. 464-73, May 2013, doi: 10.1038/mi.2013.14.
- [175] X. Liu and S. Shin, "Viewing Legionella pneumophila Pathogenesis through an Immunological Lens," *J Mol Biol*, vol. 431, no. 21, pp. 4321-4344, Oct 4 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.07.028.
- [176] B. Steiner, S. Weber, and H. Hilbi, "Formation of the Legionella-containing vacuole: phosphoinositide conversion, GTPase modulation and ER dynamics," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 308, no. 1, pp. 49-57, 2018/01/01/ 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.08.004>.
- [177] T. Kubori and H. Nagai, "The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera," (in eng), *Curr Opin Microbiol*, vol. 29, pp. 22-9, Feb 2016, doi: 10.1016/j.mib.2015.10.001.
- [178] N. Shohdy, J. A. Efe, S. D. Emr, and H. A. Shuman, "Pathogen effector protein screening in yeast identifies Legionella factors that interfere with membrane trafficking," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 13, pp. 4866-71, Mar 29 2005, doi: 10.1073/pnas.0501315102.
- [179] S. M. Moss, I. R. Taylor, D. Ruggero, J. E. Gestwicki, K. M. Shokat, and S. Mukherjee, "A Legionella pneumophila Kinase Phosphorylates the Hsp70 Chaperone Family to Inhibit Eukaryotic Protein Synthesis," (in eng), *Cell Host Microbe*, vol. 25, no. 3, pp. 454-462.e6, Mar 13 2019, doi: 10.1016/j.chom.2019.01.006.
- [180] M. F. Fontana *et al.*, "Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent Legionella pneumophila," (in eng), *PLoS Pathog*, vol. 7, no. 2, p. e1001289, Feb 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1001289.
- [181] A. Choy *et al.*, "The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation," (in eng), *Science*, vol. 338, no. 6110, pp. 1072-6, Nov 23 2012, doi: 10.1126/science.1227026.
- [182] M. Rolando *et al.*, "Legionella pneumophila S1P-lyase targets host sphingolipid metabolism and restrains autophagy," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 7, pp. 1901-6, Feb 16 2016, doi: 10.1073/pnas.1522067113.
- [183] D. L. Clemens, B. Y. Lee, and M. A. Horwitz, "Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila is associated with altered phagosomal fate," (in eng), *Infect Immun*, vol. 68, no. 5, pp. 2671-84, May 2000, doi: 10.1128/iai.68.5.2671-2684.2000.
- [184] J. C. Kagan, M. P. Stein, M. Pypaert, and C. R. Roy, "Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle," (in eng), *J Exp Med*, vol. 199, no. 9, pp. 1201-11, May 3 2004, doi: 10.1084/jem.20031706.
- [185] M. P. Machner and R. R. Isberg, "Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila," (in eng), *Dev Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 47-56, Jul 2006, doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.013.
- [186] G. Segal, M. Purcell, and H. A. Shuman, "Host cell killing and bacterial

- conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 4, pp. 1669-74, Feb 17 1998, doi: 10.1073/pnas.95.4.1669.
- [187] J. P. Vogel, H. L. Andrews, S. K. Wong, and R. R. Isberg, "Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*," (in eng), *Science*, vol. 279, no. 5352, pp. 873-6, Feb 6 1998, doi: 10.1126/science.279.5352.873.
- [188] B. Ku *et al.*, "VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages," (in eng), *PLoS Pathog*, vol. 8, no. 12, p. e1003082, 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1003082.
- [189] K. A. Archer and C. R. Roy, "MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of *Legionella pneumophila* in a mouse model of Legionnaires' disease," (in eng), *Infect Immun*, vol. 74, no. 6, pp. 3325-33, Jun 2006, doi: 10.1128/iai.02049-05.
- [190] T. R. Hawn *et al.*, "Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*," (in eng), *J Immunol*, vol. 179, no. 10, pp. 6981-7, Nov 15 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.10.6981.
- [191] A. Dalpke, J. Frank, M. Peter, and K. Heeg, "Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species," (in eng), *Infect Immun*, vol. 74, no. 2, pp. 940-6, Feb 2006, doi: 10.1128/iai.74.2.940-946.2006.
- [192] M. S. Frutuoso *et al.*, "The pattern recognition receptors Nod1 and Nod2 account for neutrophil recruitment to the lungs of mice infected with *Legionella pneumophila*," (in eng), *Microbes Infect*, vol. 12, no. 11, pp. 819-27, Oct 2010, doi: 10.1016/j.micinf.2010.05.006.
- [193] B. Opitz *et al.*, "*Legionella pneumophila* induces IFN $\beta$  in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 281, no. 47, pp. 36173-9, Nov 24 2006, doi: 10.1074/jbc.M604638200.
- [194] V. Hornung *et al.*, "AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC," (in eng), *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 514-8, Mar 26 2009, doi: 10.1038/nature07725.
- [195] W. F. Dietrich, D. M. Damron, R. R. Isberg, E. S. Lander, and M. S. Swanson, "Lgn1, a gene that determines susceptibility to *Legionella pneumophila*, maps to mouse chromosome 13," *Genomics*, vol. 26, no. 3, pp. 443-450, 1995/04/10/1995, doi: [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80161-E](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80161-E).
- [196] E. Diez *et al.*, "Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*," (in eng), *Nat Genet*, vol. 33, no. 1, pp. 55-60, Jan 2003, doi: 10.1038/ng1065.
- [197] E. K. Wright *et al.*, "Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*," (in eng), *Curr Biol*, vol. 13, no. 1, pp. 27-36, Jan 8 2003, doi: 10.1016/s0960-9822(02)01359-3.
- [198] D. S. Zamboni *et al.*, "The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 7, no. 3, pp. 318-25, Mar 2006, doi: 10.1038/ni1305.
- [199] M. Barry and R. C. Bleackley, "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 6, pp. 401-409, 2002/06/01 2002, doi: 10.1038/nri819.
- [200] N. K. Björkström, B. Strunz, and H.-G. Ljunggren, "Natural killer cells in antiviral immunity," *Nature Reviews Immunology*, 2021/06/11 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00558-3.
- [201] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini, "Functions of

- natural killer cells," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 5, pp. 503-510, 2008/05/01 2008, doi: 10.1038/ni1582.
- [202] P. Bhat, G. Leggatt, N. Waterhouse, and I. H. Frazer, "Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity," *Cell Death & Disease*, vol. 8, no. 6, pp. e2836-e2836, 2017/06/01 2017, doi: 10.1038/cddis.2017.67.
- [203] J. T. Summersgill, L. A. Powell, B. L. Buster, R. D. Miller, and J. A. Ramirez, "Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon-activated macrophages," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 52, no. 6, pp. 625-9, Dec 1992, doi: 10.1002/jlb.52.6.625.
- [204] A. M. Copenhaver, C. N. Casson, H. T. Nguyen, M. M. Duda, and S. Shin, "IL-1R signaling enables bystander cells to overcome bacterial blockade of host protein synthesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 24, pp. 7557-7562, 2015, doi: 10.1073/pnas.1501289112.
- [205] M. Fujita *et al.*, "TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to *Legionella pneumophila*-induced mortality in mice," (in eng), *Cytokine*, vol. 44, no. 2, pp. 298-303, Nov 2008, doi: 10.1016/j.cyto.2008.08.015.
- [206] J. K. Brieland, D. G. Remick, M. L. LeGendre, N. C. Engleberg, and J. C. Fantone, "In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous interleukin-12," (in eng), *Infect Immun*, vol. 66, no. 1, pp. 65-9, Jan 1998, doi: 10.1128/iai.66.1.65-69.1998.
- [207] Y. Shinozawa, T. Matsumoto, K. Uchida, S. Tsujimoto, Y. Iwakura, and K. Yamaguchi, "Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*," (in eng), *J Med Microbiol*, vol. 51, no. 3, pp. 225-230, Mar 2002, doi: 10.1099/0022-1317-51-3-225.
- [208] A. Hofmann, Y. Beaulieu, F. Bernard, and P. Rico, "Fulminant legionellosis in two patients treated with infliximab for Crohn's disease: case series and literature review," (in eng), *Can J Gastroenterol*, vol. 23, no. 12, pp. 829-33, Dec 2009, doi: 10.1155/2009/836938.
- [209] S. Giassi Kde, V. Furlanetto, Jr., S. Fialho, G. Gomes Ribeiro, and I. A. Pereira, "[*Legionella pneumonia* after infliximab in a patient with rheumatoid arthritis]," (in por), *Rev Bras Reumatol*, vol. 54, no. 5, pp. 397-9, Sep-Oct 2014, doi: 10.1016/j.rbr.2013.04.008. Pneumonia por *Legionella* após uso de Infliximabe em paciente com Artrite Reumatoide.
- [210] E. Blanchard, M. E. Truchetet, I. Machelart, J. Séneschal, and C. Raheison-Semjen, "Respiratory infections associated with anti-TNF $\alpha$  agents," (in eng), *Med Mal Infect*, vol. 47, no. 6, pp. 375-381, Oct 2017, doi: 10.1016/j.medmal.2017.05.002.
- [211] K. D. Lettinga, S. Weijer, P. Speelman, J. M. Prins, T. Van Der Poll, and A. Verbon, "Reduced interferon-gamma release in patients recovered from Legionnaires' disease," (in eng), *Thorax*, vol. 58, no. 1, pp. 63-7, Jan 2003, doi: 10.1136/thorax.58.1.63.
- [212] M. Akamine *et al.*, "Interferon-gamma reverses the evasion of Birc1e/Naip5 gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin," (in eng), *Microbiol Immunol*, vol. 51, no. 3, pp. 279-87, 2007, doi: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03909.x.
- [213] J. Naujoks *et al.*, "IFNs Modify the Proteome of *Legionella*-Containing Vacuoles and Restrict Infection Via IRG1-Derived Itaconic Acid," (in eng), *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 2, p. e1005408, Feb 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005408.
- [214] T. F. Byrd and M. A. Horwitz, "Interferon gamma-activated human monocytes

- downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 83, no. 5, pp. 1457-65, May 1989, doi: 10.1172/jci114038.
- [215] B. W. James, W. S. Mauchline, R. B. Fitzgeorge, P. J. Dennis, and C. W. Keevil, "Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*," (in eng), *Infect Immun*, vol. 63, no. 11, pp. 4224-30, Nov 1995, doi: 10.1128/iai.63.11.4224-4230.1995.
- [216] D. K. Blanchard, H. Friedman, W. E. Stewart, 2nd, T. W. Klein, and J. Y. Djeu, "Role of gamma interferon in induction of natural killer activity by *Legionella pneumophila* in vitro and in an experimental murine infection model," (in eng), *Infect Immun*, vol. 56, no. 5, pp. 1187-93, May 1988, doi: 10.1128/iai.56.5.1187-1193.1988.
- [217] J. C. Deng, K. Tateda, X. Zeng, and T. J. Standiford, "Transient transgenic expression of gamma interferon promotes *Legionella pneumophila* clearance in immunocompetent hosts," (in eng), *Infect Immun*, vol. 69, no. 10, pp. 6382-90, Oct 2001, doi: 10.1128/iai.69.10.6382-6390.2001.
- [218] R. Spörri, N. Joller, H. Hilbi, and A. Oxenius, "A Novel Role for Neutrophils As Critical Activators of NK Cells," *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 10, pp. 7121-7130, 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7121.
- [219] R. Spörri, N. Joller, U. Albers, H. Hilbi, and A. Oxenius, "MyD88-dependent IFN-gamma production by NK cells is key for control of *Legionella pneumophila* infection," (in eng), *J Immunol*, vol. 176, no. 10, pp. 6162-71, May 15 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6162.
- [220] M. Susa, B. Ticac, T. Rukavina, M. Doric, and R. Marre, "*Legionella pneumophila* Infection in Intratracheally Inoculated T Cell-Depleted or -Nondepleted A/J Mice," *The Journal of Immunology*, vol. 160, no. 1, pp. 316-321, 1998. [Online]. Available: <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/160/1/316.full.pdf>.
- [221] D. R. Park and S. J. Skerrett, "IL-10 enhances the growth of *Legionella pneumophila* in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of IFN-gamma: differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages," (in eng), *J Immunol*, vol. 157, no. 6, pp. 2528-38, Sep 15 1996.
- [222] S. Yoshizawa *et al.*, "*Legionella pneumophila* evades gamma interferon-mediated growth suppression through interleukin-10 induction in bone marrow-derived macrophages," (in eng), *Infect Immun*, vol. 73, no. 5, pp. 2709-17, May 2005, doi: 10.1128/iai.73.5.2709-2717.2005.
- [223] W. M. Oldham and H. E. Hamm, "Structural basis of function in heterotrimeric G proteins," (in eng), *Q Rev Biophys*, vol. 39, no. 2, pp. 117-66, May 2006, doi: 10.1017/s0033583506004306.
- [224] G. Milligan and E. Kostenis, "Heterotrimeric G-proteins: a short history," (in eng), *Br J Pharmacol*, vol. 147 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S46-55, Jan 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706405.
- [225] W. M. Oldham and H. E. Hamm, "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 60-71, 2008/01/01 2008, doi: 10.1038/nrm2299.
- [226] A. V. Smrcka, "G protein  $\beta\gamma$  subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling," (in eng), *Cell Mol Life Sci*, vol. 65, no. 14, pp. 2191-214, Jul 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8006-5.
- [227] T. M. Cabrera-Vera *et al.*, "Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation," *Endocrine Reviews*, vol. 24, no. 6, pp. 765-781, 2003, doi:

- 10.1210/er.2000-0026.
- [228] T. Fukuda *et al.*, "Exome reports A de novo GNB2 variant associated with global developmental delay, intellectual disability, and dysmorphic features," (in eng), *Eur J Med Genet*, vol. 63, no. 4, p. 103804, Apr 2020, doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103804.
- [229] L. A. Lansdon, E. A. Fleming, F. D. Viso, B. R. Sullivan, and C. J. Saunders, "Second patient with GNB2-related neurodevelopmental disease: Further evidence for a gene-disease association," (in eng), *Eur J Med Genet*, vol. 64, no. 7, p. 104243, May 7 2021, doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104243.
- [230] B. Stallmeyer *et al.*, "A Mutation in the G-Protein Gene GNB2 Causes Familial Sinus Node and Atrioventricular Conduction Dysfunction," (in eng), *Circ Res*, vol. 120, no. 10, pp. e33-e44, May 12 2017, doi: 10.1161/circresaha.116.310112.
- [231] J. Kuß *et al.*, "Familial Sinus Node Disease Caused by a Gain of GIRK (G-Protein Activated Inwardly Rectifying K(+) Channel) Channel Function," (in eng), *Circ Genom Precis Med*, vol. 12, no. 1, p. e002238, Jan 2019, doi: 10.1161/circgen.118.002238.
- [232] A. Yoda *et al.*, "Mutations in G protein  $\beta$  subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance," (in eng), *Nat Med*, vol. 21, no. 1, pp. 71-5, Jan 2015, doi: 10.1038/nm.3751.
- [233] Q. Zhang *et al.*, "Identification of potential diagnostic and prognostic biomarkers for prostate cancer," (in eng), *Oncol Lett*, vol. 18, no. 4, pp. 4237-4245, Oct 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10765.
- [234] S. Kotani *et al.*, "Molecular pathogenesis of disease progression in MLL-rearranged AML," (in eng), *Leukemia*, vol. 33, no. 3, pp. 612-624, Mar 2019, doi: 10.1038/s41375-018-0253-3.
- [235] H. Block *et al.*, "Gnb isoforms control a signaling pathway comprising Rac1, Plc $\beta$ 2, and Plc $\beta$ 3 leading to LFA-1 activation and neutrophil arrest in vivo," (in eng), *Blood*, vol. 127, no. 3, pp. 314-24, Jan 21 2016, doi: 10.1182/blood-2015-06-651034.
- [236] E. van den Bos *et al.*, "Knockout mouse models reveal the contributions of G protein subunits to complement C5a receptor-mediated chemotaxis," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 295, no. 22, pp. 7726-7742, May 29 2020, doi: 10.1074/jbc.RA119.011984.
- [237] E. L. Huttlin *et al.*, "Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks," (in eng), *Nature*, vol. 545, no. 7655, pp. 505-509, May 25 2017, doi: 10.1038/nature22366.
- [238] L. M. Massis *et al.*, "Legionella longbeachae Is Immunologically Silent and Highly Virulent In Vivo," (in eng), *J Infect Dis*, vol. 215, no. 3, pp. 440-451, Feb 1 2017, doi: 10.1093/infdis/jiw560.
- [239] A. V. Goncalves *et al.*, "Gasdermin-D and Caspase-7 are the key Caspase-1/8 substrates downstream of the NAIP5/NLRC4 inflammasome required for restriction of Legionella pneumophila," *PLoS Pathog*, vol. 15, no. 6, p. e1007886, Jun 2019, doi: 10.1371/journal.ppat.1007886.
- [240] E. Eckelhart *et al.*, "A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development," *Blood*, vol. 117, no. 5, pp. 1565-73, Feb 3 2011, doi: 10.1182/blood-2010-06-291633.
- [241] J. I. Hori and D. S. Zamboni, "The mouse as a model for pulmonary legionella infection," (in eng), *Methods Mol Biol*, vol. 954, pp. 493-503, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-161-5\_30.

- [242] B. Shrum *et al.*, "A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model," (in eng), *BMC Res Notes*, vol. 7, pp. 233-233, 2014, doi: 10.1186/1756-0500-7-233.
- [243] J. Weischenfeldt and B. Porse, "Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications," (in eng), *CSH Protoc*, vol. 2008, p. pdb.prot5080, Dec 1 2008, doi: 10.1101/pdb.prot5080.
- [244] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-8, Dec 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [245] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 248-254, 1976/05/07/ 1976, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [246] L. Chiossone, J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier, and T. Walzer, "Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program," (in eng), *Blood*, vol. 113, no. 22, pp. 5488-96, May 28 2009, doi: 10.1182/blood-2008-10-187179.
- [247] E. Eckelhart *et al.*, "A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development," (in eng), *Blood*, vol. 117, no. 5, pp. 1565-73, Feb 3 2011, doi: 10.1182/blood-2010-06-291633.
- [248] Y. Maekawa *et al.*, "Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 9, no. 10, pp. 1140-7, Oct 2008, doi: 10.1038/ni.1649.
- [249] D. Ruckerl, M. Hemann, T. Yoshimoto, S. Ehlers, and C. Hölscher, "Alternatively activated macrophages express the IL-27 receptor alpha chain WSX-1," *Immunobiology*, vol. 211, no. 6, pp. 427-436, 2006/09/14/ 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.008>.
- [250] G. Perona-Wright *et al.*, "Persistent loss of IL-27 responsiveness in CD8+ memory T cells abrogates IL-10 expression in a recall response," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 45, pp. 18535-40, Nov 6 2012, doi: 10.1073/pnas.1119133109.
- [251] K. Meissl *et al.*, "STAT1 Isoforms Differentially Regulate NK Cell Maturation and Anti-tumor Activity," (in eng), *Front Immunol*, vol. 11, p. 2189, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.02189.
- [252] K. G. Schmetterer and W. F. Pickl, "The IL-10/STAT3 axis: Contributions to immune tolerance by thymus and peripherally derived regulatory T-cells," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 47, no. 8, pp. 1256-1265, Aug 2017, doi: 10.1002/eji.201646710.
- [253] D. E. Johnson, R. A. O'Keefe, and J. R. Grandis, "Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 15, no. 4, pp. 234-248, 2018/04/01 2018, doi: 10.1038/nrclinonc.2018.8.
- [254] D. R. Hodge, E. M. Hurt, and W. L. Farrar, "The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer," (in eng), *Eur J Cancer*, vol. 41, no. 16, pp. 2502-12, Nov 2005, doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.016.
- [255] C. Guzzo, N. F. Che Mat, and K. Gee, "Interleukin-27 induces a STAT1/3- and NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine profile in human monocytes," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 285, no. 32, pp. 24404-11, Aug 6 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.112599.
- [256] G. M. Delgoffe and D. A. Vignali, "STAT heterodimers in immunity: A mixed message or a unique signal?," (in eng), *Jakstat*, vol. 2, no. 1, p. e23060, Jan 1 2013, doi: 10.4161/jkst.23060.

- [257] K. Hirahara *et al.*, "Asymmetric Action of STAT Transcription Factors Drives Transcriptional Outputs and Cytokine Specificity," (in eng), *Immunity*, vol. 42, no. 5, pp. 877-89, May 19 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.014.
- [258] I. Visan, "About STATs," *Nature Immunology*, vol. 16, no. 7, pp. 688-688, 2015/07/01 2015, doi: 10.1038/ni.3220.
- [259] S. Wilmes *et al.*, "Competitive binding of STATs to receptor phospho-Tyr motifs accounts for altered cytokine responses," (in eng), *Elife*, vol. 10, Apr 19 2021, doi: 10.7554/eLife.66014.
- [260] C. Petes, M. K. Mariani, Y. Yang, N. Grandvaux, and K. Gee, "Interleukin (IL)-6 Inhibits IL-27- and IL-30-Mediated Inflammatory Responses in Human Monocytes," (in English), *Frontiers in Immunology*, Original Research vol. 9, no. 256, 2018-February-15 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00256.
- [261] J. P. Li *et al.*, "Interleukin-27 as a negative regulator of human neutrophil function," (in eng), *Scand J Immunol*, vol. 72, no. 4, pp. 284-92, Oct 2010, doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02422.x.
- [262] X. Zhao *et al.*, "Neutrophil polarization by IL-27 as a therapeutic target for intracerebral hemorrhage," *Nature Communications*, vol. 8, no. 1, p. 602, 2017/09/19 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00770-7.
- [263] M. V. Patel, Z. Shen, R. M. Rossoll, and C. R. Wira, "IL-27 Expression and Responsiveness in Human Uterine Epithelial Cells and Fibroblasts In Vitro and the Role of Estradiol," (in eng), *J Interferon Cytokine Res*, vol. 38, no. 3, pp. 101-110, Mar 2018, doi: 10.1089/jir.2017.0038.
- [264] Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K. Ozaki, and T. Matsuo, "IL-27 Modulates Chemokine Production in TNF- $\alpha$  -Stimulated Human Oral Epithelial Cells," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 43, no. 3, pp. 1198-1206, 2017, doi: 10.1159/000481760.
- [265] S. R. Nielsen *et al.*, "IL-27 inhibits lymphatic endothelial cell proliferation by STAT1-regulated gene expression," (in eng), *Microcirculation*, vol. 20, no. 6, pp. 555-64, Aug 2013, doi: 10.1111/micc.12055.
- [266] J. S. Stumhofer *et al.*, "A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 11, no. 12, pp. 1119-26, Dec 2010, doi: ni.1957 [pii] 10.1038/ni.1957.
- [267] W. P. Chong *et al.*, "IL-27p28 inhibits central nervous system autoimmunity by concurrently antagonizing Th1 and Th17 responses," (in eng), *Journal of autoimmunity*, vol. 50, pp. 12-22, May 2014, doi: 10.1016/j.jaut.2013.08.003.
- [268] D. Dibra, J. Cutrera, X. Xia, B. Kallakury, L. Mishra, and S. Li, "Interleukin-30: a novel antiinflammatory cytokine candidate for prevention and treatment of inflammatory cytokine-induced liver injury," (in eng), *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 55, no. 4, pp. 1204-14, Apr 2012, doi: 10.1002/hep.24814.
- [269] S. I. Müller *et al.*, "A folding switch regulates interleukin 27 biogenesis and secretion of its  $\alpha$ -subunit as a cytokine," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 5, pp. 1585-1590, 2019, doi: 10.1073/pnas.1816698116.
- [270] L. Heath *et al.*, "Effector mechanisms responsible for gamma interferon-mediated host resistance to *Legionella pneumophila* lung infection: the role of endogenous nitric oxide differs in susceptible and resistant murine hosts," (in eng), *Infect Immun*, vol. 64, no. 12, pp. 5151-60, Dec 1996, doi: 10.1128/iai.64.12.5151-5160.1996.
- [271] A. S. Brown *et al.*, "Cooperation between Monocyte-Derived Cells and

- Lymphoid Cells in the Acute Response to a Bacterial Lung Pathogen," *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 6, p. e1005691, Jun 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005691.
- [272] B. G. Seman *et al.*, "Elevated Levels of Interleukin-27 in Early Life Compromise Protective Immunity in a Mouse Model of Gram-Negative Neonatal Sepsis," (in eng), *Infect Immun*, vol. 88, no. 3, Feb 20 2020, doi: 10.1128/iai.00828-19.
- [273] J. Fan *et al.*, "IL-27 is elevated in sepsis with acute hepatic injury and promotes hepatic damage and inflammation in the CLP model," *Cytokine*, vol. 127, p. 154936, 2020/03/01/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154936>.
- [274] C. N. Casson *et al.*, "Neutrophils and Ly6Chi monocytes collaborate in generating an optimal cytokine response that protects against pulmonary *Legionella pneumophila* infection," (in eng), *PLoS Pathog*, vol. 13, no. 4, p. e1006309, Apr 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006309.
- [275] P. Ziltener, T. Reinheckel, and A. Oxenius, "Neutrophil and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Immune Control of *Legionella pneumophila* Lung Infection via TNF and ROS," *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 4, p. e1005591, Apr 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005591.
- [276] E. I. Tuomanen *et al.*, "Chemokine-Dependent Neutrophil Recruitment in a Murine Model of *Legionella* Pneumonia: Potential Role of Neutrophils as Immunoregulatory Cells," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 4, pp. 2017-2024, 2001, doi: doi:10.1128/IAI.69.4.2017-2024.2001.
- [277] K. M. Robinson *et al.*, "The role of IL-27 in susceptibility to post-influenza *Staphylococcus aureus* pneumonia," (in eng), *Respiratory research*, vol. 16, no. 1, p. 10, Feb 5 2015, doi: 10.1186/s12931-015-0168-8.
- [278] X. Zha *et al.*, "IL-27/IL-27R Mediates Protective Immunity against Chlamydial Infection by Suppressing Excessive Th17 Responses and Reducing Neutrophil Inflammation," (in eng), *J Immunol*, vol. 206, no. 9, pp. 2160-2169, May 1 2021, doi: 10.4049/jimmunol.2000957.
- [279] N. W. Zwirner and A. Ziblat, "Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27," (in eng), *Front Immunol*, vol. 8, p. 25, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00025.
- [280] G. Wang, A. Lin, Q. Han, H. Zhao, Z. Tian, and J. Zhang, "IFN- $\gamma$  protects from apoptotic neutrophil-mediated tissue injury during acute *Listeria monocytogenes* infection," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 48, no. 9, pp. 1470-1480, Sep 2018, doi: 10.1002/eji.201847491.
- [281] G. Murugaiyan, A. Mittal, R. Lopez-Diego, L. M. Maier, D. E. Anderson, and H. L. Weiner, "IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 183, no. 4, pp. 2435-43, Aug 15 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0900568.
- [282] H. Zhang *et al.*, "An IL-27-Driven Transcriptional Network Identifies Regulators of IL-10 Expression across T Helper Cell Subsets," *Cell Reports*, vol. 33, no. 8, p. 108433, 2020/11/24/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108433>.
- [283] D. L. Aldridge, A. T. Phan, R. de Waal Malefyt, and C. A. Hunter, "Limited Impact of the Inhibitory Receptor TIGIT on NK and T Cell Responses during *Toxoplasma gondii* Infection," (in eng), *Immunohorizons*, vol. 5, no. 6, pp. 384-394, Jun 4 2021, doi: 10.4049/immunohorizons.2100007.
- [284] Y. Morita, E. A. Masters, E. M. Schwarz, and G. Muthukrishnan, "Interleukin-27 and Its Diverse Effects on Bacterial Infections," (in English), *Frontiers in Immunology*, Review vol. 12, no. 1752, 2021-May-17 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.678515.

- [285] A. Dallagi *et al.*, "The activating effect of IFN- $\gamma$  on monocytes/macrophages is regulated by the LIF–trophoblast–IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation," *Cellular & Molecular Immunology*, vol. 12, no. 3, pp. 326-341, 2015/05/01 2015, doi: 10.1038/cmi.2014.50.
- [286] T. N. Ellis and B. L. Beaman, "Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function," (in eng), *Immunology*, vol. 112, no. 1, pp. 2-12, May 2004, doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01849.x.
- [287] B. Nandi and S. M. Behar, "Regulation of neutrophils by interferon- $\gamma$  limits lung inflammation during tuberculosis infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 11, pp. 2251-2262, 2011, doi: 10.1084/jem.20110919.
- [288] C. J. Punjabi, J. D. Laskin, K. J. Pendino, N. L. Goller, S. K. Durham, and D. L. Laskin, "Production of nitric oxide by rat type II pneumocytes: increased expression of inducible nitric oxide synthase following inhalation of a pulmonary irritant," (in eng), *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 11, no. 2, pp. 165-72, Aug 1994, doi: 10.1165/ajrcmb.11.2.7519435.
- [289] E. E. Schneeberger, M. DeFerrari, M. J. Skoskiewicz, P. S. Russell, and R. B. Colvin, "Induction of MHC-determined antigens in the lung by interferon-gamma," (in eng), *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 55, no. 2, pp. 138-44, Aug 1986.
- [290] M. Cheng and S. Hu, "Lung-resident  $\gamma\delta$  T cells and their roles in lung diseases," (in eng), *Immunology*, vol. 151, no. 4, pp. 375-384, Aug 2017, doi: 10.1111/imm.12764.
- [291] C. Paget and F. Trottein, "Role of type 1 natural killer T cells in pulmonary immunity," *Mucosal Immunology*, vol. 6, no. 6, pp. 1054-1067, 2013/11/01 2013, doi: 10.1038/mi.2013.59.
- [292] D. M. Lai, Q. Shu, and J. Fan, "The origin and role of innate lymphoid cells in the lung," (in eng), *Military Medical Research*, vol. 3, p. 25, 2016, doi: 10.1186/s40779-016-0093-2.
- [293] J. B. Noon, A. Sharma, J. Platten, L. J. Quinton, C. Reinhardt, and M. Bosmann, "IL-27 enhances the lymphocyte mediated innate resistance to primary hookworm infection in the lungs," *bioRxiv*, p. 2020.08.12.248021, 2020, doi: 10.1101/2020.08.12.248021.
- [294] T. Murakami *et al.*, "Cutting Edge: G Protein Subunit  $\beta$  1 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation," *The Journal of Immunology*, vol. 202, no. 7, pp. 1942-1947, 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1801388.
- [295] T. Tang, T. Gong, W. Jiang, and R. Zhou, "GPCRs in NLRP3 Inflammasome Activation, Regulation, and Therapeutics," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 39, no. 9, pp. 798-811, 2018/09/01/ 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.07.002>.
- [296] P. A. Insel *et al.*, "GPCR expression in tissues and cells: are the optimal receptors being used as drug targets?," (in eng), *British journal of pharmacology*, vol. 165, no. 6, pp. 1613-1616, 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01434.x.
- [297] Y. Tan, Q. Wang, B. Zhao, Y. She, and X. Bi, "GNB2 is a mediator of lidocaine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells," (in eng), *Neurotoxicology*, vol. 54, pp. 53-64, May 2016, doi: 10.1016/j.neuro.2016.03.015.
- [298] S. Ewig *et al.*, "Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie – Update 2021," (in De), *Pneumologie*, no. EFirst, //.

## **IV. Anhang**

### **Danksagung**