

Der Toll-like-Rezeptor-4-Signalweg bei Cystischer Fibrose

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gerrit John

aus Berlin

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
06.10.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Buckel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Fehrenbach

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2008

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Der Toll-like-Rezeptor-4-Signalweg bei Cystischer Fibrose

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 29.07.2008

(Ort/Datum)

Gerrit John

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cystische Fibrose	1
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Das CFTR Membranprotein.....	2
1.1.3	Mutationen des CFTR-Gens.....	3
1.1.4	Pathophysiologie	4
1.1.5	Diagnose	5
1.2	Abwehrmechanismen der Lunge	6
1.2.1	Zellulärer Aufbau der Lunge	6
1.2.2	Die angeborene Immunität der Lunge	7
1.2.3	Die Toll-like Rezeptoren	8
1.3	Infektion und Entzündung der Lunge bei CF	11
1.3.1	Initiierung von Infektion und Entzündung.....	11
1.3.2	Veränderungen der Atemwegssekrete	12
1.3.3	Mucus und Mucine	13
1.3.4	Mucine in erkrankten Atemwegen	15
1.3.5	Bakterielle Besiedlung	17
1.4	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Zelllinien	20
2.2	Zellkultur	21
2.3	Bakterienkultur.....	23
2.4	Stimulation der Zellen	23
2.5	RNA-Isolierung und real-time RT-PCR	24
2.6	Western Blot	26
2.7	FACS-Analyse	28
2.8	Immunfluoreszenz	29
2.9	NF-κB-Reporterplasmid	30
2.10	Transfektion von siRNA	31
2.11	ELISA	31
2.12	Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen	32
2.13	Immunhistochemie.....	33
2.14	Statistische Auswertung	34

3	Ergebnisse.....	35
3.1	Der Nachweis des muren CFTR-Proteins.....	35
3.2	Der TLR-4-Signalweg ist bei CF-Bronchialepithelzellen verändert.	36
3.2.1	Die Sekretion von IL-8 ist bei korrigierten CF-Zellen erhöht.	36
3.2.2	Die Stimulation der Zellen mit LPS ist spezifisch.....	38
3.2.3	Die Zellen reagieren nicht auf die Stimulation mit LTA.	39
3.2.4	Die Sekretion von IP-10.....	41
3.2.5	Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt TLR-abhängig.	42
3.2.6	Die Inhibition von TLR-4 auf der Zelloberfläche.....	43
3.2.7	Die LPS-stimulierte Sekretion von IL-8 wird über TLR-4 vermittelt...	44
3.2.8	Die mRNA-Expression von Komponenten des TLR-Signalwegs.	47
3.2.9	Auf der Zelloberfläche ist TLR-4 bei korrigierten CF-Zellen erhöht...	49
3.2.10	Veränderungen der Oberflächenexpression von TLR-4.	52
3.2.11	Die Bronchialepithel-Zelllinie HBE als Kontrolle.	53
3.3	Die Aktivierung weiterer Signalwege.	54
3.3.1	Der MAPK-Signalweg.....	54
3.3.2	Die Mucine MUC5AC und MUC5B.....	56
3.4	Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen.	57
4	Diskussion	59
4.1	Das etablierte Zellkultur-Modell ist für Untersuchungen zu CF geeignet.	59
4.2	Der TLR-4-Signalweg ist bei CF beeinträchtigt.....	61
4.3	Mögliche Ursachen der verringerten TLR-4-Oberflächenexpression.	68
4.4	Die indirekte Aktivierung von MAPKs und Mucinen.....	70
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Anhänge	89
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	89
7.2	Publikationen	91

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

1.1.1 Allgemeines

Cystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, ist mit schätzungsweise einer pro 3.300 Geburten die häufigste autosomal rezessive und grundsätzlich letal verlaufende Erbkrankheit der weißen Erdbevölkerung (1, 2). Entsprechend der Häufigkeit der Krankheit liegt die Genträgerfrequenz (Heterozygotie) in dieser Gruppe bei ca. 1:20, wohingegen sie bei Angehörigen anderer Bevölkerungsgruppen wie Afrikanern und Asiaten mit ca. 1:200-400 deutlich verringert ist. Die derzeitigen Therapieformen und Medikamente haben die Lebenserwartung von Patienten mit CF seit Beschreibung der Krankheit in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts zwar deutlich ansteigen lassen, so dass die meisten heute das Erwachsenenalter erreichen (3, 4), jedoch ist eine die Symptome kontrollierende Therapie oder gar eine Heilung bislang weder erkennbar noch möglich. In Deutschland leiden etwa 6.000 bis 8.000 Menschen unter der Krankheit (Schätzung Christiane-Herzog-Stiftung und Mukoviszidose e.V.).

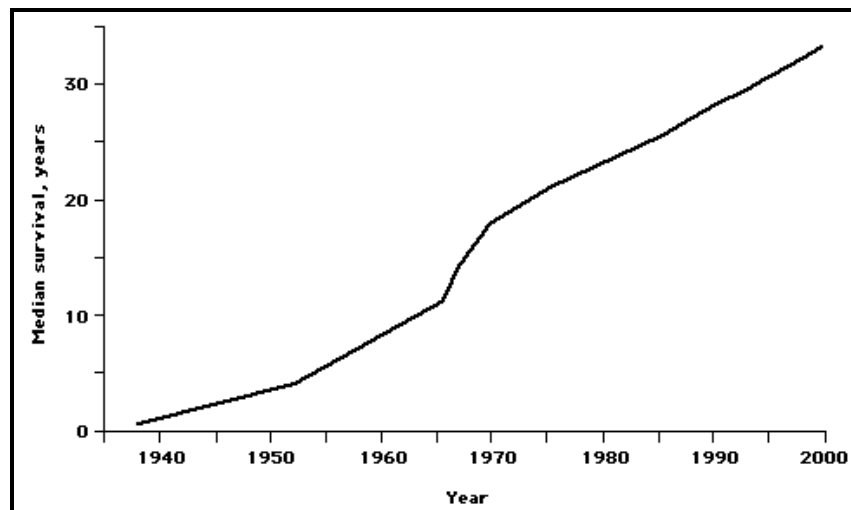


Abb. 1: Mediane Überlebensrate in Jahren von Patienten mit CF seit Beschreibung der Krankheit im Jahre 1938 (3).

1.1.2 Das CFTR Membranprotein

Die Ursache von CF sind Mutationen in einem Gen, das sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7 an Position q31.2 befindet und für den *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) kodiert (5). Das normale Genprodukt des CFTR ist ein integrales Glykoprotein, das vor allem in der apikalen Membran von Epithelzellen in sekretorischen Organen wie Lunge, Pankreas, Darm, Reproduktionstrakt und der Haut zu finden ist. Es gehört zur Familie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter und fungiert in der Zellmembran als cAMP-regulierter Chlorid-Kanal. Mit einer Länge von 1.480 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa besteht das CFTR-Protein aus fünf Domänen: zwei Transmembrandomänen (TM oder MSD), die ihrerseits aus je sechs Segmenten aufgebaut sind und den Ionenkanal bilden; zwei Nukleotidbindedomänen (NBD), die ATP binden und hydrolysieren, sowie einer regulatorischen (R) Domäne (Abb. 2). Ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels führt zur Phosphorylierung der R-Domäne durch Proteinkinasen, insbesondere durch Proteinkinase A (PKA). Im Anschluss bindet ATP an die NBD des Proteins, wodurch es zu einer Konformationsänderung und damit verbunden zur Öffnung des Ionenkanals für Chlorid kommt (6). Auf diese Weise werden Chlorid-Ionen aus der Zelle ins Lumen transportiert oder in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen aus den Sekreten reabsorbiert (vgl. 1.1.4 Pathophysiologie).

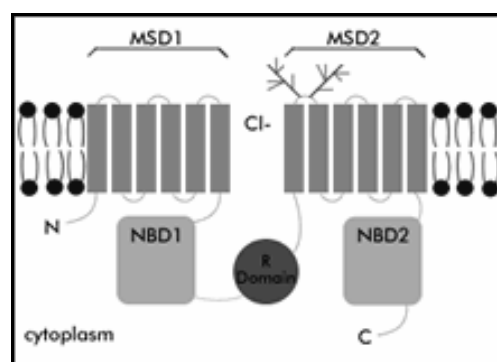


Abb. 2: Molekulare Struktur des CFTR-Proteins. MSD = Membranspannende Domäne, NBD = Nukleotidbindedomäne, R-Domain = regulatorische Domäne (6).

1.1.3 Mutationen des CFTR-Gens

Insgesamt sind ca. 1.000 Mutationen des CFTR-Gens bekannt, die alle das Krankheitsbild der Mukoviszidose zur Folge haben. Allerdings zeigt sich dies in unterschiedlicher klinischer Ausprägung, so dass von einer Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp ausgegangen wird (4, 7, 8). Die Mutationen können aufgrund ihres Defektes am Protein in fünf Klassen eingeteilt werden: 1. keine Synthese, 2. defekte Reifung des Proteins, 3. defekte Regulation, 4. defekte Leitfähigkeit und 5. verminderte Proteinmenge aufgrund verringerter mRNA-Expression (9). Bei den Mutationen der Klasse 2 werden CFTR-Kanäle vermutlich aufgrund ihrer leicht veränderten Proteinstruktur als fehlgefaltet von der Qualitätskontrolle am Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle erkannt, dort festgehalten und dem Abbau zugeführt (10-12). Hierzu zählt auch die weitaus häufigste Mutation, die bei etwa 70% aller Patienten aufgrund einer Deletion von drei Basenpaaren zum Fehlen eines Phenylalanins an Position 508 ($\Delta F508$) in der Aminosäuresequenz des CFTR-Proteins führt und die NBD1 betrifft (13) (Abb. 3). Werden üblicherweise etwa 70% des Wildtyp-Proteins abgebaut, so werden annähernd 100% dieser mutierten Form dem Abbau zugeführt, ohne dass es zu einer vollständigen Reifung und einem Einbau in die apikale Membran, den eigentlichen Wirkort von CFTR, kommt (14-16). Allerdings kann das $\Delta F508$ -Protein trotz Fehlfaltung seine Aufgaben als Chlorid-Kanal erfüllen, wenn es unter bestimmten Bedingungen in die Zellmembran eingebaut wird (17-19). Jedoch geschieht dies mit einer reduzierten Halbwertszeit (20, 21) sowie mit einer selbst nach cAMP-Stimulation deutlich verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit (22, 23).

CFTR Sequence:					
Nucleotide	ATC	ATC	TTT	GGT	GTT
Amino Acid	Ile	Ile	Phe	Gly	Val
	506		508		510
			Deleted in $\Delta F508$		
$\Delta F508$ CFTR Sequence:					
Nucleotide	ATC	ATT	GGT	GTT	
Amino Acid	Ile	Ile	Gly	Val	
	506				

Abb. 3: CFTR-Mutation $\Delta F508$. Die Deletion von Phenylalanin (Phe) an Position 508 der Aminosäuresequenz ist die häufigste Mutation bei CF. Isoleucin (Ile) an Position 507 ist hierbei nicht betroffen, da sowohl ATC als auch ATT für die Aminosäure kodieren.

1.1.4 Pathophysiologie

Die durch die Mutation verursachte Störung des Chlorid-Transports beeinträchtigt den Ionen- und Wasserhaushalt der Zelle sowie der Sekrete (24). Neben den CFTR-Kanälen sind Calcium-stimulierbare Chlorid-Kanäle weiterhin in der Lage, Ionen zu transportieren, können jedoch den Verlust des CFTR nicht ausgleichen. Es kommt somit zu einer Akkumulation von Chlorid-Ionen in der Zelle (Abb. 4). Dieses Ungleichgewicht im Ionentransport sowie das Fehlen der regulatorischen Funktion des CFTR auf epitheliale Natrium-Kanäle (ENaC) haben wiederum eine erhöhte Absorption von Natrium-Ionen und Wasser zur Folge (25-27). Dies führt zum Entzug von Wasser aus den Sekreten und somit zu erhöhter Viskosität. In den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen in der Haut bewirkt der CFTR-Defekt eine verminderte Chlorid- und damit auch Natriumreabsorption. Das Resultat ist Schweiß mit abnormal hoher Elektrolytkonzentration (28).

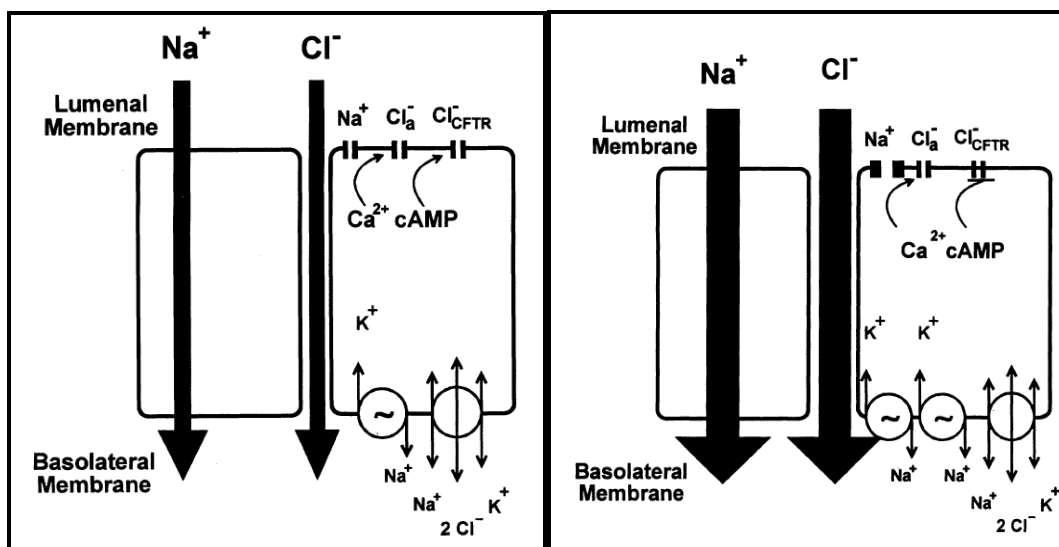


Abb. 4: Netto-Ionenfluss im normalen (links) und CF (rechts) Atemwegsepithel. Der aktive Transport von Natrium-Ionen stellt die treibende Kraft für die Absorption von Flüssigkeit. Natrium gelangt über selektive Kanäle an der apikalen Membran in die Zelle und wird über Na^+ -K⁺-ATPasen an der basolateralen Membran aus der Zelle gepumpt; der begleitende absorptive Fluss von Chlorid und Wasser erfolgt über parazelluläre Wege. Der Transport von Chlorid über cAMP-abhängige (CFTR) und Ca^{2+} -regulierte Kanäle führt zur Sekretion von Wasser. Bei CF kommt es aufgrund der defekten CFTR-Funktion zu einer Akkumulation von Chlorid in der Zelle und zu einer erhöhten Absorption von Natrium. Dies führt zum Entzug von Wasser aus den Sekreten (29).

Die veränderte Qualität der Sekrete verursacht obstruktive, zystisch-fibrotische Prozesse in den verschiedenen Organsystemen. Beim Neugeborenen ist vorwiegend der Darm betroffen. Im Säuglingsalter stehen die exokrine Dysfunktion der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), die bei 85-90% der Patienten vorliegt, und chronische Infektionen der Atemwege im Vordergrund. Die mit der Pankreasinsuffizienz verbundene Malabsorption der Nahrung führt zu Mangelernährung und somit zu Störungen der körperlichen Entwicklung. Die zunehmende Fibrosierung des Pankreas kann den Ausfall endokriner Funktionen und die Entwicklung eines Diabetes mellitus bewirken. Beim Erwachsenen sind zusätzlich Gallensteine, biliäre Zirrhose sowie Infertilität beim Mann zu beobachten. Doch obwohl es sich bei CF um eine Multiorganerkrankung handelt, spielen die Komplikationen im Bereich der Atemwege die Hauptrolle, da sie in über 90% der Fälle für die frühe Mortalität verantwortlich sind. Die dominanten Zeichen sind hierbei erhöhte Infektanfälligkeit, chronischer Husten mit purulentem Auswurf, Sinusitis, Bronchitis, Besiedlung mit für CF typischen Erregern (*Staphylokokken*, *Pseudomonas aeruginosa*) und rezidivierende Bronchopneumonien. Obstruktive, infektiöse und entzündliche Prozesse führen im weiteren Verlauf zu eingeschränkter Lungenfunktion und schließlich zu Ateminsuffizienz (4, 8, 9, 24).

1.1.5 Diagnose

Die Diagnose wird meist im Kindesalter gestellt, in mehr als 50% der Fälle bereits in den ersten Lebensmonaten. Nur selten wird die Erkrankung im Erwachsenenalter erkannt, meist handelt es sich hierbei um mildere Verlaufsformen. Als konventioneller Test dient die Bestimmung der Elektrolytkonzentration im Schweiß. Hierbei sind Chlorid-Konzentrationen > 60 mEq/l für CF spezifisch, während bei Gesunden Werte ≤ 40 mEq/l gemessen werden. Diagnostisch ausschlaggebend ist jedoch der Nachweis von zwei Mutationen des CFTR-Gens. Heterozygote Träger können nur durch die Mutationsanalyse zuverlässig identifiziert werden. In Anbetracht der großen Zahl von Mutationen sind Kenntnisse über ihre relative Häufigkeit in der Bevölkerungsgruppe des Betroffenen sowie eine Familienanamnese von Bedeutung (30, 31).

1.2 Abwehrmechanismen der Lunge

1.2.1 Zellulärer Aufbau der Lunge

Der Respirationstrakt des Menschen enthält verschiedene spezialisierte Epithelzellen, die sich aus ursprünglich undifferenzierten Zellen des Endoderms bilden (32, 33). Die oberen Bereiche der Atemwege bestehen aus pseudostratifiziertem (columnarem) Epithel mit Zilien tragenden Zellen, Schleim sezernierenden Becherzellen, Basalzellen sowie submukösen Drüsen. Die serösen Becher- und Drüsenzellen sind für die Bildung der Schleimschicht verantwortlich, die durch den koordinierten Zilienschlag transportiert wird. Dieser Teil der Lunge dient in erster Linie der Reinigung der Atemwege und wird auch als Flimmer- oder respiratorisches Epithel bezeichnet. In den sich anschließenden Bronchiolen erfolgt der Übergang vom columnaren zum kubischen Epithel. Hier findet sich ein geringerer Anteil Zilien tragender Zellen und es kommen Schleim sezernierende Clarazellen hinzu. Die flachen Typ I Pneumozyten, die auch als Deckzellen bezeichnet werden, und die kubischen Typ II Pneumozyten, auch Nischenzellen genannt, finden sich in den Alveolen, in denen der Gasaustausch erfolgt. Typ I Pneumozyten bilden etwa 95% der Alveolaroberfläche und sind für den Gasaustausch verantwortlich. Die Bildung des Surfactant erfolgt durch die Typ II Pneumozyten, die nur 5% der Alveolaroberfläche bedecken. Eine histologische Übersicht der Lunge mit den verschiedenen Zelltypen zeigt Abbildung 5.

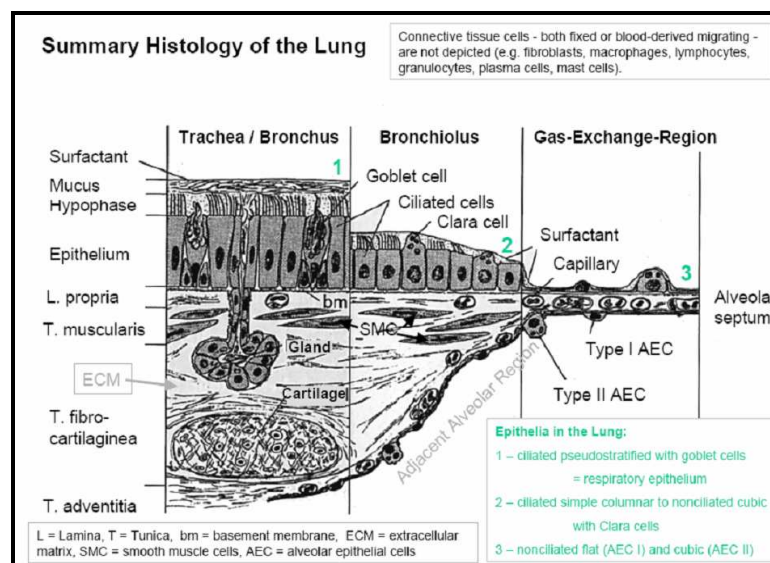


Abb. 5: Histologische Übersicht der humanen Lunge mit den verschiedenen Zelltypen (32).

1.2.2 Die angeborene Immunität der Lunge

Die Lunge steht in direktem Kontakt mit der Umwelt und wird permanent von mit Bakterien und anderen Krankheitserregern kontaminierter Luft durchströmt. Dennoch sind Infektionen der Atemwege selten. Grund dafür ist ein aus mehreren Komponenten bestehendes Abwehrsystem (34). Das Zilien tragende Atemwegsepithel verhindert als physikalische Barriere, dass Keime in den Körper eindringen, und ist hierfür zusätzlich mit einer Schleimschicht, dem Atemwegssekret oder Mucus, überzogen. Darin werden Mikroorganismen gefangen und können durch den koordinierten Zilienschlag in Richtung des Pharynx transportiert und mit dem Schleim ausgehustet werden. Für die rheologischen Eigenschaften der Schleimschicht sind vor allem die von Becher- und Drüsenzellen sezernierten Mucin-Proteine von Bedeutung. Das Sekret dient aber nicht nur dem Schutz der Atemwege, indem es den direkten Kontakt zwischen Epithel und Mikroorganismen zu verhindern sucht, sondern wirkt durch seine Zusammensetzung selbst antimikrobiell (35, 36). Viele lösliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind darin enthalten, wie die Proteine des Komplementsystems, Clarazell-Proteine, Antiproteasen und antimikrobielle Peptide. Pathogene, die den passiven Abwehrmechanismen entgangen sind, werden durch die in der Lunge vorhandenen Zellen der angeborenen Immunantwort, in erster Linie Alveolarmakrophagen, phagozytiert (37). Nach weiterer Prozessierung der Keime werden an MHC (major histocompatibility complex) gebundene Antigen-Fragmente auf der Zelloberfläche präsentiert und durch Kontakt naive T-Zellen, also Komponenten der adaptiven Immunität, aktiviert (38). Ebenso kommt es zu einer Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-8 und IL-6. Dies hat Einfluss auf die Reaktion des Epithels und führt zur Einwanderung weiterer Immunzellen in das entzündete Gewebe. Neutrophile Granulozyten reagieren als erste auf die chemotaktischen Reize und wandern relativ kurz nach der Infektion zum Ort der Entzündung (39). Dort unterstützen sie die Makrophagen bei der Abwehr der Infektion durch Phagozytose und durch Sekretion weiterer antimikrobieller Substanzen.

Die für eine Entzündung relevanten Signalwege werden durch Erkennung und Aufnahme von Mikroorganismen und ihrer Komponenten mittels verschiedener Rezeptorsysteme der Zellen aktiviert. Hierzu zählen vor allem die Toll-like Rezeptoren (TLRs), die aufgrund ihrer Diversität und Spezifität wichtige regulatorische Funktionen sowohl für die angeborene als auch die adaptive Immunität übernehmen (40). Die Entdeckung einer umfangreichen Expression von TLRs in den Epithelzellen der Atemwege zeigt deutlich, dass das Epithel neben der passiven Funktion als physikalische Barriere auch aktiv an der Abwehr von Pathogenen mitwirkt (41, 42). Somit erfolgt ebenso von sogenannten Nicht-Immunzellen als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli eine Sekretion von Zytokinen und anderen Substanzen in das Lumen der Atemwege sowie in das unter dem Epithel liegende Gewebe (43-45).

1.2.3 Die Toll-like Rezeptoren

Das Toll-Gen wurde erstmalig in *Drosophila melanogaster* identifiziert (46). Neben der entscheidenden Funktion des Gens für die dorsoventrale Polarisation in der Ontogenese von *Drosophila* zeigte sich später auch die bedeutende Rolle für die angeborene Immunantwort bei Pilzbefall. Das erste humane Homolog zu Toll, der Toll-like Rezeptor (TLR)-4, konnte 1997 identifiziert werden (47). Mittlerweile sind zehn dieser Rezeptoren im Menschen beschrieben (48).

TLRs zählen zu den Typ I Transmembranproteinen (Singlepass mit extrazellulärem N-Terminus) und fungieren als PRRs (pathogen recognition receptors), indem sie molekulare Strukturen der Pathogene, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) erkennen (49). Für nahezu alle TLRs sind entsprechende, zumeist mikrobielle Liganden bekannt (Tab. 1). Zusätzlich führt die Heterodimerisierung des Rezeptors zur Erweiterung des Repertoires an detektierbaren PAMPs. Die Leucin-reiche extrazelluläre Domäne stellt das gemeinsame Merkmal aller TLRs dar und ist für die Pathogenerkennung zuständig, während die Signaltransduktion durch die intrazelluläre Domäne vermittelt wird. Neben den zu Toll homologen Sequenzabschnitten zeichnet sich letztere durch eine große Ähnlichkeit zum IL-1 Rezeptor (IL-1R) aus und wird deshalb auch als TIR (Toll/IL-1R) Domäne bezeichnet. Zusammen bilden IL-1Rs und TLRs die TIR Superfamilie.

Tab. 1: Humane TLRs und Beispiele ihrer Liganden.

TLR	Ligand	Pathogene
TLR-2	Lipoproteine/Lipopeptide/Lipoteichonsäure (LTA) Zymosan	Grampositive Bakterien Pilze
TLR-2/1	Triacyllipoproteine	Mycobacteria
TLR-2/6	Diacyllipoproteine	Mycoplasma
TLR-3	dsRNA	Viren
TLR-4	Lipopolysaccharid (LPS)	Gramnegative Bakterien
TLR-5	Flagellin	Begeißelte Bakterien
TLR-7/8	ssRNA	Viren
TLR-9	CpG DNA	Bakterien
TLR-11	Profilin	Uropathogene Bakterien

Durch die Bindung eines Liganden kommt es zur Dimerisierung der TLRs, die wie im Fall von TLR-4 Homodimere oder wie bei TLR-2/1 und TLR-2/6 Heterodimere bilden. Bei bislang allen TLRs, mit der Ausnahme von TLR-3, interagiert die TIR-Domäne mit dem Adapterprotein MyD88 (myeloid differentiation factor 88), wodurch es zur Rekrutierung und Aktivierung von IRAKs (IL-1 receptor-associated kinases) und TRAF-6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) kommt. Am Ende der Kaskade steht schließlich die Phosphorylierung von I κ B und damit verbunden dessen Degradation. Daraus folgt die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor kappa B), der die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-8 reguliert und nach Translokation in den Nukleus einen Anstieg der entsprechenden Genexpression vermittelt. Daneben kann es auch zur Aktivierung des MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Wegs, vor allem von p38 und JNK (c-Jun N-terminal kinase) kommen. Dieser Weg, der normalerweise direkt durch Wachstumsfaktoren oder durch Stress und Entzündungsprozesse freigesetzte Zytokine vermittelt wird, führt wiederum zur Freisetzung weiterer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und ELK-1, welche die Transkription anderer Gene sowie die mRNA Stabilität regulieren und beeinflussen (49).

Die Diversität und Spezifität der TLRs wird zusätzlich durch die Verwendung verschiedener intrazellulärer Adapterproteine erhöht. Neben MyD88 wird Mal (MyD88 adapter like) bei TLR-2 und TLR-4 für die Aktivierung von NF- κ B benötigt. TLR-3 benutzt ausschließlich das Molekül TRIF (TIR domain containing adaptor inducing interferon- β), um antivirale Immunität durch die Synthese von Interferon

(IFN)- β und anderer Zytokine wie IP-10 (Interferon- γ inducible protein 10) über IRF-3 (IFN-regulatory factor 3) zu induzieren. Dieser auch als MyD88-unabhängig bezeichnete Weg kann ebenso von TLR-4 genutzt werden, wobei dafür die Adapterproteine TRIF und TRAM (TRIF-related adaptor molecule) erforderlich sind (50). Eine Übersicht der Signalkaskade zeigt Abbildung 6.

Die Bindung von Lipopolysaccharid (LPS), dem Hauptbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, an TLR-4 erfordert die Anwesenheit der Co-Rezeptoren CD14 und MD-2. LPS bindet zunächst an LBP (LPS binding protein), welches die LPS-Monomere an CD14 überträgt. Dort reichert sich das LPS an und kann schließlich an den TLR-4/MD-2 Komplex binden (48, 51).

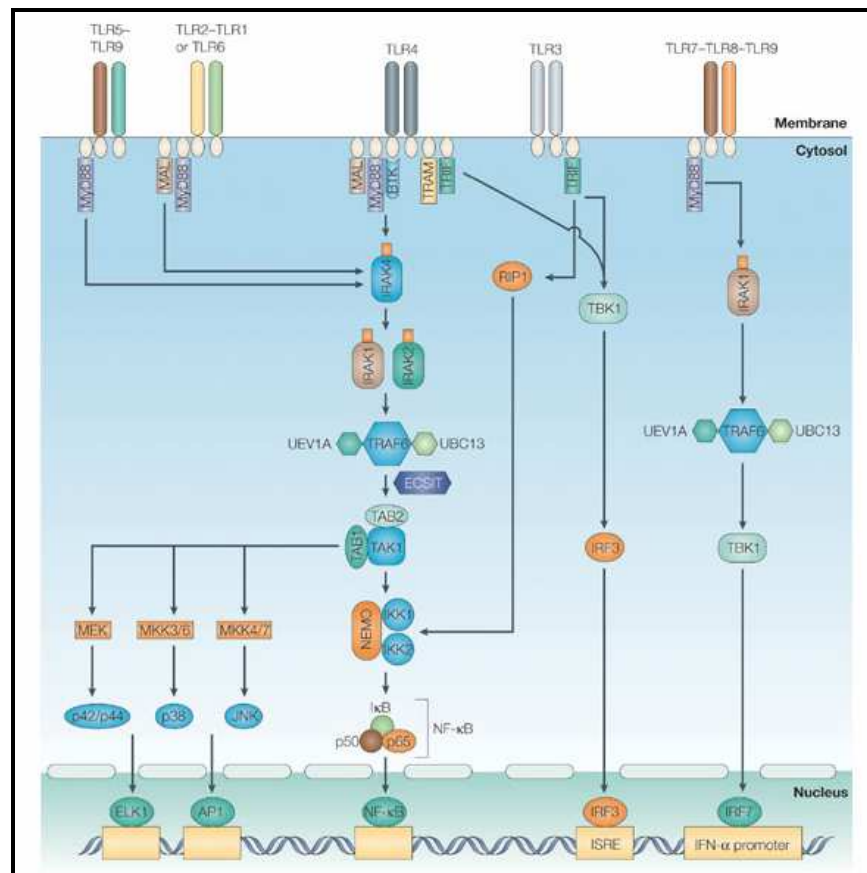


Abb. 6: Signalkaskade der humanen TLRs. Durch Bindung eines Liganden kommt es zur Dimerisierung der TLRs und Aktivierung verschiedener Adaptermoleküle und Kinasen. Daraufhin gelangen Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und induzieren die Expression von proinflammatorischen Zytokinen bzw. Typ I Interferonen (49).

1.3 Infektion und Entzündung der Lunge bei CF

1.3.1 Initiierung von Infektion und Entzündung

Obwohl bei CF mehrere Organe durch die Mutation des CFTR betroffen sind, stirbt die überwiegende Zahl der Patienten an den Folgen von wiederkehrenden und fortschreitenden bronchopulmonalen Infektionen. Andere Organe sind von den bakteriellen Infekten nicht betroffen, allerdings sind z.B. in Darm, Pankreas und Vas deferens bereits während der Schwangerschaft schwere Schädigungen festzustellen. Diese Schädigungen, verbunden mit den sich anschließenden Funktionsstörungen der entsprechenden Organe, werden durch den defekten Chlorid-Transport erklärt (1, 24).

Dagegen ist die Lunge inklusive aller Schleimdrüsen bei Geburt strukturell gesund und normal (52). Doch bereits nach kurzer Zeit können exzessive endobronchiale Entzündungen der kleinen Atemwege bei sowohl bakteriell besiedelten als auch unbesiedelten Patienten nachgewiesen werden (53-56). Hierbei finden sich in bronchoalveolärer Lavage (BAL) vor allem Neutrophile und damit verbunden erhöhte Konzentrationen von IL-8 und neutrophiler Elastase, einer Protease der Immunzellen. Dennoch ist das Atemwegsepithel von CF-Patienten nicht in der Lage, Bakterien effektiv zu bekämpfen und eine Infektion zu beseitigen (57), so dass es zu einer permanenten Besiedlung mit Keimen kommt. Diese andauernde Entzündung der Lunge ist es, die letztendlich zu einer fortschreitenden Zerstörung von Lungengewebe und somit zu einer Abnahme der Lungenfunktion führt. Dies bedeutet Ateminsuffizienz und damit den Tod des Patienten.

Es stellt sich somit die Frage, ob bereits Mutationen des CFTR die bei CF beobachtete Infektion und Entzündung der Lunge begünstigen oder sogar initiieren. Die Theorie der Pathogenese als eine direkte Folge von Mutationen des CFTR-Gens stützt sich auf bereits erwähnte Beobachtungen, in denen Entzündungsparameter auch ohne erkennbare bakterielle Besiedlung der Atemwege nachgewiesen wurden. Ebenso zeigt sich ein Ungleichgewicht in der Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine (58-60). Es ist somit denkbar, dass Mutationen des CFTR-Gens mit Mutationen oder Polymorphismen anderer Gene einhergehen, die für Entzündungsprozesse von Bedeutung sind (9, 61, 62).

Dies würde eine Veranlagung zu Infektion und Entzündung bedeuten. Dem steht jedoch gegenüber, dass es nicht vor der Geburt eines von CF betroffenen Kindes zu krankhaften Veränderungen der Lunge kommt, obwohl andere Organe bereits während der Schwangerschaft betroffen sind. Entsprechend entwickelte sich die Hypothese, dass der defekte CFTR und der Ausfall seiner Funktion für Veränderungen der Zellen sowie der Sekrete und damit für die Pathogenese der Lungenkrankheit verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang regulieren die Zellen der Atemwege, ähnlich der Schweißdrüsen, die Salzkonzentration in der Oberflächenflüssigkeit, also in den Sekreten des Epithels. Aufgrund der defekten CFTR-Funktion kommt es zu deutlich erhöhten Salzkonzentrationen, die wiederum die Funktion einer Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden, wie Defensinen, im Sekret beeinträchtigen (57, 63). Eine Inaktivierung dieser angeborenen Immunmechanismen begünstigt Infektion und bakterielles Wachstum. Gleichzeitig beeinflusst und reguliert das Epithel aufgrund seiner Permeabilität für Wasser das Volumen der Oberflächenflüssigkeit. Der nahezu komplette Verlust der Chlorid-Sekretion sowie die abnormale Absorption von Natrium führen zum Entzug von Wasser und damit zu einer Verringerung des Volumens sowohl der Oberflächen- als auch der periziliären Flüssigkeit (27, 64). Die resultierende erhöhte Viskosität beeinträchtigt die mukoziliäre Reinigung der Atemwege, so dass sich Bakterien in der Schleimschicht festsetzen und eine chronische Infektion verursachen können.

1.3.2 Veränderungen der Atemwegssekrete

Neben den bereits beschriebenen Effekten, die durch den Verlust der CFTR-Funktion sowohl als Chlorid-Kanal als auch als Regulator der Natrium-Kanäle zustande kommen, können die rheologischen und physikalischen Eigenschaften des Mucus und damit dessen Qualität ebenso durch weitere direkte Auswirkungen auf z.B. Sulfatierung, Sialylierung, Glykosylierung und Gehalt von sezernierten Bestandteilen verändert werden (65, 66). Möglicherweise sind auch diese Prozesse an der Prädisposition für eine bakterielle Kolonisation der CF-Lunge beteiligt. Aufgrund der chronischen Infektion kann die spezifische Rolle des CFTR in Bezug auf die physikochemischen Veränderungen der Atemwegssekrete allerdings kaum untersucht werden. Durch Virulenzfaktoren der Bakterien, freigesetzte DNA,

zumeist von Immunzellen, und weitere Entzündungsmediatoren, die in das Lumen gelangen, wird ein Umbau des Epithels induziert. Dies führt zu einer mukösen Hyperplasie insbesondere von Becherzellen, squamösen Metaplasie und gebietsweisen Abschilferung von Epithelzellen. Diese Veränderungen könnten ebenso sekundär die physikochemischen Eigenschaften der Atemwegssekrete und damit ihre Funktion sowie die des Epithels beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurde in den meisten Studien entzündlich veränderter Mucus, also Sputum von CF-Patienten untersucht, wodurch die Interpretation der Daten limitiert ist. Es ist somit weiterhin unklar, ob die physikochemischen Eigenschaften der Atemwegssekrete bereits vor einer beginnenden Infektion verändert sind (67).

1.3.3 Mucus und Mucine

Das Atemwegssekret wird in eine periziliäre Flüssigkeitsschicht, die auch Solphase genannt wird, und in eine darauf liegende Gelphase (Oberflächenflüssigkeit) unterteilt (68). Die stabile periziliäre Flüssigkeitsschicht agiert als eine konstante Quelle für zahlreiche Moleküle, die in den Mucus sezerniert oder daraus absorbiert werden. Die Gelphase stellt sowohl die physikalische als auch chemische Grenze für Pathogene dar und kann durch den Zilienschlag rasch bewegt werden. Allerdings muss der Mucus ein bestimmtes Volumen mit einer entsprechenden Viskosität aufweisen, damit der Transport effektiv ist. Bei sowohl zu niedriger als auch zu hoher Viskosität kann ein Transport durch die darunter liegenden Zilien nur schwer erfolgen. Mucus besteht in erster Linie aus Wasser, und nur zu etwa fünf Prozent aus Ionen, Lipiden und Proteinen, hier vor allem Mucinen. Als größte makromolekulare Bestandteile bestimmen diese maßgebend die rheologischen und physikalischen Eigenschaften des Mucus und damit die Effektivität der mukoziliären Reinigung (69).

Mucine sind komplexe Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von $2-20 \times 10^5$ Da. Bis heute konnten ungefähr 20 verschiedene humane Mucin-Gene identifiziert werden (70). Ein Mucin-Gen kodiert für eine entsprechende mRNA, die in ein Protein Backbone übersetzt wird. Dieses wiederum besteht aus einer großen und variierenden Anzahl von Tandem Repeats (TR), die Mucine von anderen Glykoproteinen unterscheiden und reich an Prolin, Serin sowie Threonin sind. Die TR-Domänen sind einzigartig in ihrer Sequenz und Größe und damit das

bestimmende Charakteristikum jedes einzelnen Mucin-Proteins. Im Golgi-Apparat kommt es im Bereich der TRs zu posttranslationalen Modifikationen durch Glykosyltransferasen (GT), die Oligosaccharide O-glykosidisch mit Serin und Threonin verbinden (Abb. 7). Entsprechend sind Cystein-reiche Abschnitte des Proteins nicht glykosyliert. Anschließend werden sekretorische Mucine in Granuolen gespeichert und auf einen Stimulus hin apikal sezerniert, während membrangebundene Mucine in die Zellmembran integriert werden. Oligomere bis polymere Strukturen entstehen in den Granuolen durch die Verbindung monomerer Untereinheiten über Disulfidbrücken. Durch diesen Zusammenbau, der möglicherweise analog der Synthese des für die Blutgerinnung wichtigen Von-Willebrand-Faktors ist, werden große lineare Komplexe mit entsprechenden Molekulargewichten gebildet. Die erhebliche Vielfalt der Mucine, auch auf funktioneller Ebene, ist somit ein Resultat der Kombination unterschiedlicher Proteinstrukturen, Glykosylierungs- und Polymerisierungsgrade (71).

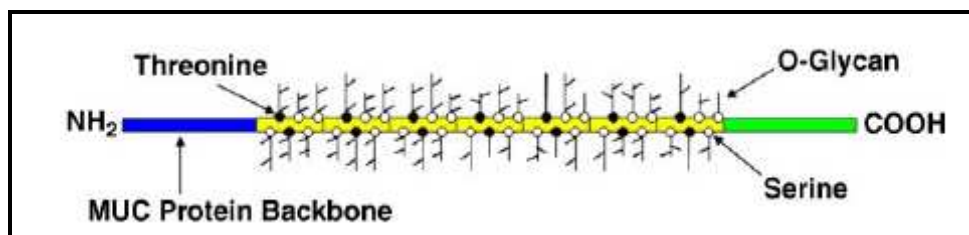


Abb. 7: Schema eines sekretorischen Mucin Glykoproteins. Das Protein Backbone besteht aus dem N-Terminus (blau), der zentralen TR-Domäne (gelb) und dem C-Terminus (grün). O-Glykane sind im Bereich der TR an Threonin- oder Serin-Reste gebunden (71).

Von den in epithelialen Geweben vorkommenden Mucinen werden mindestens 12 Gene in den Atemwegen exprimiert (72, 73). MUC5AC und MUC5B, deren TR-Domänen sich vier- sowie fünfmal wiederholen und durch Cystein-reiche Abschnitte voneinander getrennt sind, werden als gelbildende Mucine sezerniert und konnten überzeugend als Hauptbestandteile der Gelphase der Atemwegssekrete identifiziert werden (74, 75). MUC5AC wird in den Becherzellen des tracheobronchialen Epithels produziert, wohingegen MUC5B überwiegend in den submukösen Drüsen gebildet wird.

1.3.4 Mucine in erkrankten Atemwegen

Chronische Erkrankungen der Atemwege wie Asthma, COPD und CF werden nicht nur mit einer erhöhten Produktion inflammatorischer Mediatoren, sondern auch mit einer Überproduktion von Mucus in Verbindung gebracht. Dieser kann in chronisch entzündeten sowie geschädigten Atemwegen nur schwer transportiert werden und trägt auf diese Weise zur hohen Morbidität und Mortalität der Erkrankungen bei. Da die Regulation der Mucin-Genexpression sowie die Umbauprozesse der Atemwege, vor allem die bereits erwähnte Hyperplasie von Becherzellen, durch Entzündungsmediatoren aktiviert und beeinflusst werden, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass die verstärkte Produktion von Mucus die Folge einer erhöhten Expression und Sekretion von Mucinen ist (73, 76).

Eine verstärkte Sekretion, auch Hypersekretion genannt, erfordert eine erhöhte Synthese von Mucinen, um sekretorische Granuolen wieder aufzufüllen. Dies wiederum bedingt eine Hochregulation der Mucin-Genexpression sowie eine verstärkte Aktivität von GT oder ebenso eine Hochregulation entsprechender GT-Gene. Nach einem Stimulus durch Entzündungsmediatoren erfolgt die Sekretion von Mucinen *in vivo* innerhalb weniger Sekunden bis Minuten (77, 78). Auf der anderen Seite kommt es erst nach einigen Minuten bis Stunden zu Veränderungen der Genexpression (79), während die Biosynthese von Mucinen sogar mehrere Stunden (6-24 h) benötigt (80). Es muss somit davon ausgegangen werden, dass die zur Sekretion führenden Mechanismen zumeist unabhängig von den Signalwegen sind, die Genexpression und Biosynthese der Mucine regulieren (81). Hier sind vor allem Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β) und bakterielle Komponenten (u.a. LPS, LTA) in der Lage, an spezifische Rezeptoren wie TLRs oder EGFR auf der Zellmembran zu binden. Auf direkte oder indirekte Weise werden anschließend MAPK-Signalwege aktiviert, die in der Freisetzung verschiedener Transkriptionsfaktoren und damit in der Hochregulation der Mucin-Transkription resultieren (82-84) (Abb. 8). Nach einer akuten Infektion kehren Produktion und Sekretion von Mucinen innerhalb weniger Tage auf Ausgangswerte zurück, wahrscheinlich aufgrund antiinflammatorischer Mechanismen zur Wiederherstellung der Homöostase. Bei Patienten mit Asthma, COPD oder CF hingegen wird sogar von einer erhöhten Mucin-Produktion in Abwesenheit einer Exazerbation, also einer akuten Verschlechterung des chronischen Krankheitsverlaufs ausgegangen. Dies

wird vor allem durch die beobachtete Hyperplasie der Becherzellen erklärt, so dass bereits die basale Produktion von Mucinen im Vergleich zu Gesunden erhöht ist (85). Dementsprechend scheinen auch MUC5AC und MUC5B im Mucus gesunder Atemwege ein niedrigeres Niveau zu zeigen als im Sputum von Patienten mit CF, COPD oder Asthma (86).

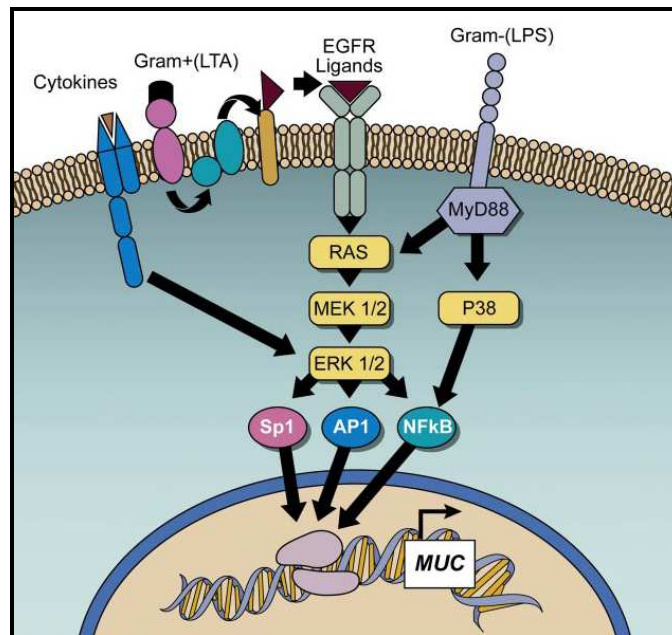


Abb. 8: Regulation der Mucin-Transkription durch Signaltransduktionswege. Zytokine und bakterielle Komponenten binden an Rezeptoren auf der Zellmembran und aktivieren verschiedene MAPK-Wege, die zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren führen (71).

Vergleichende Studien zu Mucinen in Sekreten von gesunden und chronisch erkrankten Atemwegen sind jedoch insofern limitiert, dass Gesunde nur wenig Mucus produzieren und diesen kaum abhusten können. Bei Patienten mit CF, COPD oder Asthma muss weiterhin berücksichtigt werden, dass sich Phasen eines stabilen Krankheitsverlaufs sowie Exazerbationen abwechseln. Hier ist es erforderlich, die unterschiedlichen Phasen im Vorfeld der Studien zu definieren und bei der Probennahme zu dokumentieren. Dabei kommt die von Rosenfeld et al. entwickelte Methode zur Bewertung des Krankheitsverlaufs bei CF zur Anwendung (87). Entgegen der allgemeinen Annahme, dass Mucine auch im Sputum von CF-Patienten deutlich erhöht sein müssen, konnten zwei Studien eine signifikante Reduzierung des Gehalts von MUC5AC und MUC5B im Vergleich zu gesundem Mucus, aber ebenso einen starken Anstieg während einer Exazerbation zeigen (88,

89). *In vitro*-Untersuchungen zur mRNA Expression und Sekretion von Mucinen in gesunden und CF-Zellen, die aus Lungengewebe von Kontroll- und CF-Patienten gewonnen wurden, ergaben entweder widersprüchliche Ergebnisse oder konnten keine eindeutigen Unterschiede feststellen (71). Allerdings sind auch diese Untersuchungen, genau wie Studien an Patienten, in ihrer Aussagekraft limitiert, da geeignete Kontrollen für die aus bereits bakteriell besiedelten und geschädigten Atemwegen gewonnenen Zellen fehlen.

1.3.5 Bakterielle Besiedlung

Die beschriebenen qualitativen Veränderungen der Oberflächensekrete erklären jedoch nicht hinreichend die Besiedlung der Lunge mit spezifischen Mikroorganismen, insbesondere *P. aeruginosa* (2). Neben seiner Funktion als Chlorid-Kanal scheint der CFTR ebenso als Rezeptor für die Erkennung und Aufnahme von *P. aeruginosa* zu fungieren, so dass eine Mutation zu verringerter Bindung und Beseitigung der Pathogene führt (90, 91). Gleichzeitig kommt es aufgrund der Effekte des CFTR auf den intrazellulären pH-Wert zu Veränderungen der Sulfatierung, Sialylierung und Glykosylierung der Zelloberfläche (92, 93). Im Falle der verringerten Sialylierung bei CF stehen vermehrt Asialoganglioside wie asialoGM1 auf der Zelloberfläche für die Adhärenz von Bakterien zur Verfügung und können eine dauerhafte Besiedlung begünstigen (94-96).

All diese Umstände führen bei CF zu frühen Infektionen der Atemwege, vor allem mit *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*. Von größerer Bedeutung ist jedoch die sich anschließende und im weiteren Verlauf chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa*. Insbesondere mukoide Stämme von *P. aeruginosa* können selbst durch intensive Behandlung mit Antibiotika nicht beseitigt werden. Wahrscheinlich verhindert das anaerobe Milieu der zähen Schleimschicht eine ausreichende Durchdringung mit antibiotischen Wirkstoffen und es kommt zur schnellen Entwicklung von sogenannten Mutator-Stämmen, die oftmals eine erhöhte Resistenz aufweisen (2, 97). Eine exzessive und andauernde Entzündung der Atemwege mit einer rapiden Verschlechterung der Lungenfunktion ist die Folge.

1.4 Fragestellung

Als Ursachen des letalen Krankheitsverlaufs bei CF werden in erster Linie indirekte Auswirkungen der defekten CFTR-Funktion diskutiert. Hierbei kommt es in den Atemwegen zunächst zu den beschriebenen Veränderungen der Epithelzellen und ihrer Oberflächenflüssigkeiten, vor allem in Bezug auf die Verfügbarkeit von Molekülen auf der Zelloberfläche sowie Elektrolyt-, Wasser- und Mucin-Gehalt der Sekrete. Dies wiederum begünstigt Infektion und Entzündung, die im weiteren Verlauf zu gravierenden strukturellen Schädigungen der Lunge führen.

Unbeantwortet bleiben jedoch Fragen und Theorien, die sich mit den direkten Auswirkungen der CFTR-Mutationen auf das Entzündungsgeschehen beschäftigen. Entsprechende Untersuchungen sowohl an Patienten als auch im Zellkulturmodell liefern zumeist widersprüchliche oder nicht aussagekräftige Ergebnisse zur Expression von Komponenten der angeborenen Immunabwehr wie TLRs (41, 42, 98) und proinflammatorische Zytokine (45, 99-103), insbesondere aufgrund des Fehlens geeigneter Kontrollen, die nicht bereits entzündungsbedingt veränderte Parameter zeigen. Somit ist weiterhin unklar, ob Immunreaktionen bei CF beeinträchtigt oder bereits von Geburt an übermäßig stark aktiviert sind. Vor allem die Beobachtung, dass trotz einer frühen, von Neutrophilen dominierten Entzündung der Lunge mit erhöhten Konzentrationen von IL-8 und neutrophiler Elastase (53-56) Bakterien nicht effektiv beseitigt werden können, ist von besonderer Bedeutung. Gleiches gilt für die möglicherweise veränderte Mucin-Produktion bei CF und ihre Bedeutung für den Krankheitsverlauf (71). Allerdings zeigen die bereits erwähnten und recht aktuellen Studien zum Mucin-Gehalt im Sputum von CF-Patienten deutliche und reproduzierbare Unterschiede im Vergleich zu Gesunden (88, 89), widersprechen jedoch der mehrheitlich geltenden Annahme einer Mucin-Erhöhung bei CF.

Aus all diesen Gründen widmet sich ein Großteil der Forschung auf dem Gebiet von CF weiterhin der Hypothese einer intrinsisch dysregulierten Immunantwort in Zusammenhang mit Mutationen des CFTR. Gerade die Generierung immortalisierter CF- und geeigneter Kontroll-Zelllinien mit stabiler Expression des Wildtyp-CFTR ermöglicht hierbei umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand der bronchialen CF-Epithel-Zelllinie CFBE41o- sowie der entsprechenden CFTR-korrigierten Kontroll-Zelllinie untersucht werden,

- ob und inwiefern es zu CFTR-abhängigen Veränderungen von Komponenten und Mechanismen der angeborenen Immunantwort, insbesondere des TLR-Signalwegs, bei CF kommt, und
- ob und inwiefern diese CFTR-abhängigen Veränderungen einen Einfluss auf die Aktivierung weiterer Signalwege und damit auf die mRNA-Expression von Mucinen ausüben.

Zur Unterstützung der *in vitro*-Daten werden Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen in die Untersuchungen mit einbezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Die folgenden humanen Bronchialepithel-Zelllinien wurden freundlicherweise von Professor Dieter C. Gruenert (California Pacific Medical Center Research Institute, University of California, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Normale und CF-Zelllinien

16HBE14o-	Human bronchial epithelial cells (104)
CFBE41o-	CF bronchial epithelial cells (Δ F508/ Δ F508) (105)

CFTR-korrigierte CF-Zelllinie

corrCFBE41o-	wild-type CFTR plasmid transfectant
--------------	-------------------------------------

Kontrolle

dfCFBE41o-	control plasmid (Δ F508) transfectant
------------	---

Die Immortalisierung der *post mortem* aus humanen Lungen gewonnenen normalen und CF-Zelllinien erfolgte mittels Transformation durch das Plasmid origin-of-replication defective simian virus 40 (pSVori-) (106). Die CFBE-Zellen sind homozygot für die Δ F508-Mutation (105). Für die Generierung der Wildtyp-CFTR komplementierten Zellen wurde ein episomales Expressionssystem auf Grundlage des Epstein-Barr-Virus verwendet. Die mittels Elektroporation eingebrachten Vektoren enthielten entweder Wildtyp- oder Δ F508-CFTR cDNA. Durch eine gleichzeitig vermittelte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B wurden komplementierte Zellen selektiert und nach Isolierung einzelner Klone vermehrt. PCR und RT-PCR bestätigten eine transgene Expression des CFTR in korrigierten Zellen und elektrophysiologische Untersuchungen zeigten einen wiederhergestellten cAMP-abhängigen Chlorid-Transport (98).

2.2 Zellkultur

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Zellinkubator	Heraeus
Sterilbank	Heraeus
Wasserbad	GFL
Auflichtmikroskop	Hund
Neubauer Zählkammer	Hausser Scientific
Laborzentrifuge	Heraeus
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Akku-Pipette	Eppendorf
Pasteur-Pipetten	Hirschmann
Ohmmeter	World Precision Instruments
Gewebekulturflaschen (Größe 75 cm ²)	Sarstedt
Gewebekulturschalen (6- und 12-Well)	Greiner Bio-One
Membraneinsätze, Polyester, Porengröße 0.4 µm	Corning Life Sciences
Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, mit L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Gibco
Trypsin (0.05%)/EDTA (0.53 mM)	Gibco
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA
Hygromycin B	Invitrogen
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) mit Zusätzen und Wachstumsfaktoren	Lonza/Cambrex
Phosphat gepufferte Saline (PBS, pH 7.4)	Gibco

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Inkubator unter 5% CO₂-Atmosphäre bei 37 °C. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Als Standard-Medium diente MEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Wildtyp-CFTR und Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen wurden 200 µg/ml Hygromycin B ins Medium zugesetzt. Für die Subkultivierung auf Gewebekulturflaschen wurden die Zellen einmal pro Woche mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit einer Gesamtzahl von 1x10⁶ neu ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop.

Für Experimente wurden Zellen in Gewebekulturschalen verschiedener Well-Größen entweder direkt auf Plastik oder auf permeablen Membraneinsätzen kultiviert. In beiden Fällen diente BEGM mit den Zusätzen und Wachstumsfaktoren BPE, Hydrocortison, hEGF, Epinephrin, Insulin, Triiodothyronine, Transferrin, Gentamicin/Amphotericin-B sowie Retinsäure als Differenzierungsmedium. Die Verwendung von Membraneinsätzen ermöglicht ein Wachstum unter luftexponierten, sogenannten air-liquid interface (ALI)-Bedingungen und führt auf

diese Weise zur Polarisierung und Differenzierung der Zellen (107-109). Zur Ausbildung von Zilien kommt es meist nur in primären, nicht-immortalisierten Kulturen von Atemwegszellen. Charakteristisch für die verwendeten Zelllinien ist in diesem Zusammenhang jedoch das Verschließen der Zellzwischenräume durch die Ausbildung schmaler Bänder von Membranproteinen, sogenannten tight junctions, so dass eine parazelluläre Barriere entsteht. Mittels eines Ohmmeters kann ein transepithelialer elektrischer Widerstand gemessen werden, der als Maß für die Differenzierung dient und bei HBE Werte zwischen 200-1.000 $\Omega \times \text{cm}^2$ erreicht, während diese für CFBE bei 100-500 $\Omega \times \text{cm}^2$ liegen (106).

Für die Kultivierung unter ALI-Bedingungen wurden die Zellen sowohl von oben (apikal) als auch von unten (basal) mit Medium versorgt, bis die Membran konfluent bewachsen war. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium apikal entfernt und nur noch basal erneuert (s. Abb. 9). Nach ca. 14 Tagen Wachstum ergaben sich bei den Zelllinien Werte im Mittelfeld des erreichbaren transepithelialen Widerstands, so dass die Kulturen für Experimente verwendet werden konnten.

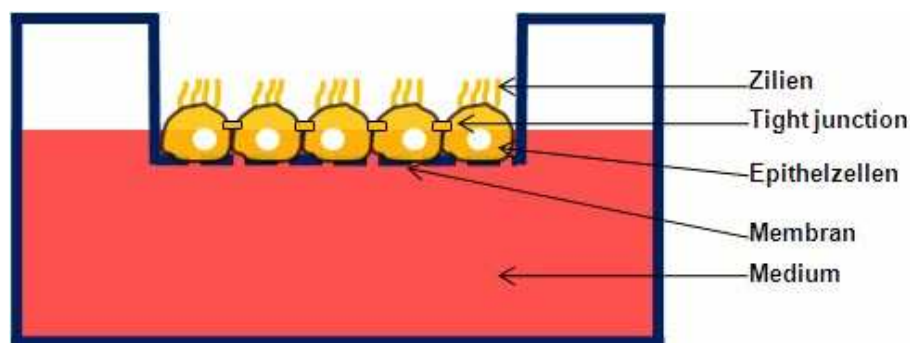


Abb. 9: Schema der Kultivierung von Atemwegsepithelzellen unter air-liquid interface (ALI)-Bedingungen.

2.3 Bakterienkultur

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Inkubator für Bakterienkultur	Infors
Photometer	Amersham Pharmacia Biotech
Mikro-Küvetten	Brand
Heizblock	Roth
LB-Pulvermedium nach Lennox	AppliChem
Caso Bouillon	Roth
Hefeextrakt	Roth
Blut-Agarplatten	Merck

Die für die Stimulation der ALI-Kulturen eingesetzten Bakterien *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, nicht-mukoider Stamm ATCC 27853, und *Staphylococcus (S.) aureus*, Stamm ATCC 29213, wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Marburg zur Verfügung gestellt und folgendermaßen kultiviert: *P. aeruginosa* in LB-Medium und *S. aureus* in Caso-Hefeextrakt-Medium wurden unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C über Nacht angezogen. Nach photometrischer Bestimmung der OD₆₀₀ und dreimaligem Waschen in PBS wurde die Keimzahl der Kulturen auf 1x10⁸/ml eingestellt. Die Inaktivierung durch Hitze erfolgte für *P. aeruginosa* bei 65 °C sowie für *S. aureus* bei 70 °C für jeweils 1 h. Eine erfolgreiche Inaktivierung wurde durch Ausplattieren auf Blut-Agarplatten und Bebrüten bei 37 °C über Nacht bestätigt.

2.4 Stimulation der Zellen

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
TNF- α	R&D Systems
Polyinosine-polycytidylic acid (Poly(I:C))	InvivoGen
Polymyxin B (PMX)	Sigma-Aldrich
Monoclonal antibody to TLR-4 (clone HTA125)	Alexis

Zur Stimulation wurden lebender und hitzeinaktivierter *P. aeruginosa* und *S. aureus* sowie die bakteriellen Komponenten LPS und LTA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Hoch gereinigtes LPS aus *Salmonella enterica* sv. Arizona wurde freundlicherweise von der Abteilung Klinische Chemie des Universitätsklinikums Marburg aufgrund einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Strukturbiochemie von Professor Otto Holst am Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt. Hoch gereinigtes LTA aus *S. aureus* (110) wurde ebenso von

der Abteilung Klinische Chemie bereitgestellt. Die Stimulation der Zellen erfolgte apikal für 1 h bei 37 °C. Auf die gleiche Weise wurden die Negativkontrollen mit PBS, Positivkontrollen mit TNF- α oder Polyinosine-polycytidylic acid, kurz Poly(I:C), behandelt. Nach der Stimulation wurden die Kulturen dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in frischem Medium inkubiert. Anschließend wurden die basalen Medien für die Bestimmung der Zytokin-Sekretion abgenommen und die Zellen für Western Blot, mRNA-Untersuchungen oder Oberflächenfärbungen mittels Immunfluoreszenz und FACS verwendet.

Für Experimente zur Inhibition LPS-stimulierter Effekte wurden Polymyxin B (PMX) sowie ein monoklonaler Antikörper gegen TLR-4 eingesetzt. Hierbei wurde PMX gleichzeitig mit LPS zu den Kulturen gegeben, während im Falle des Antikörpers vor der Stimulation eine Vorinkubation für 1 h mit anschließendem dreimaligen Waschen in PBS erfolgte.

2.5 RNA-Isolierung und real-time RT-PCR

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Rneasy Mini Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße, 1.5 ml	Biozym
Dnase I	Invitrogen
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
PCR-Tubes, 0.6 ml	Stratagene
Temperaturcycler	Stratagene
Icycler	Bio-Rad
ABsolute QPCR SYBR Green Mix	ABgene
PCR-Primer	Biomers
96-well PCR-Platten & Folien	ABgene
HotStarTaq Master Mix	Qiagen
Agarose	Roth
DNA-Leiter, 100 bp	Peqlab
Ladepuffer, 6x	Peqlab
Tris-Borat-EDTA Puffer	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml)	Roth
Mikrowelle	Privileg
Gelkammer	Owl Scientific
Power Supply	Bio-Rad
Gel-Dokumentation	Bio-Rad
Gene Runner	Hastings Software

Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurden Zellen in RLT-Puffer lysiert. Die Isolierung der RNA erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers. Nach einem Verdau genomischer DNA durch DNase I wurde aus 1.5 µg RNA unter Verwendung des First Strand cDNA Synthesis Kits mit reverser Transkriptase, dNTPs und Oligo(dT)₁₈-Primern cDNA generiert. Für quantitative real-time PCR wurden 5 µl der 1:10 verdünnten cDNA mit einem SYBR Green Master Mix und spezifischen Primern in einem Reaktionsvolumen von 25 µl auf 96-well PCR-Platten eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte im iCycler unter Verwendung des folgenden Protokolls: Aktivierung der Polymerase für 15 min bei 95 °C; 40 Zyklen mit 30 s bei 95 °C (Denaturierung) , 30 s bei Primer-spezifischer Temperatur (Annealing) und 40 s bei 72 °C (Extension); Final Extension für 2 min bei 72 °C; 1 min bei 95 °C und 1 min bei 55 °C; Schmelzkurve von 55 bis 95 °C mit Erhöhung der Temperatur um 0.5 °C pro 10 s.

Hierbei diente die sich anschließende Schmelzkurve der qualitativen Überprüfung der erwarteten PCR-Produkte, da unspezifische und kleinere Fragmente zu zusätzlichen und früher auftretenden Peaks führen. Die Amplifikate wurden ebenso durch Gelelektrophorese in 1.5% Agarose/TBE für 1 h bei 100 V aufgetrennt und nach Färbung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Die Primer wurden anhand entsprechender mRNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank mithilfe des Programms Gene Runner generiert und von der Firma Biomers synthetisiert (Tab. 2). Die als C_T-Werte angegebenen Ergebnisse der real-time PCR wurden mit der ΔC_T-Methode in eine relative Expression bezogen auf das Housekeeping-Gen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) umgerechnet.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten PCR-Primer und ihrer Annealingtemperatur (AT).

Gen	Sense-Primer	Antisense-Primer	AT [°C]
TLR-2	GAGAGTGGGAAATATGGACACCTT	GCAGTTCCAAACATTCCACG	60
TLR-4	ACCTGGAGTGGGAGGACAGT	AGATAGATGTTGCTTCCTGCCAA	60
MyD88	TGAGCGTTTCGATGCC	GTTGGTGTAGTCGCAG	55
CD14	CTGCAACTTCTCCGAACCTC	CCAGTAGCTGAGCAGGAACC	60
MD-2	CAACAATATCATTCTCCTTCAAGGG	GCATTTCTTCTGGGCTCCC	60
MUC5AC	TTGACCGGTGCCACATGACG	TCCGGCCTCTCCAATCGATG	70
MUC5B	GCTGAGGGTGGAGTCCATTTGC	ACAGGATGGTCGTGTTGATGCG	50
GAPDH	CGTCTTCACCACCATGGAGA	CGGCCATCACGCCACAGTTT	62

2.6 Western Blot

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Tischzentrifuge	Heraeus
Reaktionsgefäße, 1.5 ml	Biozym
Schüttler	Heidolph
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Immuno Plate, 96-Well	Nunc
Tecan Reader	Tecan
Magellan Software	Tecan
Gelkammer	Bio-Rad
Polyacrylamid-Gele, 4-15%	Bio-Rad
Tris-Glycin-Puffer, pH 8.3	Medicago
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10% (w/v)	Bio-Rad
Probenpuffer, 4x	Roth
Protein-Standard	Bio-Rad
Power Supply	Bio-Rad
Transferkammer	Bio-Rad
Nitrocellulose Transfer Membran, Porengröße 0.2 µm	Whatman
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Methanol, p.a.	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Merck
Monoclonal Antibody to CFTR	R&D Systems
Monoclonal Tag-100 Antibody to MAPK1	Qiagen
Polyclonal Antibody to phospho-MEK1/MEK2	Upstate
Polyclonal Antibody to phospho-JNK	Upstate
Polyclonal Antibody to phospho-p38	Sigma
Polyclonal Antibody to total-MEK	Sigma
Polyclonal Antibody to total-JNK	Upstate
Polyclonal Antibody to total-p38	Sigma
Monoclonal Antibody to β-Actin	Abcam
Sekundäntikörper, HRP-konjugiert, anti-mouse & anti-rabbit	Pierce
Sekundäntikörper, HRP-konjugiert, anti-goat	Acris
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Natronlauge, NaOH, 2 mol/l (2 N)	Merck
Sekundäntikörper, biotinyliert, anti-mouse	Vector Laboratories
Streptavidin-HRP	BD Biosciences
Röntgenfilm	Pierce
Entwicklermaschine	MS Laborgeräte

Für den Proteinnachweis von CFTR und verschiedenen MAP-Kinasen mittels Western Blot wurden die Zellen in PBS vom Untergrund abgeschabt und durch schonende Zentrifugation bei 2.000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in Radioimmunoprecipitation (RIPA)-Puffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) NP-40, 0.5% (v/v) Na-deoxycholat, 10 mM Phosphatase-

Inhibitor NaF und Protease Inhibitor Cocktail, für 1 h auf Eis lysiert und anschließend für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Gesamtproteingehalt der Überstände wurde mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA) bestimmt. Hierfür werden die Proben im Vergleich zu einem Albumin-Standard auf 96-Well Platten aufgetragen und eine Farbreaktion erfolgt aufgrund der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ in Anwesenheit von Bicinchoninsäure. Die entsprechende Absorption bei 562 nm wird im Tecan Plattenreader unter Verwendung der Magellan-Software gemessen. Nach Angleichen der Proteinkonzentration wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden durch Elektrophorese für 2-3 h bei 100 V in 4-15% Polyacrylamid-Gelen und Tris-Glycin-Puffer/1% SDS aufgetrennt und anschließend für 3 h bei 300 mA in Tris-Glycin-Puffer/20% Methanol auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Membranen in 10% Milchpulver in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Bindung des jeweiligen Primärantikörpers mit entsprechender Verdünnung (genaue Angaben bei Ergebnissen) in 1% Milchpulver in PBS erfolgte unter Schütteln bei 4 °C über Nacht. Nach gründlichem Waschen wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in Peroxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper (1:1000) inkubiert und mit Chemilumineszenz-Substrat behandelt. Immunreaktive Banden konnten anschließend auf Röntgenfilm visualisiert werden.

Für CFTR erfolgte eine Signalverstärkung durch Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und einer an Streptavidin gekoppelten Peroxidase. Für den Nachweis der MAP-Kinasen wurden die Membranen zunächst mit den entsprechenden anti-phospho Antikörpern gegen das phosphorylierte Protein wie oben beschrieben behandelt und entwickelt. Als Referenz wurden dieselben Membranen nach kurzer Behandlung in 0.5 M NaOH mit Antikörpern gegen das totale Protein der jeweiligen Kinase inkubiert und erneut entwickelt. Ebenso wurde bei allen Western Blots ein β -Actin-Antikörper als Ladekontrolle verwendet.

2.7 FACS-Analyse

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, 0.5 M)	Sigma-Aldrich
CASY Cell Counter	Schärfe System
Laborzentrifuge	Thermo Scientific
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Isotype Control Mouse IgG1-FITC/Mouse IgG2a-PE	BD Biosciences
CD326 (EpcAM)-PE	Miltenyi Biotec
Monoclonal Antibody to TLR-2 (TL2.1)-FITC	Alexis
Monoclonal Antibody to TLR-4 (HTA125)-FITC	Alexis
FACScalibur Durchflusszytometer	BD
FACSFlow	BD
CellQuest Pro, Version 5.2.1	BD

Die Expression von TLR-2 und TLR-4 auf der Zelloberfläche konnte mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurden die Zellen schonend durch Inkubation mit 6% EDTA in PBS für 10 min bei 37 °C abgelöst. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10% FCS in PBS für 30 min bei 4 °C wurde die Zellzahl mithilfe des CASY Cell Counters bestimmt und auf 1×10^5 Zellen pro 100 μ l in 5% FCS in PBS eingestellt. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung der Zellen mit folgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern im Dunkeln für jeweils 30 min bei 4 °C:

- Isotyp-Kontrolle Mouse IgG1-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)/Mouse IgG2a-Phycoerythrin (PE);
- Epithelzellmarker α CD326-PE und α TLR-2-FITC oder α TLR-4-FITC.

Die Messung von 10.000 Fluoreszenzereignissen wurde mit dem FACScalibur Durchflusszytometer der Abteilung Klinische Chemie des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt. Die Parameter Vorwärts- (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC) geben hierbei Auskunft über Größe und Granularität der Zellen, so dass bei der Auswertung mit der Software CellQuest Pro eine bezüglich dieser Eigenschaften homogene Zellpopulation ausgewählt werden konnte. Auf diese Weise wurden sowohl nekrotische als auch stark aggregierte Zellen von weiteren Berechnungen ausgenommen.

2.8 Immunfluoreszenz

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Deckgläschen, Ø 18 mm	LLG
Objekträger	Menzel
CellTracker Orange Fluorescent Probe	Cambrex
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich
Monoclonal Antibody to TLR-4 (HTA125)-FITC	Alexis
Isotype Control Mouse IgG2-FITC	BD Biosciences
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories
Antifade (Eindeckmittel)	AppliChem
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Cell ^F Imaging Software	Olympus

Für die Untersuchung der Oberflächenexpression von TLR-4 mittels Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Deckgläschen in 12-Well Gewebekulturschalen mit einer Dichte von 1×10^5 je Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium von MEM zu BEGM gewechselt und die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% wachsen gelassen. Die Färbung des Zytoplasmas erfolgte durch Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ CellTracker Orange für 30 min unter den normalen Wachstumsbedingungen. Nach Waschen und erneuter Inkubation in frischem Medium wurden die Zellen für 15 min mit 3.7% Paraformaldehyd in PBS fixiert und unspezifische Bindungen für 30 min mit 5% BSA in PBS blockiert. Der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte α TLR-4 Antikörper wurde in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln zu den Zellen gegeben. Als Isotyp-Kontrolle diente ein FITC-konjugierter Mouse IgG2-Antikörper. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Deckgläschen mit Antifade auf Objektträgern fixiert. Sobald diese getrocknet waren, konnten die Präparate im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung der Cell^F Imaging Software ausgewertet werden.

Für eine weitere Färbung wurde das Protokoll dahingehend modifiziert, dass anstelle der Verwendung des CellTrackers die Zellen nach Fixierung in Paraformaldehyd für 20 min mit 0.1% Tween in PBS permeabilisiert wurden. Im Anschluss an die Antikörper-Bindung über Nacht wurde die DNA im Zellkern mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, $1.5 \mu\text{g/ml}$) angefärbt.

2.9 NF- κ B-Reporterplasmid

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
Leervektor pcDNA3.1	Invitrogen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
Opaque Plate, 96-Well	Corning Life Sciences
Tecan Reader	Tecan
Magellan Software	Tecan

Für die Messung der NF- κ B-Aktivierung wurden Zellen in 6-Well Gewebekulturschalen mit einer Dichte von 2×10^5 je Well ausgesät und am folgenden Tag mit jeweils 1 μ g DNA verschiedener Plasmide transfiziert. Das 5xNF- κ B-Reporterplasmid exprimiert eine Firefly-Luciferase, die unter der Kontrolle eines Promotors mit fünf Bindungsstellen für NF- κ B steht. Δ MyD88 und Mal P/H sind dominant-negative Versionen der entsprechenden Adaptermoleküle in der TLR-Kaskade (41). Dabei fehlt Δ MyD88 die für die Signaltransduktion erforderliche sogenannte death domain, während Mal P/H aufgrund einer Punktmutation in der TIR-Domäne an Position 125 der Aminosäuresequenz Histidin anstelle von Prolin aufweist. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde das β -Actin Renilla-Reporterplasmid verwendet, dessen Renilla-Luciferase einen β -Actin Promotor enthält. Alle Plasmide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Robert Bals (Pneumologie, Universitätsklinikum Marburg) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor pcDNA3.1. Das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu Plasmid-DNA betrug 3:1 bei Einzel- und 3:2 bei Co-Transfektionen. Nach 72 h wurden die Transfektionskomplexe durch gründliches Waschen in PBS entfernt und die Zellen wurden entsprechend stimuliert und weiter inkubiert. Anschließend erfolgten die Bereitung der Zelllysate und die Lumineszenz-Messung im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System nach Anleitung des Herstellers und unter Verwendung des Tecan Platten-Readers.

2.10 Transfektion von siRNA

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
TLR-4 siRNA (Hs_TLR4_1, Hs_TLR4_7)	Qiagen
MAPK1 Control siRNA	Qiagen
Negative Control siRNA, Alexa Fluor 488 Labeled	Qiagen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen

Knockdown und Silencing spezifischer Zielgene kann im Zellkulturmodell durch die Verwendung von small interfering (si)RNA erreicht werden (111). Hierfür wurden Zellen in 6-Well Gewebekulturschalen mit einer Dichte von 2×10^5 je Well ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit jeweils 5 nM der spezifischen TLR-4 (Hs_TLR4_1, Hs_TLR4_7), MAPK1 Control und Negative Control siRNA für 48 h unter den beschriebenen Kulturbedingungen. Nach der Inkubation wurden die Transfektionskomplexe durch Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend stimuliert, in frischem Kulturmedium weiter inkubiert und die Medien für die Bestimmung der Zytokin-Sekretion mittels ELISA abgenommen. Die Transfektionseffizienz wurde mithilfe von Alexa Fluor 488 konjugierter Negative Control siRNA im FACS bestimmt, während der Western Blot für MAPK1 als Positivkontrolle durchgeführt wurde. Untersuchungen zur mRNA-Expression mittels real-time RT-PCR dienten der qualitativen Überprüfung des Knockdowns der spezifischen Gene.

2.11 ELISA

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
OptEIA Sets für humanes IL-8, IL-6 & IP-10	BD Biosciences
Immuno Plate, 96-Well	Nunc
Immunowasher	Nunc
PBS-Pulver	Biochrom AG
Tween 20	Roth
Natriumcarbonat, pH 9.5	Roth
BM Blue POD Substrat	Roche
Schwefelsäure 1 mol/l, 2 N Lösung	Roth
Tecan Reader	Tecan
Magellan Software	Tecan

Die Konzentrationen der Zytokine IL-8, IL-6 und IP-10 im Zellkulturmedium wurden mithilfe kommerzieller Kits für den enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt. Hierbei wird eine 96-Well Platte mit Primärantikörper in

Natriumcarbonatpuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach mehrmaligem Waschen mit 0.05% Tween in PBS und Blockierung unspezifischer Bindungen für mit 10% FCS in PBS für 1 h werden Proben und Standard in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Auf weitere Waschschritte folgt die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers sowie der Streptavidin-konjugierten Peroxidase für 1 h. Die sich anschließende Zugabe des Substrats bewirkt einen Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur Menge an gebundenen Zytokinen ist. Durch Messung der Absorption bei 450 nm im Tecan Platten-Reader werden unter Verwendung der Magellan-Software aus einer Standardkurve die Konzentrationen berechnet. Eine Normalisierung der Ergebnisse erfolgte anhand der im BCA bestimmten Protein-Konzentration der lysierten Zellen.

2.12 Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen

Zur Unterstützung der *in vitro*-Daten wurden Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen in die Untersuchungen mit einbezogen. Diese wurden durch eine Kooperation mit der Inneren Medizin, Pneumologie und dem Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Gießen zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um in Paraffin eingebettetes Gewebe von zwei CF- und drei gesunden Lungen (Tab. 3). Für immunhistochemische Färbungen wurden, je nach Anzahl der Paraffin-Blöcke pro Lunge, aus unterschiedlichen Bereichen 3 µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Gewebeschnitte humaner Lungen.

Typ	Geschlecht	Alter bei Entnahme	Serienschnitte
CF	m	25	4
CF	w	11	2
Donor	m	22	1
Donor	w	36	1
Donor	w	45	1

2.13 Immunhistochemie

Geräte/Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Xylol	Merck
Ethanol, p.a.	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	Merck
Sodiumazid	Sigma-Aldrich
Normal Goat Serum	Vector Laboratories
Polyclonal Antibody to TLR-4	Alexis
Sekundärantikörper, biotinyliert, anti-goat	Vector Laboratories
Streptavidin-HRP	Vector Laboratories
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich
Hämalaun nach Mayer	Merck
Entellan (Eindeckmittel)	Merck
Deckgläschen, 24x60 mm	Menzel
Lichtmikroskop	Olympus
CellF Imaging Software	Olympus

Die Expression von TLR-4 in Gewebeschnitten humaner Lungen wurde immunhistochemisch bestimmt. Hierzu wurden die Präparate für 10 min durch Behandlung in Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe (abs., 96%, 70%, je 5 min) gewässert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 30 min mit 3% H₂O₂/1% Sodiumazid in PBS behandelt und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 1 h in 10% Normalserum in PBS inkubiert. Die Bindung des 1:150 verdünnten Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Es schloss sich die Inkubation in biotinyliertem, 1:100 verdünnten Sekundärantikörper und Streptavidin-Peroxidase-Komplex an. Als Substrat für die Peroxidase diente DAB, das zu einem braunen Präzipitat umgesetzt wird. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, erneut mit Xylol behandelt und in Entellan eingedeckelt. Die Aufnahmen der Schnitte erfolgten im Lichtmikroskop unter Verwendung der Cell^F Imaging Software.

2.14 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistische Verfahren zum Vergleich zwischen Gruppen wurden der zweiseitige t-Test für ungepaarte Stichproben oder ANOVA bei Experimenten mit mehr als zwei Untergruppen angewendet. Post-hoc Tests wurden mittels Bonferroni-Anpassung durchgeführt. Ergebnisse mit * $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Alle Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism 4 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Nachweis des murenen CFTR-Proteins.

Für *in vitro*-Untersuchungen zu CF ist es unerlässlich, geeignete Kontroll-Zelllinien mit stabiler Expression des Wildtyp-CFTR zu nutzen. Nach Generierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CFTR-korrigierten Zelllinien konnte bereits eine transgene Expression des CFTR sowie ein wiederhergestellter cAMP-abhängiger Chlorid-Transport gezeigt werden (98). Zusätzlich sollte überprüft werden, ob das CFTR-Protein in seiner murenen Form in den entsprechenden Zellen nachweisbar ist. Hierfür wurden Lysate aller Zelllinien mittels Western Blot auf die Produktion des CFTR hin untersucht. Aufgrund des generell niedrigen Expressionsniveaus in Geweben und Epithelzell-Kulturen (112, 113) erfolgte eine Signalverstärkung durch Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 10.

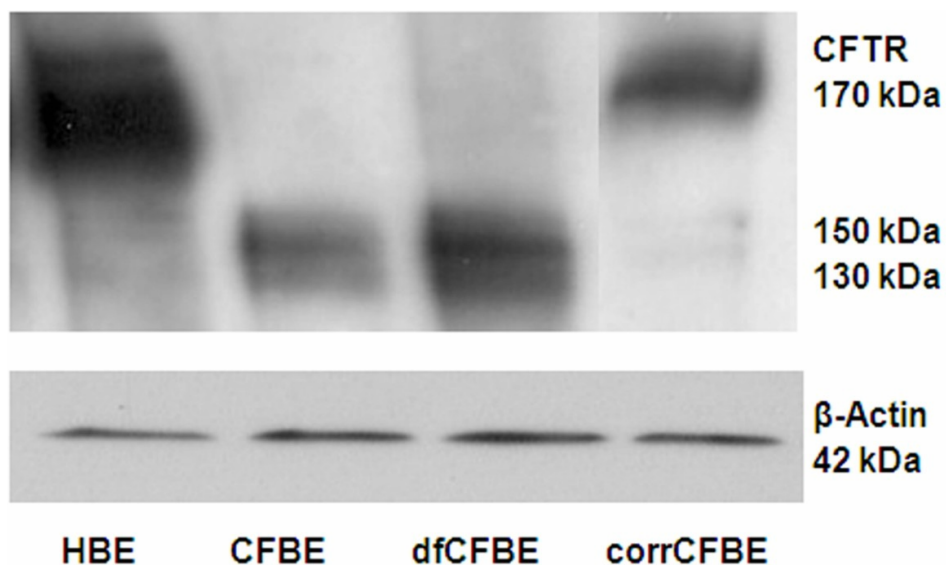


Abb. 10: Western Blot für CFTR. In allen Zelllinien konnten unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen CFTR in einer Verdünnung von 1:500 nicht murene Formen des Proteins (130 und 150 kDa) nachgewiesen werden, während die vollständig glykosylierte, murene Form (170 kDa) nur in HBE und CFTR-korrigierten Zellen zu finden war. Als Ladekontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen β -Actin in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Es wurden drei Versuche mit gleichem Ausgang durchgeführt.

Hierbei entspricht die Bande bei 130 kDa dem neu synthetisierten, nicht glykosylierten Polypeptid, während bei 150 kDa die bereits am ER stellenweise glykosylierte, aber nicht mature Form des Proteins zu finden ist. Diese beiden Banden waren in allen Zelllinien in unterschiedlichen Mengen nachweisbar. Das vollständig glykosylierte und mature Protein hingegen weist eine Größe von ungefähr 170 kDa auf und war ausschließlich in HBE deutlich sowie in CFTR-korrigierten Zellen schwächer detektierbar.

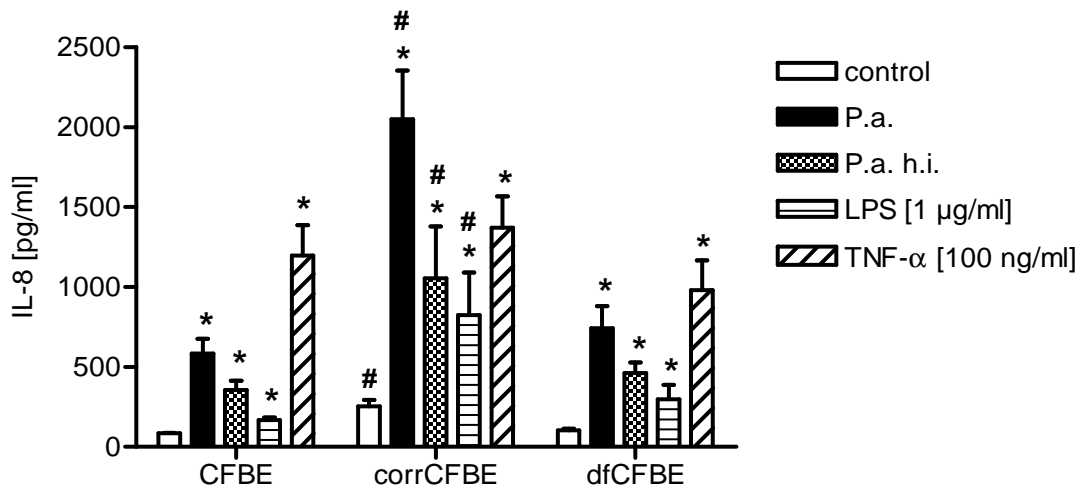
3.2 Der TLR-4-Signalweg ist bei CF-Bronchialepithelzellen verändert.

3.2.1 Die Sekretion von IL-8 ist bei korrigierten CF-Zellen erhöht.

Epithelzellen sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen und anderen Substanzen in das Lumen der Atemwege sowie in das unter dem Epithel liegende Gewebe. Von besonderer Bedeutung ist IL-8, das als chemotaktisches Zytokin die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das entzündete Gewebe vermittelt (39). Zu Beginn der Untersuchungen sollte geklärt werden, inwiefern das Epithel auf verschiedene Bakterien und bakterielle Komponenten reagiert. Hierzu wurden die Zellen mit lebenden und hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* und *S. aureus* sowie mit hoch gereinigtem LPS und LTA stimuliert. Die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Zellkulturmedium erfolgte mittels ELISA (Abb. 11).

Es zeigte sich, dass bereits die basale Sekretion von IL-8 bei korrigierten CF-Zellen zweifach erhöht war. Nach Stimulation mit dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* und dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS kam es in allen Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Sekretion (Abb. 11 A). Ebenso wie im unstimulierten Zustand lagen die Werte bei corrCFBE deutlich über den für CFBE und dfCFBE gemessenen Konzentrationen und waren im Vergleich zu den CF-Zellen zwei- bis dreifach erhöht. Die Stimulation mit *S. aureus*, als Vertreter der Gram-positiven Bakterien, führte zwar allgemein zu einem Anstieg der IL-8-Sekretion, allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zelllinien (Abb. 11 B). Der Zellwandbestandteil LTA hingegen löste in keinem Fall eine erhöhte Sekretion von IL-8 aus. TNF- α [100 ng/ml] diente bei beiden Versuchen als Positivkontrolle (45) und bewirkte in allen Zellen einen signifikanten und vergleichbaren Anstieg der IL-8-Konzentration.

A



B

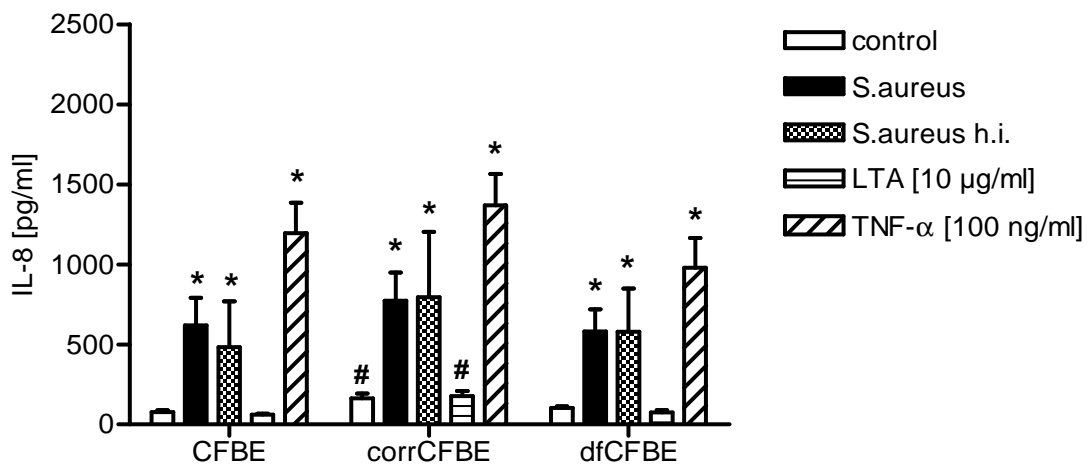


Abb. 11: Sekretion von IL-8 ins Zellkulturmedium nach Stimulation mit Bakterien und bakteriellen Komponenten. Die Zellen wurden apikal für 1 h mit $[1 \times 10^8/\text{ml}]$ lebenden und hitzeinaktivierten (h.i.) *P. aeruginosa* und *S. aureus* sowie LPS und LTA stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Als Positivkontrolle diente TNF- α . Die IL-8-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. * = signifikanter Unterschied zur jeweils unbehandelten Kontrolle, # = signifikanter Unterschied zu CFBE und dfCFBE mit $P < 0.05$; $n = 4$.

3.2.2 Die Stimulation der Zellen mit LPS ist spezifisch.

Zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse, dass die Zelllinien unterschiedlich stark auf *P. aeruginosa* und LPS reagieren, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Zellwandbestandteils Gram-negativer Bakterien stimuliert. Um unspezifische Effekte der Behandlung auf die Sekretion von IL-8 auszuschließen, wurde einerseits zusätzlich die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Zellkulturmedium bestimmt und andererseits das Antibiotikum Polymyxin B zeitgleich mit LPS zu den Zellen gegeben.

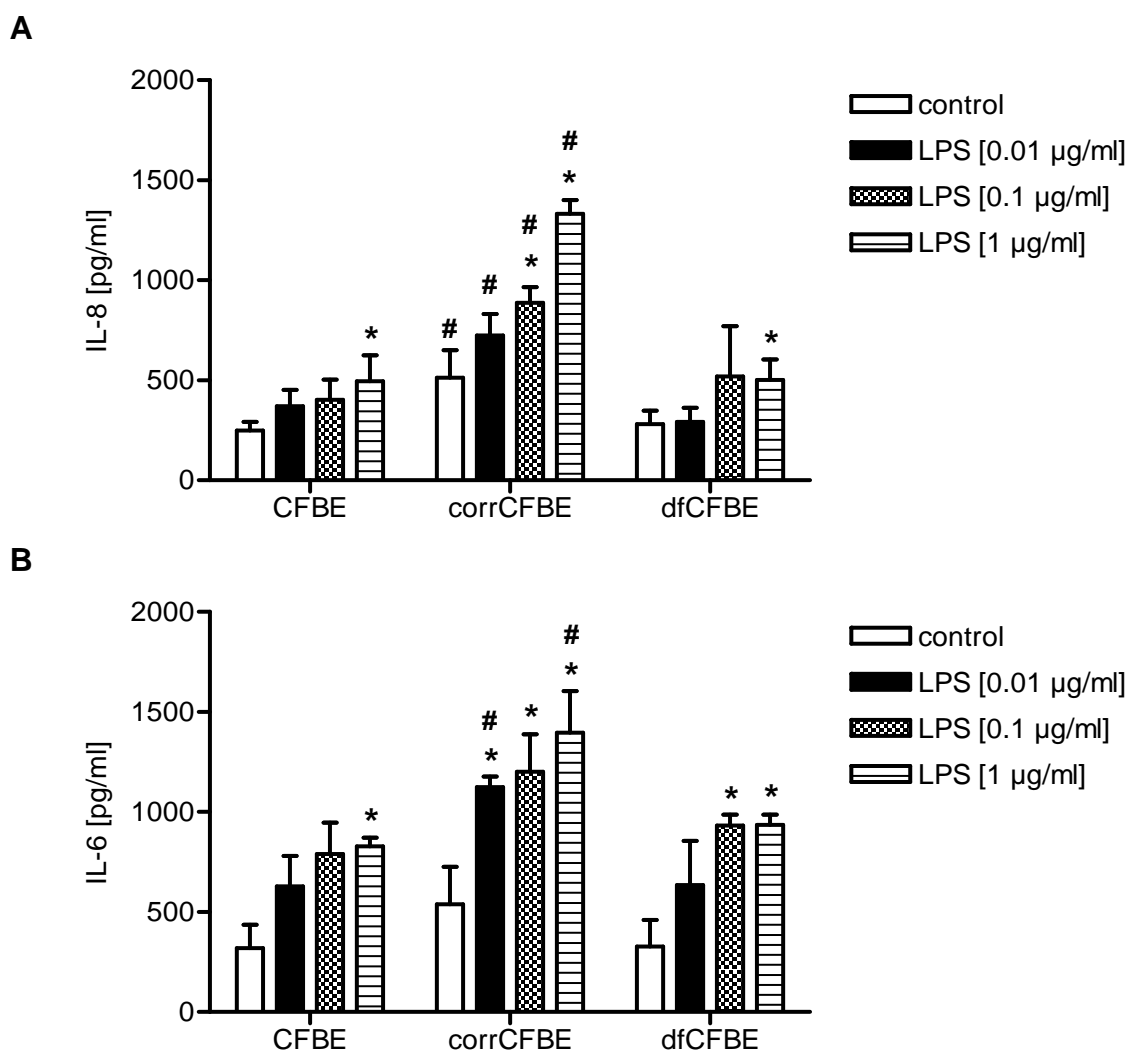


Abb. 12: Sekretion von IL-8 (A) und IL-6 (B) ins Zellkulturmedium nach Stimulation mit LPS. Die Zellen wurden apikal für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen von LPS stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Die Konzentrationen der Zytokine wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. * = signifikanter Unterschied zur jeweils unbehandelten Kontrolle, # = signifikanter Unterschied zu CFBE und dfCFBE mit $P < 0.05$; $n = 4$.

Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der Sekretion sowohl von IL-8 (Abb. 12 A) als auch von IL-6 (Abb. 12 B). Insbesondere eine Konzentration von [1 µg/ml] LPS führte in allen Zelllinien zu signifikant höheren Werten im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen, weshalb diese in allen folgenden Versuchen eingesetzt wurde. Des Weiteren bestätigte sich auch für IL-6 das erhöhte Niveau der unter basalen und stimulierten Bedingungen gemessenen Konzentrationen bei corrCFBE. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den CF- und corrCFBE-Zellen bei IL-6 nur signifikant nach Stimulation mit [0.01 µg/ml] und [1 µg/ml] LPS. Durch gleichzeitige Zugabe von LPS und Polymyxin B, das Endotoxine durch Bindung an den Lipid A-Bereich inaktiviert (114), kam es in allen Zelllinien zu einer fast vollständigen Inhibition der LPS-stimulierten IL-8-Sekretion (Abb. 13). Polymyxin B alleine hatte keine Auswirkungen auf die Produktion von IL-8.

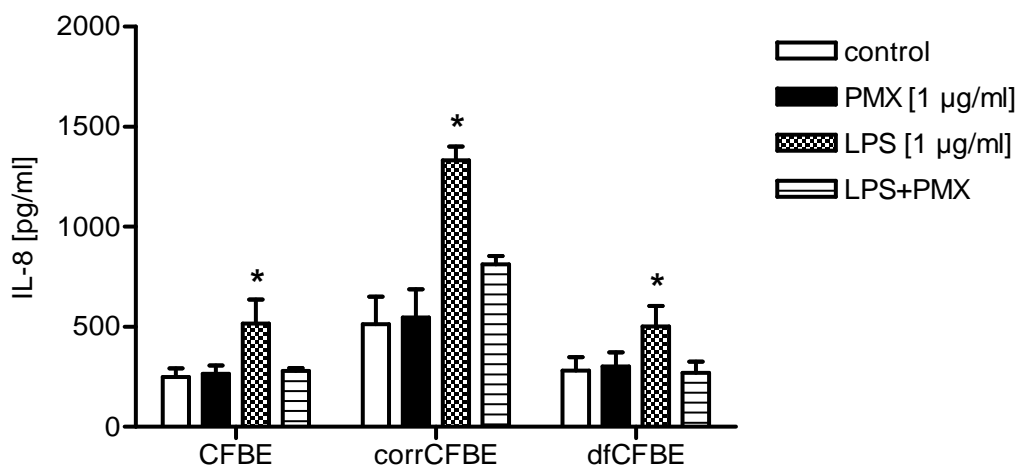


Abb. 13: Inhibition der LPS-stimulierten IL-8-Sekretion durch Polymyxin B (PMX). Die Zellen wurden apikal für 1 h mit PMX, LPS und LPS+PMX stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Die IL-8-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. * = signifikanter Unterschied von LPS zu LPS+PMX mit $P < 0.05$; $n = 4$.

3.2.3 Die Zellen reagieren nicht auf die Stimulation mit LTA.

Da anfänglich keine Unterschiede in der Sekretion von IL-8 nach Stimulation mit *S. aureus* zwischen den Zelllinien festgestellt wurde und diese nicht auf [10 µg/ml] LTA reagierten, wurde ebenfalls eine Dosiskurve für den Zellwandbestandteil Gram-positiver Bakterien erstellt. Hierbei wurden wie zuvor für LPS sowohl IL-8 (Abb. 14 A) als auch IL-6 (Abb. 14 B) im Zellkulturmedium bestimmt.

Es bestätigte sich die vorangegangene Beobachtung, da bei keiner der eingesetzten Konzentrationen von LTA ein signifikanter Anstieg der Zytokin-Sekretion zu erkennen war. Eine beeinträchtigte Aktivität des LTA aus *S. aureus* kann allerdings ausgeschlossen werden, da humane Immunzellen durch Stimulation aktiviert wurden (110). Ebenso blieb in weiteren Versuchen eine Immunreaktion der Zellen aus, wenn diese mit Peptidoglycan, als zweitem Hauptbestandteil der Zellwand von Gram-positiven Bakterien, stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt). Das Verhalten der Zellen war somit spezifisch für die Behandlung mit reinen TLR-2-Liganden.

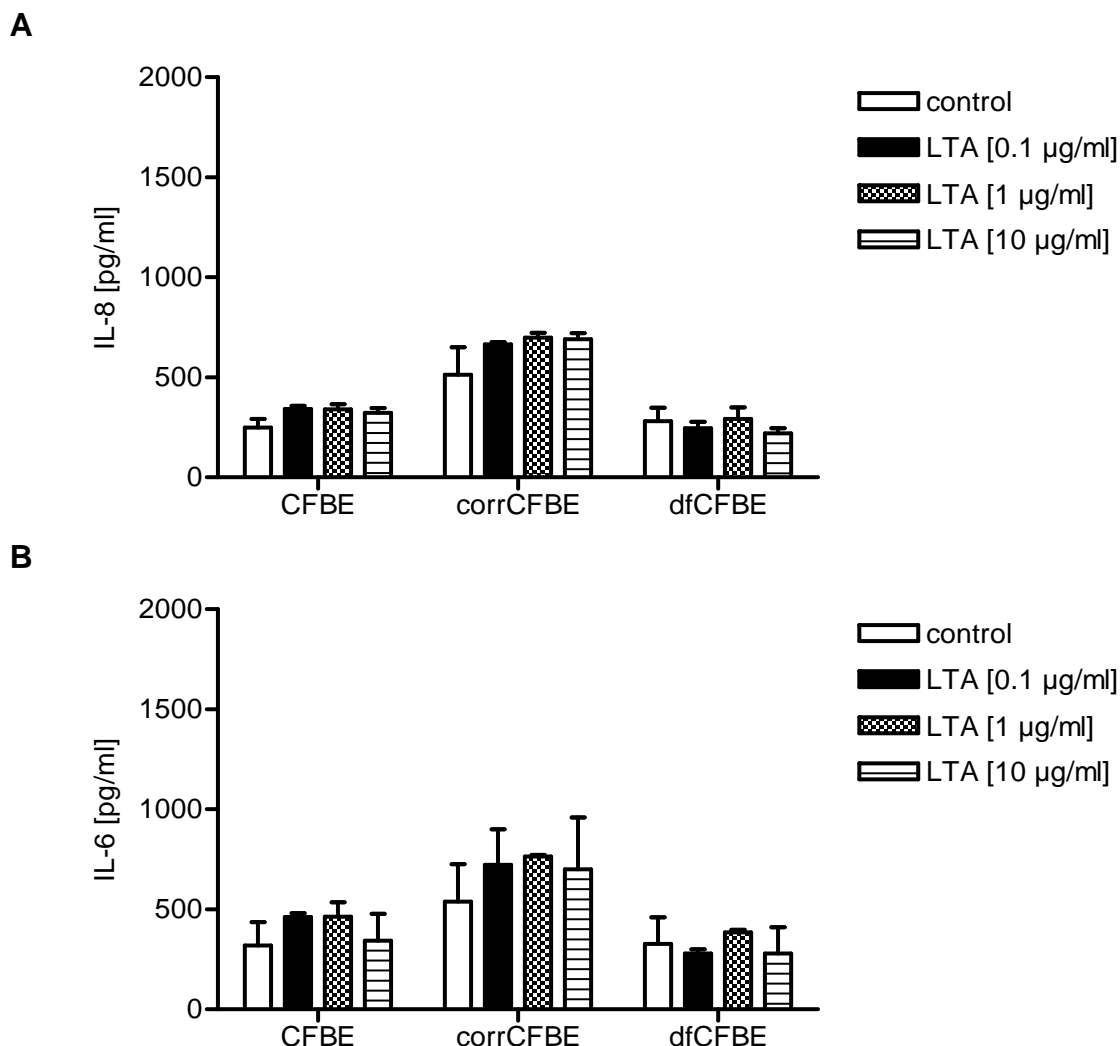


Abb. 14: Sekretion von IL-8 (A) und IL-6 (B) ins Zellkulturmedium nach Stimulation mit LTA. Die Zellen wurden apikal für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen von LTA stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Die Konzentrationen der Zytokine wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert; n = 4.

3.2.4 Die Sekretion von IP-10.

Als ein weiteres chemotaktisches Zytokin wurde IP-10 nach Stimulation der Zellen mit LPS und LTA im Zellkulturmedium bestimmt (Abb. 15). IP-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T_H1-Zellen zum Ort der Entzündung und ist somit für die Initiierung der zellvermittelten adaptiven Immunantwort von Bedeutung (115).

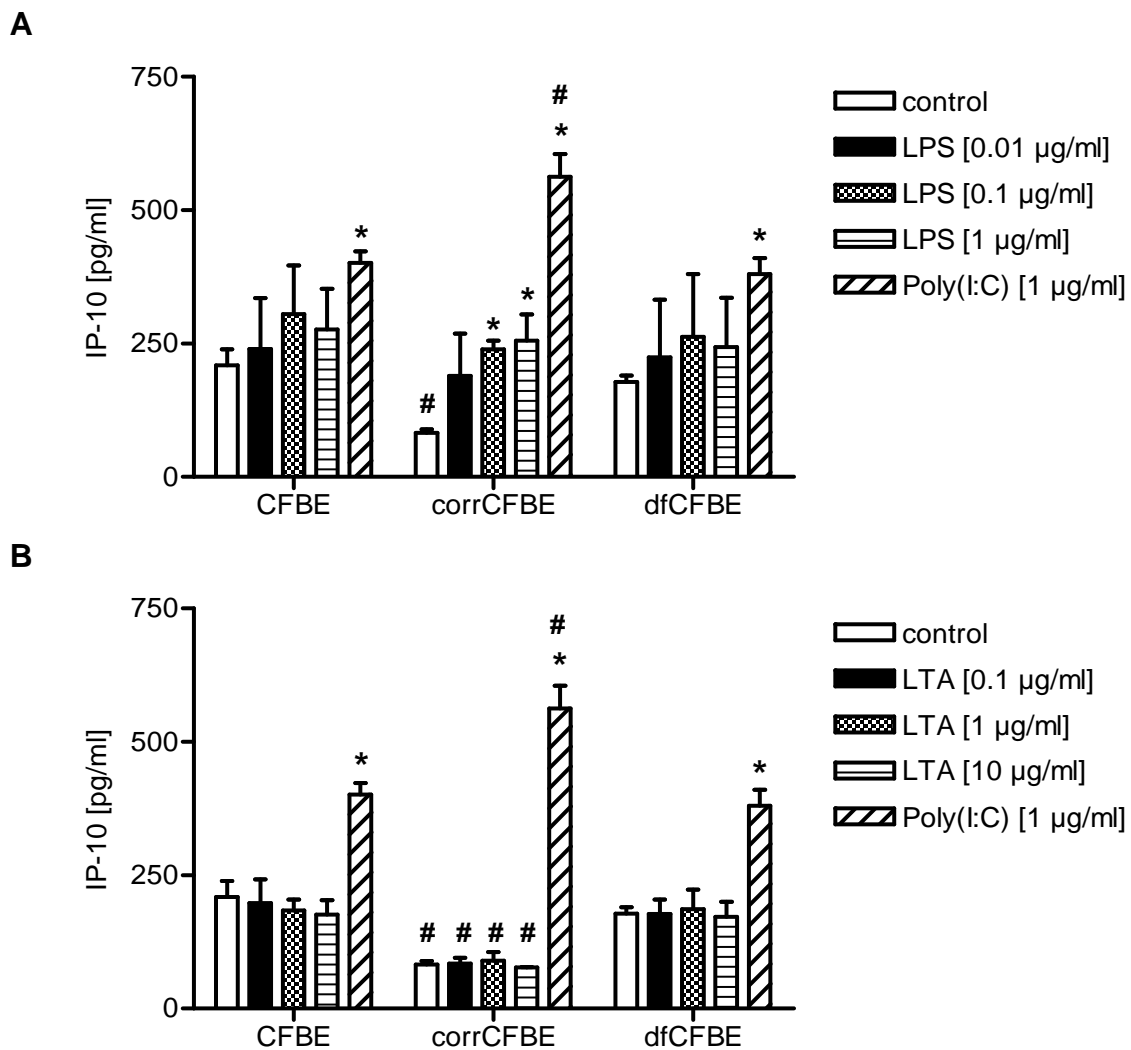


Abb. 15: Sekretion von IP-10 ins Zellkulturmedium nach Stimulation mit LPS (A) und LTA (B). Die Zellen wurden apikal für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen von LPS und LTA stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Als Positivkontrolle diente Poly(I:C). Die IP-10-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. * = signifikanter Unterschied zur jeweils unbehandelten Kontrolle, # = signifikanter Unterschied zu CFBE und dfCFBE mit $P < 0.05$; $n = 4$.

Entgegen der Ergebnisse für IL-8 und IL-6 zeigte sich hier bei corrCFBE, im Vergleich zu den CF-Zellen, eine signifikant verringerte Sekretion von IP-10 im unstimulierten Zustand. Allerdings kam es in diesen Zellen nach Stimulation mit LPS zu einem deutlichen, dosisabhängigen Anstieg der IP-10-Konzentration auf das Niveau der Werte für CFBE und dfCFBE, während diese schwach bis gar nicht reagierten (Abb. 15 A). In Bezug auf LTA war auch für IP-10 bei keiner der drei Zelllinien ein Anstieg der Sekretion zu beobachten (Abb. 15 B). Vielmehr war bei CFBE sogar eine leichte Abnahme der Werte zu erkennen. Bei allen Versuchen diente die Stimulation mit [1 µg/ml] Poly(I:C) als Positivkontrolle (116) und führte überall zu einem signifikanten Anstieg der IP-10-Sekretion. Allerdings konnte wiederum bei corrCFBE eine verstärkte Reaktionsfähigkeit im Vergleich zu den CF-Zellen nachgewiesen werden.

3.2.5 Die Aktivierung von NF-κB erfolgt TLR-abhängig.

Da der Transkriptionsfaktor NF-κB ein wichtiger Regulator der Entzündungsreaktion ist, sollte überprüft werden, ob es durch Stimulation mit LPS in den Zellen zu einer Aktivierung von NF-κB kommt und ob diese über einen TLR-abhängigen Signalweg erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit jeweils 1 µg eines 5xNF-κB-Reporterplasmids sowie ΔMyD88 oder Mal P/H, als dominant-negativen Versionen der entsprechenden Adaptermoleküle in der TLR-Kaskade, für 72 h co-transfiziert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde das β-Actin Renilla-Reporterplasmid und als Kontrolle der Leervektor pcDNA3.1 co-transfiziert. Nach anschließender LPS-Stimulation wurde die Lumineszenz im Vergleich zu unstimulierten, mit Leervektor co-transfizierten Kontrollen gemessen (Abb. 16).

Da sich die Zellen im basalen Niveau nicht unterschieden, wurden die Werte ausschließlich als Grundlage für die Berechnung der Induktion verwendet. In allen Zelllinien zeigte sich bei den LPS-stimulierten Kontrollen eine signifikante Aktivierung von NF-κB im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Analog zu den Zytokin-Daten fiel diese bei corrCFBE allerdings deutlich stärker aus, wobei ein signifikanter Unterschied nur zu CFBE bestand. Die Lumineszenz-Messung der Co-Transfektion ergab sowohl für ΔMyD88 als auch für Mal P/H eine Abnahme der beobachteten NF-κB-Aktivierung. Im Fall von Mal P/H war die Inhibition jedoch deutlich effektiver und führte in allen drei Zelllinien zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zur stimulierten und mit Leervektor co-transfizierten Kontrolle.

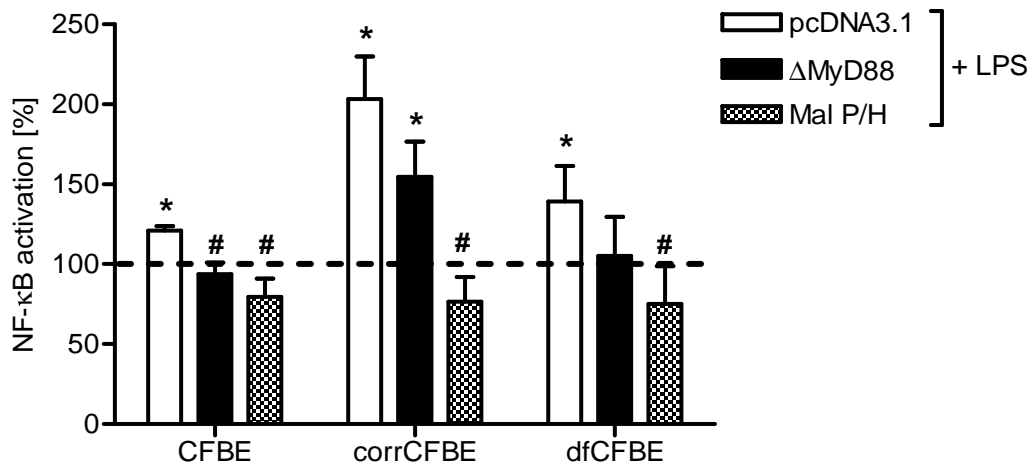


Abb. 16: Aktivierung und Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-κB. 72 h nach Co-Transfektion der Zellen mit dem 5xNF-κB-Reporterplasmid und ΔMyD88 oder Mal P/H erfolgte die Stimulation für 1 h mit [1 µg/ml] LPS. Nach weiteren 4 h wurde die Lumineszenz gemessen und anhand der gleichzeitig bestimmten Renilla-Luciferase-Aktivität auf die Transfektionseffizienz normalisiert. Die Aktivierung bzw. Inhibition ist im Vergleich zu unstimulierten und mit dem Leervektor pcDNA3.1 co-transfizierten Kontrollen (= 100%, gestrichelte Linie) angegeben. * = signifikanter Unterschied zu 100%, # = signifikanter Unterschied zur jeweils LPS-stimulierten Kontrolle (pcDNA3.1) mit $P < 0.05$; $n = 4$.

3.2.6 Die Inhibition von TLR-4 auf der Zelloberfläche.

Die Erkennung von LPS erfolgt klassischerweise über TLR-4. Durch die vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass nach Stimulation mit LPS ein TLR-abhängiger Signalweg aktiviert wird. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob die Entzündungsreaktion durch spezifische Bindung von LPS an TLR-4 auf der Zelloberfläche ausgelöst wird. Hierfür wurden die Zellen vor der LPS-Stimulation mit einem monoklonalen Antikörper gegen TLR-4 behandelt (117). Im Anschluss an die Stimulation und Inkubation in frischem Zellkulturmedium wurde die Sekretion von IL-8 mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Signaltransduktion ausschließlich bei corrCFBE durch Blockierung von TLR-4 auf der Zelloberfläche effektiv gehemmt werden konnte. Hier war die IL-8-Sekretion 24 h nach Behandlung mit dem blockierenden Antikörper und Stimulation mit LPS signifikant verringert im Vergleich zu den stimulierten Zellen (Abb. 17). Bei CFBE und dfCFBE hingegen kam es nur zu einer leichten Inhibition. Die Inkubation mit dem Antikörper alleine hatte in allen Zelllinien keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-8.

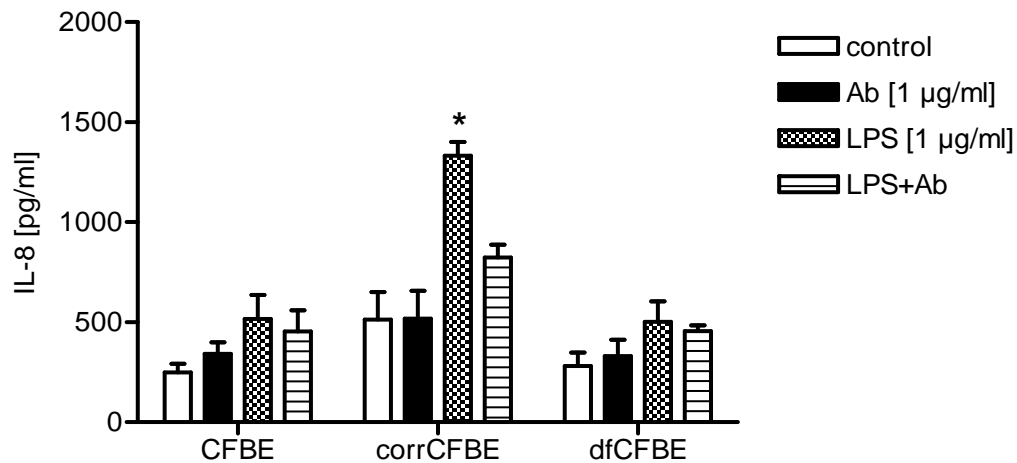


Abb. 17: Die Zugabe eines TLR-4-Antikörpers inhibiert die LPS-stimulierte IL-8-Sekretion bei corrCFBE-Zellen. Die Zellen wurden apikal für 1 h mit einem monoklonalen Antikörper gegen TLR-4 (Ab) behandelt, anschließend für 1 h mit LPS stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Die IL-8-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. * = signifikanter Unterschied von LPS zu LPS+Ab mit $P < 0.05$; $n = 4$.

3.2.7 Die LPS-stimulierte Sekretion von IL-8 wird über TLR-4 vermittelt.

Im vorangegangenen Experiment konnte eindeutig gezeigt werden, dass die beobachtete Entzündungsreaktion nach LPS-Stimulation nur bei corrCFBE, nicht aber bei den CF-Zellen, durch Bindung von LPS an TLR-4 auf der Zelloberfläche vermittelt wird. Es sollte somit weiterhin überprüft werden, ob die Signalkaskade in den CF-Zellen möglicherweise über einen anderen TLR-4-abhängigen Mechanismus aktiviert wird. Hierfür bot sich an, Knockdown und Silencing des TLR-4-Gens durch Verwendung von spezifischer siRNA zu erreichen (111). Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 48 h mit jeweils 5 nM einer siRNA gegen TLR-4 (Hs_TLR4_1 & Hs_TLR4_7) und MAPK1 als Positivkontrolle sowie mit einer Negativkontrolle transfiziert, anschließend für 1 h mit LPS stimuliert und in frischem Kulturmedium weiter inkubiert. Die Bestimmung der Zytokin-Sekretion erfolgte mittels ELISA. Die Transfektionseffizienz wurde mithilfe der Alexa Fluor 488-konjugierten Negativkontrolle im FACS bestimmt und lag für alle drei Zelllinien bei 80-90%. Als Positivkontrolle diente gegen die Proteinkinase MAPK1 gerichtete siRNA. MAPK1 wird von allen Zellen gleichermaßen exprimiert und ist demnach ein geeignetes Zielgen für Kontrollexperimente. Zur Überprüfung der Positivkontrolle

wurde ein Western Blot für MAPK1 durchgeführt. Dieser ergab in allen Fällen eine deutlich verringerte Produktion der Proteinkinase im Vergleich zu unbehandelten, nicht-transfizierten Zellen sowie zur Negativkontrolle (Abb. 18).

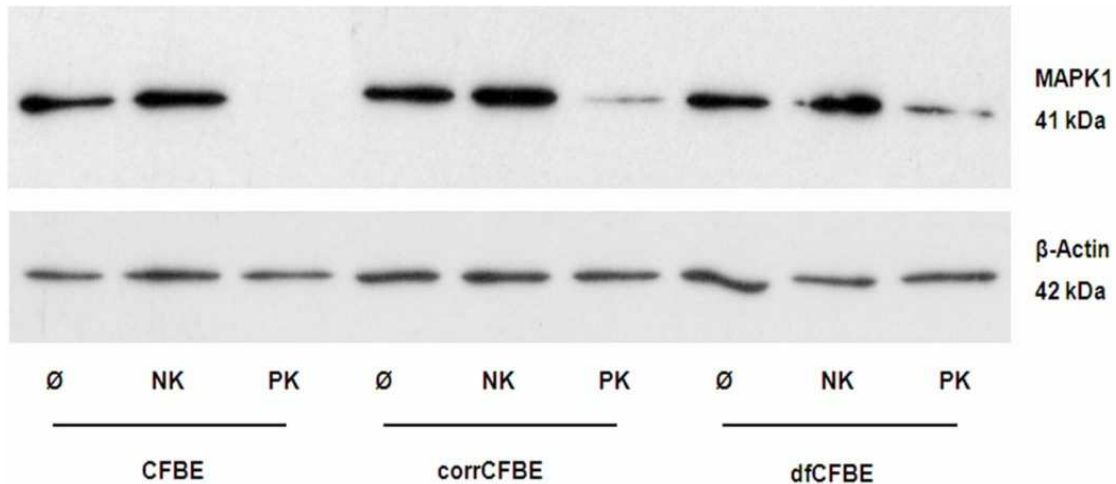


Abb. 18: Western Blot für MAPK1. In allen Zelllinien konnte unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen MAPK1 in einer Verdünnung von 1:2000 eine verringerte Produktion der Proteinkinase nach 48 h Transfektion mit 5 nM siRNA gegen MAPK1 als Positivkontrolle (PK) im Vergleich zur unbehandelten (Ø) sowie zur Negativkontrolle (NK) nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen β -Actin in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Es wurden drei Versuche mit gleichem Ausgang durchgeführt.

Untersuchungen zur mRNA-Expression mittels quantitativer real-time RT-PCR dienten der Überprüfung des Knockdowns von TLR-4. Hier zeigte sich bei den Positiv- und Negativkontrollen kein Effekt auf die Expression von TLR-4 mRNA, während diese nach Transfektion der TLR4_1 und TLR4_7 siRNA in den drei Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant verringert war (Abb. 19). Da die Inhibition der Expression bei Verwendung von TLR4_1 siRNA leicht effektiver war, wurde diese im darauf folgenden Experiment eingesetzt.

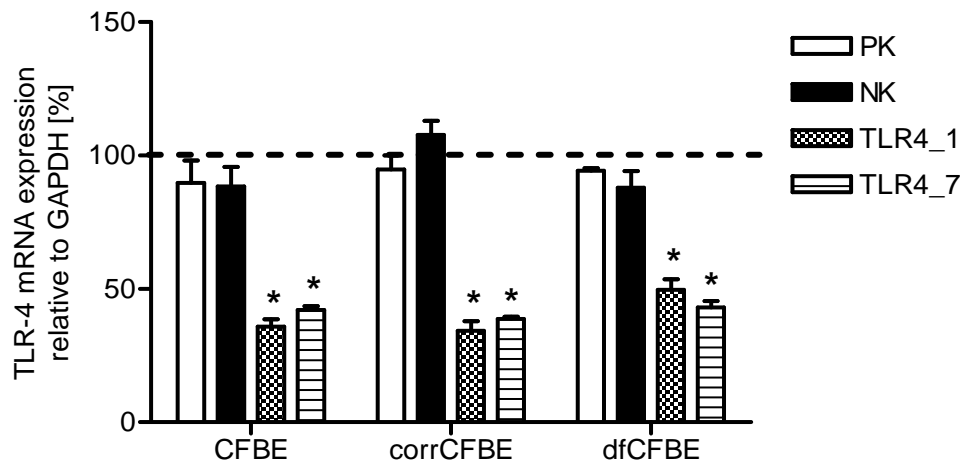


Abb. 19: Expression von TLR-4 mRNA nach 48 h Transfektion der Zellen mit MAPK1 (PK), Negativkontrolle (NK) und spezifischer TLR-4 siRNA. Die real-time PCR-Ergebnisse wurden in eine relative Expression bezogen auf das Housekeeping-Gen GAPDH umgerechnet und sind im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle (= 100%, gestrichelte Linie) angegeben. Signifikante Unterschiede zu 100% sind mit * $P < 0.05$ gekennzeichnet; $n = 4$.

An die Transfektion schlossen sich die LPS-Stimulation für 1 h und Inkubation in frischem Medium für weitere 24 h an. Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht-transfizierte, aber stimulierte Zellen mitgeführt. Ein unspezifischer Effekt der Transfektion konnte somit ausgeschlossen werden. Die Zytokin-Bestimmung mittels ELISA zeigte, dass die IL-8-Sekretion nach Transfektion der siRNA gegen TLR-4 in allen Zelllinien im Vergleich zu den stimulierten Negativkontrollen signifikant verringert war (Abb. 20). Dabei erfolgte die Darstellung der Konzentrationen im Vergleich zum mittleren Niveau der jeweiligen Negativkontrolle, da sich aufgrund der veränderten Kultivierung der Zellen für diese Versuche niedrigere absolute Werte für IL-8, verglichen mit den vorherigen Experimenten, ergaben. Die Verwendung von siRNA machte es erforderlich, dass sich die Zellen für den gesamten Zeitraum der Transfektion in einem mitotisch aktiven Zustand befanden. Aus diesem Grund wurden sie nicht unter differenzierenden ALI-Bedingungen, sondern in 6-Well Gewebekulturschalen kultiviert. Das höhere absolute IL-8-Niveau bei corrCFBE bestätigte sich aber auch unter diesen Kulturbedingungen.

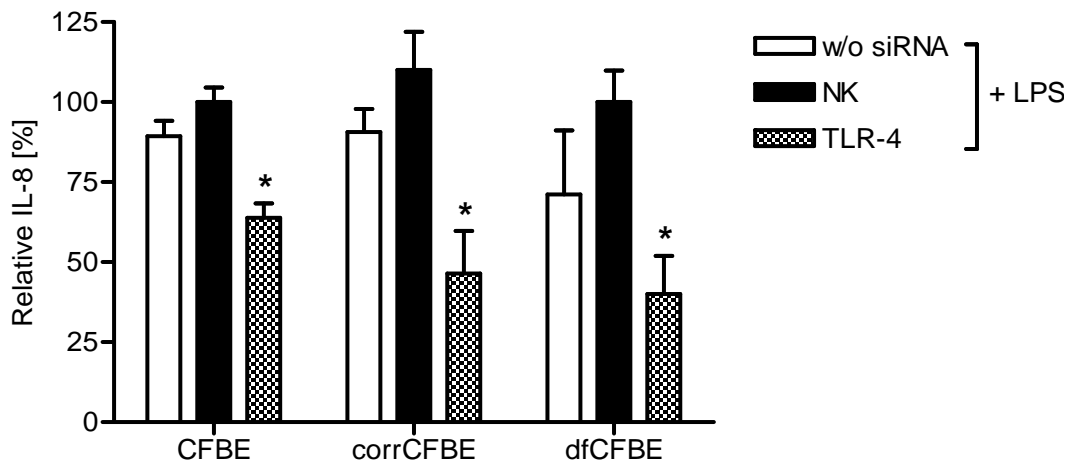
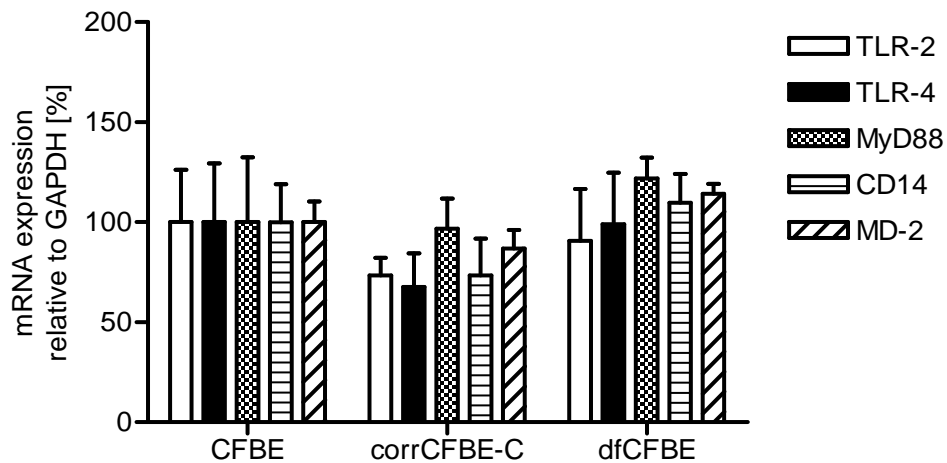


Abb. 20: Sekretion von IL-8 nach Transfektion mit siRNA und Stimulation mit LPS. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 1 h mit [1 µg/ml] LPS stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Die IL-8-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt, auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert und in eine relative Sekretion bezogen auf das mittlere Niveau der jeweiligen Negativkontrolle NK (= 100%) umgerechnet. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Negativkontrolle sind mit * $P < 0.05$ gekennzeichnet; w/o siRNA = nicht-transfizierte Kontrolle; $n = 4$.

3.2.8 Die mRNA-Expression von Komponenten des TLR-Signalwegs.

Anhand der vorangegangenen Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen mit LPS über einen TLR-4-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt. LTA hingegen, als klassischer Ligand für TLR-2, löste in allen Zelllinien keine erhöhte IL-8-Sekretion aus. Somit sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden, inwiefern die beobachteten Unterschiede der Immunreaktionen möglicherweise mit einer veränderten mRNA-Expression von TLR-2, TLR-4 und MyD88 sowie der Co-Rezeptoren CD14 und MD-2 einhergehen. Zu diesem Zweck wurden quantitative real-time PCR-Analysen für die entsprechenden Gene unter basalen und stimulierten Bedingungen durchgeführt (Abb. 21). Hierbei konnte festgestellt werden, dass alle Zellen die beiden TLRs sowie die zusätzlich erforderlichen Adaptermoleküle und Co-Rezeptoren auf mRNA-Ebene exprimierten (Abb. 21 A). Trotz leicht erniedrigter Werte bei corrCFBE waren die Unterschiede vor allem aufgrund der zumeist hohen Standardabweichungen jedoch nicht signifikant im Vergleich zum mittleren Expressionsniveau der CFBE-Zellen.

A



B

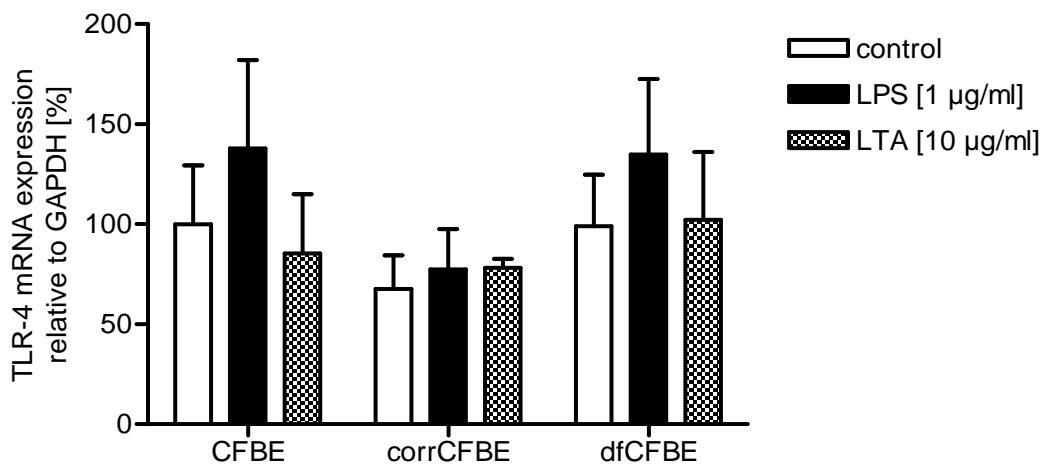


Abb. 21: Quantitative real-time PCR zur mRNA-Expression verschiedener Gene unter basalen (A) und stimulierten (B) Bedingungen. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit [1 µg/ml] LPS und [10 µg/ml] LTA für 1 h. Nach Inkubation in frischem Kulturmedium für weitere 24 h wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die real-time PCR eingesetzt. Die Ergebnisse wurden in eine relative Expression bezogen auf das Housekeeping-Gen GAPDH umgerechnet und sind im Vergleich zum mittleren, unstimulierten Niveau von CFBE (= 100%) angegeben; n = 5.

Die Stimulation der Zellen mit LPS und LTA für 1 h und die sich anschließende Inkubation in frischem Kulturmedium für weitere 24 h führte zu keinem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression aller untersuchten Gene im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle. Exemplarisch wird hier nur das Profil für TLR-4 gezeigt (Abb. 21 B). Ein ähnliches Muster war ebenso bei TLR-2, MyD88, CD14 und MD2 zu erkennen.

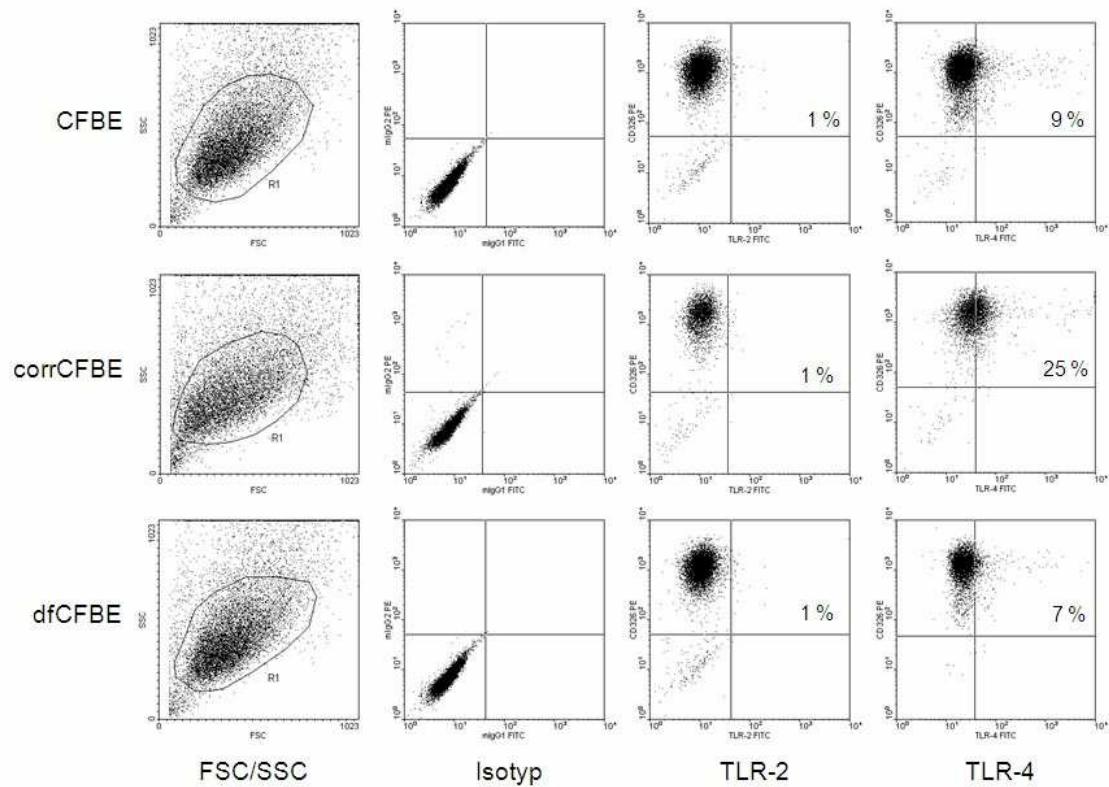
3.2.9 Auf der Zelloberfläche ist TLR-4 bei korrigierten CF-Zellen erhöht.

Da die oben untersuchten Gene auf mRNA-Ebene keine Unterschiede zwischen den Zelllinien sowohl unter basalen als auch stimulierten Bedingungen zeigten, sollte das Profil von TLR-2 und TLR-4 auf Protein-Ebene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Oberflächenfärbungen der Zellen durchgeführt und mittels FACS und Immunfluoreszenz analysiert.

Für die FACS-Analyse wurden zunächst Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) der Zellen und damit ihre Größe und Granularität bestimmt, so dass bei der Auswertung eine bezüglich dieser Eigenschaften homogene Zellpopulation (Region, R1) ausgewählt werden konnte (s. Abb. 22 A). Unspezifische Antikörper-Bindung konnte durch Verwendung einer Isotyp-Kontrolle abgeschätzt und durch Festlegung eines entsprechenden Quadranten in den folgenden Messungen von der Quantifizierung positiv gefärbter Zellen ausgeschlossen werden. Danach erfolgte die spezifische Färbung der Zelloberfläche mit einem FITC-konjugierten TLR-2-Antikörper (118) sowie mit dem unter 3.2.6 verwendeten, aber ebenso FITC-konjugierten TLR-4-Antikörper (117).

Hierbei zeigte sich in allen Zelllinien ein niedriges und vergleichbares Niveau der Oberflächenexpression von TLR-2, mit Werten um 3% (Abb. 22 B). Allerdings lag der Anteil TLR-4-positiv gefärbter Zellen insgesamt deutlich über den Werten für TLR-2 und war bei corrCFBE mit ca. 17% im Vergleich zu den CF-Zellen zweifach erhöht.

A



B

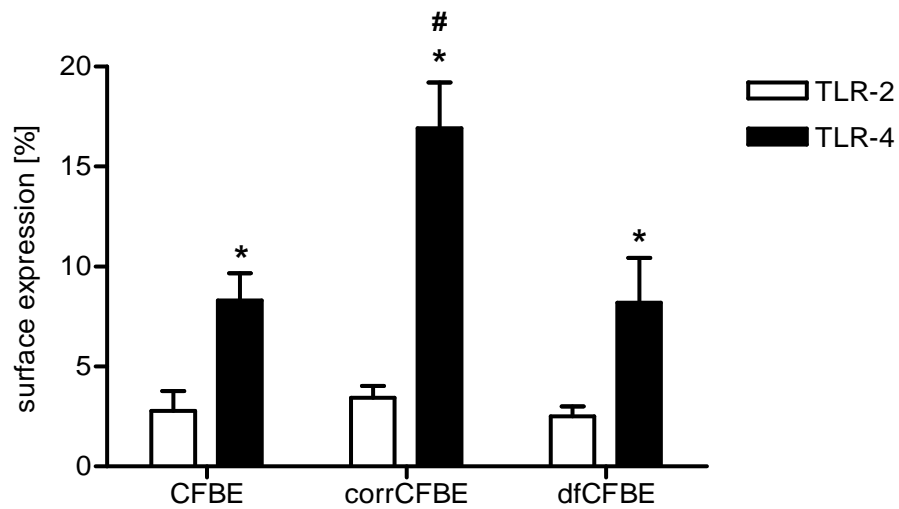


Abb. 22: FACS-Analyse zur Oberflächenfärbung von TLR-2 und TLR-4. (A) Die Messung von 10.000 Fluoreszenzereignissen nach Färbung der Zellen mit der Isotyp-Kontrolle (Mouse IgG1-FITC/IgG2-PE), dem Epithelzellmarker CD326-PE und FITC-konjugierten Antikörpern gegen TLR-2 und TLR-4 wurde mit dem FACScalibur Durchflusszytometer durchgeführt. (B) Der Anteil positiv gefärbter Zellen ist als Oberflächenexpression in [%] angegeben. * = signifikanter Unterschied zu TLR-2, # = signifikanter Unterschied zu CFBE und dfCFBE mit $P < 0.05$; $n = 5$.

Zur Bestätigung der FACS-Ergebnisse bezüglich TLR-4 wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse der Zellen durchgeführt. Im ersten Ansatz erfolgten die Färbung der Rezeptoren mit dem FITC-konjugierten Antikörper und die Gegenfärbung mit CellTracker Orange. Bei corrCFBE ergab sich eine deutliche und spezifische Färbung von TLR-4 auf der Zelloberfläche (Abb. 23 B). Bei den CF-Zellen hingegen blieb eine eindeutige Oberflächenfärbung nahezu aus (Abb. 23 A & C). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit Tween permeabilisiert und im Anschluss an die Antikörper-Bindung mit DAPI gegengefärbt. Hier zeigte sich interessanterweise, dass bei den CF-Zellen der Rezeptor oder seine Komponenten offensichtlich intrazellulär lokalisiert waren (Abb. 23 D & F), während für corrCFBE wiederum eine starke Färbung auf der Oberfläche zu erkennen war (Abb. 23 E). Unspezifische Färbung konnte in allen Ansätzen durch Verwendung einer FITC-konjugierten Isotyp-Kontrolle ausgeschlossen werden.

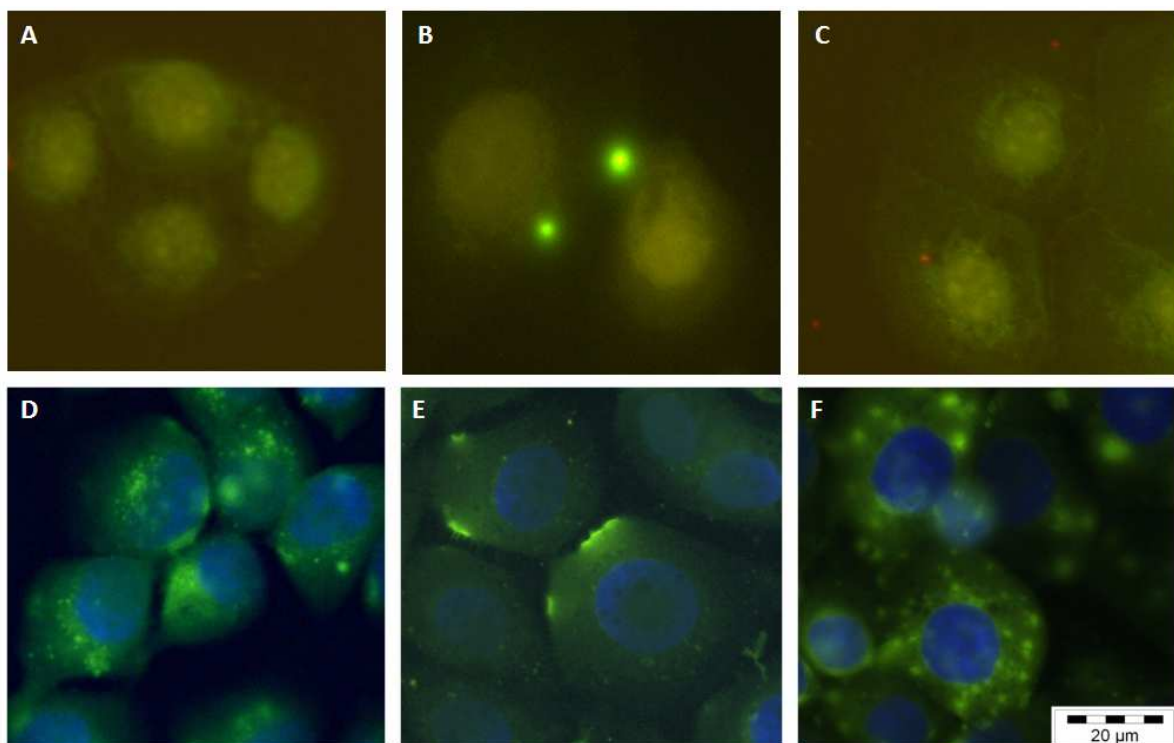


Abb. 23: Immunfluoreszenz-Analyse für TLR-4. Nicht-permeabilisierte (A-C) und permeabilisierte (D-F) Zellen wurden mit einem FITC-konjugierten TLR-4-Antikörper (grün) gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte bei A-C mit CellTracker Orange und bei D-F mit DAPI (blau). Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus erstellt. A & D = CFBE, B & E = corrCFBE, C & F = dfCFBE. Es wurden drei Versuche mit gleichem Ausgang durchgeführt.

3.2.10 Veränderungen der Oberflächenexpression von TLR-4.

In weiteren Versuchen sollte überprüft werden, ob die Stimulation der Zellen mit LPS sowie die Transfektion mit spezifischer siRNA zu Veränderungen der Oberflächenexpression von TLR-4 führen. Zu diesem Zweck wurden FACS-Analysen für TLR-4 nach LPS-Stimulation sowie nach 48 h Transfektion mit siRNA durchgeführt (Abb. 24).

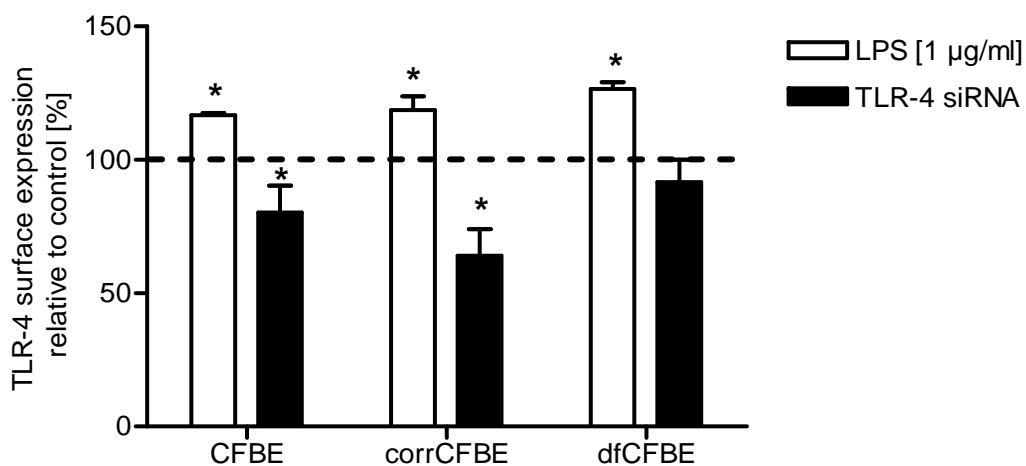


Abb. 24: FACS-Analyse für TLR-4 nach LPS-Stimulation und siRNA-Transfektion. Die Zellen wurden für 1 h mit [1 µg/ml] LPS stimuliert, für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert oder für 48 h mit siRNA gegen TLR-4 transfiziert und anschließend der Oberflächenfärbung unterzogen. Die Zu- bzw. Abnahme des Anteils positiv gefärbter Zellen ist als Oberflächenexpression in [%] im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle (= 100%, gestrichelte Linie) angegeben. Signifikante Unterschiede zu 100% sind mit * $P < 0.05$ gekennzeichnet; $n = 3$.

24 h nach Stimulation mit LPS war in allen Zellen eine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression von TLR-4 im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Dabei war die Höhe der Zunahme interessanterweise in allen Zellen ähnlich. Die FACS-Analyse nach 48 h Transfektion mit siRNA gegen TLR-4 hingegen zeigte eine Abnahme der Oberflächenexpression, die bei CFBE und corrCFBE im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant verändert war, und konnte als weiterer Beweis für die Spezifität der eingesetzten siRNA gewertet werden.

3.2.11 Die Bronchialepithel-Zelllinie HBE als Kontrolle.

Als zusätzliche und dem gesunden Zustand entsprechende Kontrolle wurden HBE-Zellen bei nahezu allen Experimenten mitgeführt. Da diese in Bezug auf die Sekretion von Zytokinen Zelllinien-bedingt deutlich höhere absolute Werte zeigten, wurde auf eine gemeinsame Darstellung mit den CFBE-Zellen verzichtet. Zusammenfassend konnte für die HBE-Zelllinie folgendes festgestellt werden.

Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zeigte ein ähnliches Muster wie bei corrCFBE. Nach Stimulation mit dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* und dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS kam es zu einem bis zu dreifachen und signifikanten Anstieg der IL-8-Sekretion (Abb. 25). Ebenso war eine Reaktion der Zellen nach Stimulation mit *S. aureus*, als Vertreter der Gram-positiven Bakterien, zu erkennen. Der Zellwandbestandteil LTA hingegen löste keine signifikant erhöhte Sekretion von IL-8 aus. TNF- α [100 ng/ml] diente wiederum als Positivkontrolle und bewirkte einen signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration. Die Reaktion der Zellen auf LPS war gleichermaßen für IL-6 zu erkennen und konnte nach Inkubation mit dem Antibiotikum Polymyxin B (PMX) inhibiert werden. Wie im Fall von corrCFBE zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Sekretion von IP-10 nur nach Stimulation mit LPS, nicht aber mit LTA. Ebenso erfolgte die Aktivierung von NF- κ B durch Stimulation mit LPS über einen TLR-abhängigen Signalweg, da die dominant-negativen Versionen der Adaptermoleküle MyD88 und Mal den Mechanismus inhibieren konnten. Die Immunreaktion wurde auch bei HBE eindeutig über die Bindung des Liganden LPS an TLR-4 vermittelt, da die Inkubation mit dem blockierenden Antikörper zu einer signifikanten Abnahme der IL-8-Sekretion nach Stimulation führte. Einen ähnlichen Effekt hatte die Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA gegen TLR-4 mRNA. Von besonderem Interesse war hier somit auch das Profil von TLR-2 und TLR-4 auf der Zelloberfläche. Die entsprechenden FACS-Messungen ergaben interessanterweise Werte, die vergleichbar mit denen für corrCFBE waren. Der Anteil positiv gefärbter Zellen lag für TLR-4 bei 16.0 ± 2.0 % sowie für TLR-2 bei 4.9 ± 1.3 % (Tab. 4).

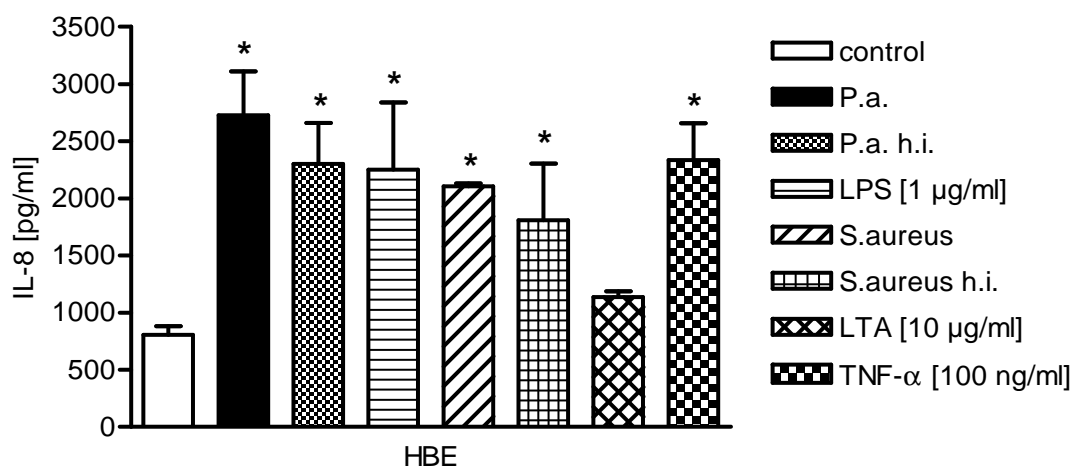


Abb. 25: IL-8-Sekretion der HBE-Zellen. Die Zellen wurden apikal für 1 h mit [1×10^8 /ml] lebenden und hitzeinaktivierten (h.i.) *P. aeruginosa* und *S. aureus* sowie LPS und LTA stimuliert und für weitere 24 h in frischem Kulturmedium inkubiert. Als Positivkontrolle diente TNF- α . Die IL-8-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt der lysierten Zellen normalisiert. * = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle mit $P < 0.05$; $n = 4$.

Tab. 4: Statistische Übersicht zur FACS-Analyse. Der prozentuale Anteil TLR-positiv gefärbter Zellen ist als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben; * = signifikanter Unterschied zu TLR-2, # = signifikanter Unterschied zu CFBE und dfCFBE mit $P < 0.05$; $n = 5$.

Zellen	TLR-2-positiv [%]	TLR-4-positiv [%]
HBE	4.9 \pm 1.3	16.0 \pm 2.0 * #
CFBE	2.8 \pm 1.0	8.3 \pm 1.4 *
corrCFBE	3.4 \pm 0.6	16.9 \pm 2.3 * #
dfCFBE	2.5 \pm 0.5	8.2 \pm 2.2 *

3.3 Die Aktivierung weiterer Signalwege.

3.3.1 Der MAPK-Signalweg.

Nach Bindung eines Liganden an TLRs kann es neben der Freisetzung von NF- κ B auch zur Aktivierung des MAPK-Wegs, vor allem von p38 und JNK kommen (vgl. Abb. 6). Dieser Weg, der im Fall der klassischen MAPK-Kaskade normalerweise direkt durch Wachstumsfaktoren oder bei p38 und JNK durch Stress und Entzündungsprozesse freigesetzte Zytokine vermittelt wird, führt wiederum zur Freisetzung weiterer Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription anderer Gene sowie die mRNA-Stabilität regulieren und beeinflussen (49).

Somit sollte weiterhin überprüft werden, ob die unterschiedliche Verfügbarkeit von TLR-4 auf der Zelloberfläche ebenso die Aktivierung der MAP-Kinasen, insbesondere von p38 und JNK, beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die Zellen im Western Blot mit entsprechenden anti-phospho Antikörpern auf die Phosphorylierung von MEK1/2 (MAP Kinase Kinase, auch MKK), p38 und JNK hin untersucht. Als Referenz und Ladekontrolle wurden für alle Versuche Antikörper gegen das totale Protein der jeweiligen Kinase sowie ein β -Actin-Antikörper verwendet (Abb. 26).

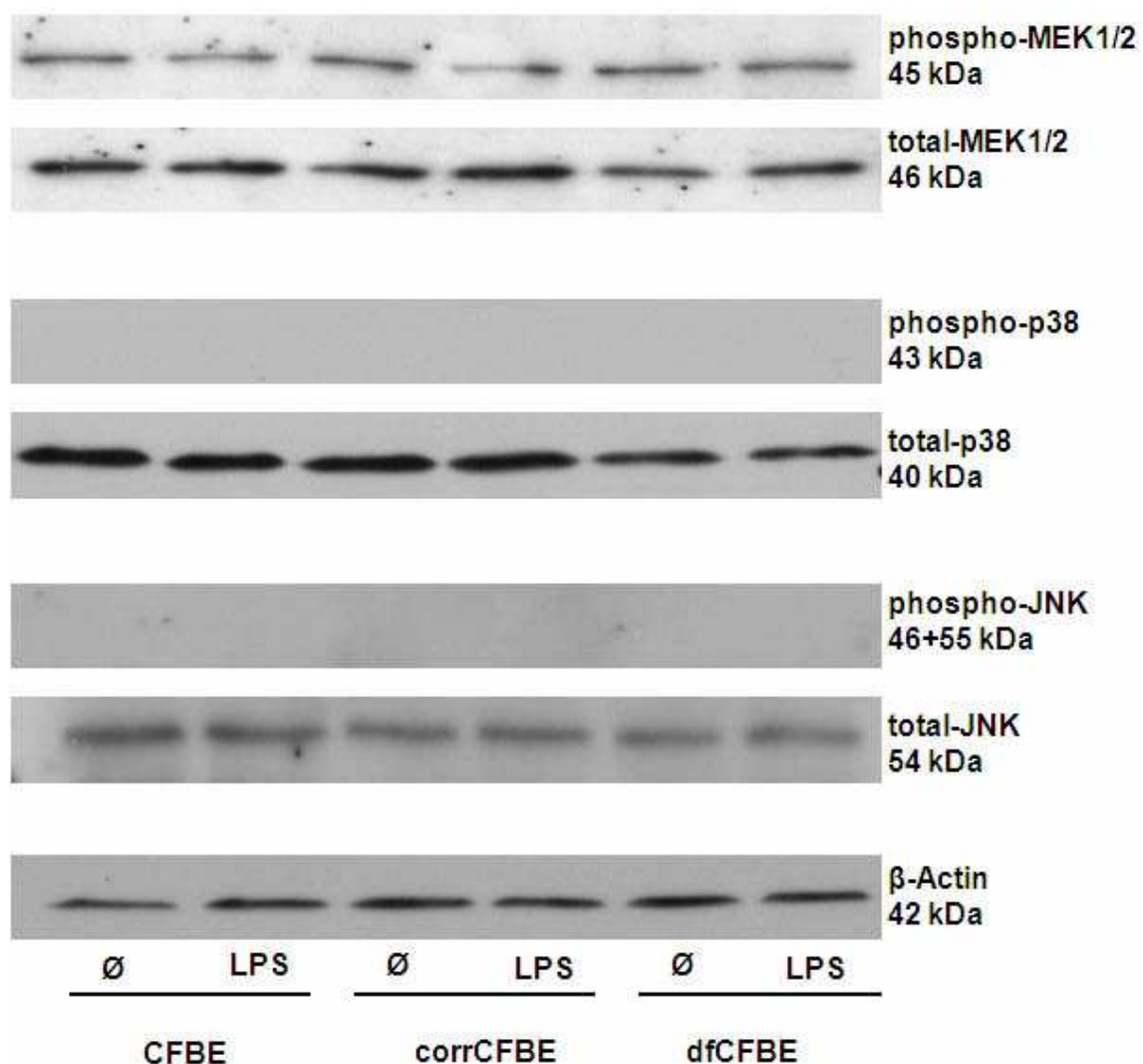


Abb. 26: Aktivierung des MAPK-Signalwegs. In allen Zelllinien konnte unter Verwendung von anti-phospho Antikörpern, jeweils in einer Verdünnung von 1:1000, ausschließlich die Phosphorylierung von MEK1/2 sowohl im basalen Zustand als auch nach Stimulation mit [1 μ g/ml] LPS nachgewiesen werden. Als Referenz und Ladekontrolle wurden Antikörper gegen das totale Protein der jeweiligen Kinase sowie ein monoklonaler Antikörper gegen β -Actin, jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Es wurden drei Versuche mit gleichem Ausgang durchgeführt.

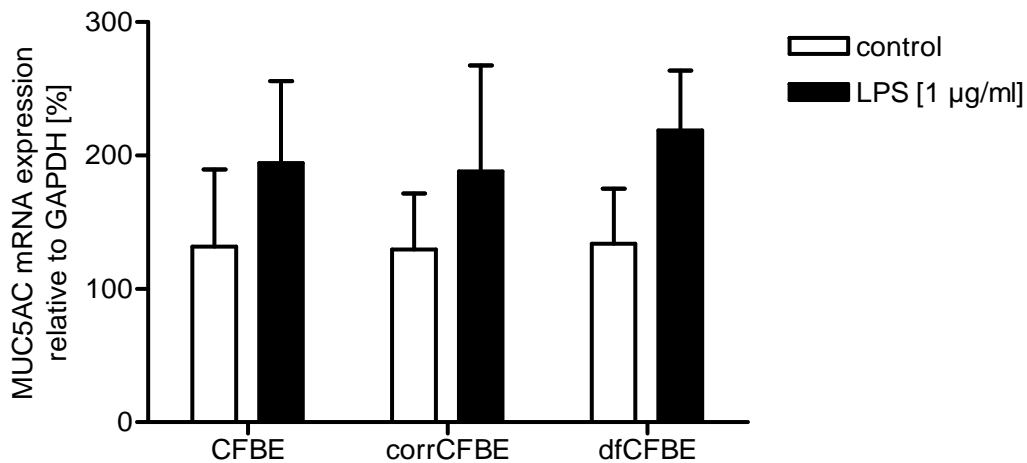
MEK1/2, die als Bestandteil der klassischen MAPK-Kaskade an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist, war in allen Zellen sowohl unter basalen als auch stimulierten Bedingungen gleichermaßen und im phosphorylierten Zustand nachweisbar. Die Stimulation mit [1 µg/ml] LPS führte zu keiner veränderten Aktivierung. Demgegenüber konnte eine Phosphorylierung sowohl von JNK als auch von p38, trotz Nachweis der totalen Proteine, nach LPS-Stimulation nicht detektiert werden. Eine LPS- und damit TLR-4-abhängige Aktivierung der beiden Kinasen erfolgte somit nicht.

3.3.2 Die Mucine MUC5AC und MUC5B.

Als Hauptbestandteil der Sekrete in gesunden und erkrankten Atemwegen sind die Mucine von besonderer Bedeutung. Ihre Transkription und Sekretion unterliegen verschiedenen Mechanismen. Vor allem Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β) und bakterielle Komponenten (u.a. LPS, LTA) sind in der Lage, an spezifische Rezeptoren wie TLRs auf der Zellmembran zu binden. Auf direkte oder indirekte Weise werden anschließend entsprechende MAPK-Signalwege aktiviert, die letztendlich auch in der Hochregulation der Mucin-Transkription resultieren (82). In einem weiteren Schritt wurde somit überprüft, inwiefern das veränderte TLR-4-Profil auch zu unterschiedlichen Niveaus der Genexpression von MUC5AC und MUC5B führt. Hierfür wurden quantitative real-time PCR-Analysen durchgeführt.

In allen Zelllinien zeigte sich im basalen Zustand ein ähnliches Expressionsniveau von MUC5AC und MUC5B (Abb. 27). Nach LPS-Stimulation zeichnete sich zwar allgemein ein Anstieg der Werte ab, die Unterschiede waren aber vor allem aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollen. Insgesamt lag das absolute Expressionsniveau von MUC5AC allerdings deutlich niedriger als bei MUC5B und war auch größeren Schwankungen unterworfen. Im Vorfeld der Untersuchungen wurden deshalb für MUC5AC mehrere Primer getestet, die alle ähnliche Ergebnisse erzielten. Aufgrund des schwachen Signals bei der real-time PCR muss somit davon ausgegangen werden, dass MUC5AC in den Zelllinien nur schwach exprimiert wurde.

A



B

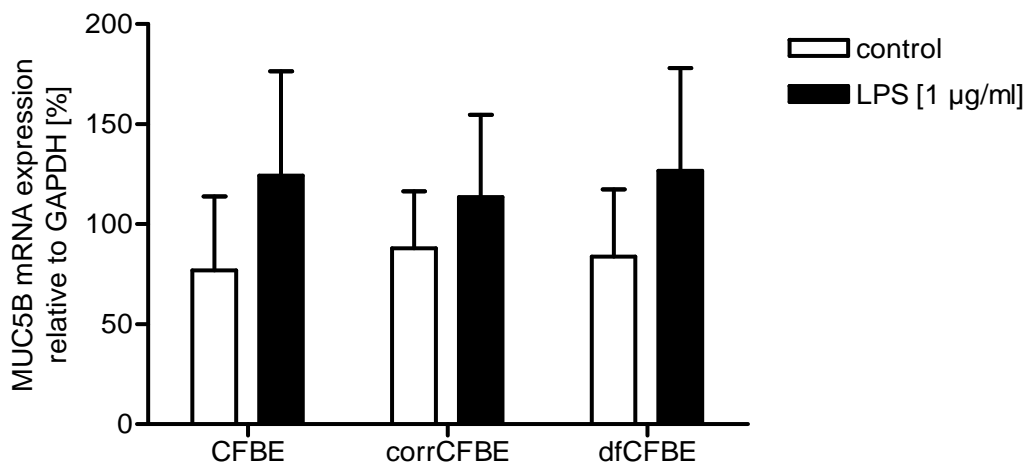


Abb. 27: Quantitative real-time PCR zur mRNA-Expression von MUC5AC (A) und MUC5B (B). Die Stimulation der Zellen erfolgte mit [1 µg/ml] LPS für 1 h. Nach Inkubation in frischem Kulturmedium für weitere 24 h wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die real-time PCR eingesetzt. Die Ergebnisse wurden in eine relative Expression bezogen auf das Housekeeping-Gen GAPDH umgerechnet und sind im Vergleich zum mittleren, unstimulierten Niveau von CFBE (= 100%) angegeben; n = 5.

3.4 Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen.

Zur Unterstützung der *in vitro*-Daten wurden Gewebeschnitte humaner CF- und Donor-Lungen in die Untersuchungen mit einbezogen. Hierbei erfolgte die TLR-4-Färbung von jeweils drei Schnitten pro Lunge und Serienschnitt (vgl. Tab. 3) nach dem unter 2.13 beschriebenen Protokoll.

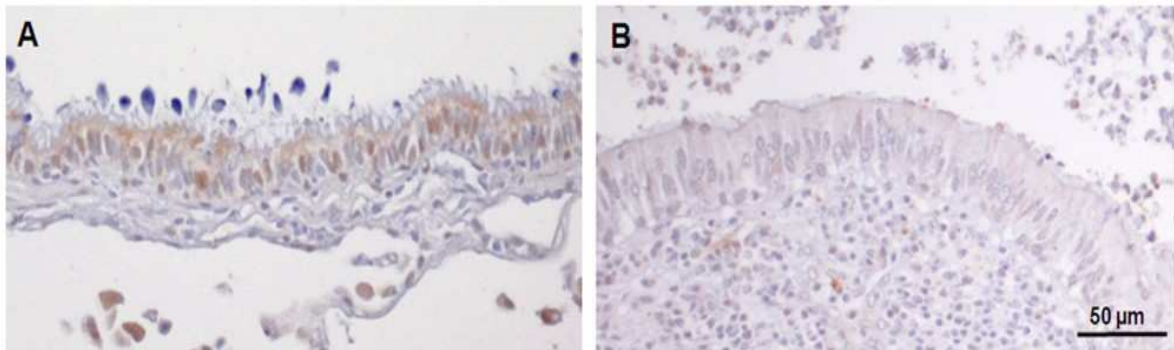


Abb. 28: Immunhistochemische Färbung des Bronchialepithels einer humanen Donor- (A) und CF-Lunge (B) für TLR-4. Die Gewebeschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen TLR-4 (1:150) gefärbt. Das Substrat DAB wurde zu einem braunen Präzipitat umgesetzt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer. Es wurden pro Lunge und Serienschnitt jeweils drei Färbungen mit gleichem Ausgang durchgeführt.

Die Abbildung 28 zeigt repräsentative Ausschnitte einer Donor- und einer CF-Lunge. Eine starke Färbung der Epithelzellen für TLR-4 war deutlich bei Gesunden, insbesondere in apikalen Zell-Bereichen, zu erkennen. Das Lungengewebe der CF-Patienten hingegen war nur schwach bis gar nicht für TLR-4 gefärbt, zeigte in Alveolarbereichen allerdings eine starke Fibrose, die ein Charakteristikum des Krankheitsbildes von CF ist.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem Zellkulturmodell der bronchialen CF-Epithel-Zelllinie CFBE41o- sowie der entsprechenden CFTR-korrigierten Kontroll-Zelllinie gezeigt werden, dass es bei CF zu CFTR-abhängigen Veränderungen von Komponenten und Mechanismen der angeborenen Immunantwort, und zwar des TLR-4-Signalwegs, kommt. Ein Einfluss dieser CFTR-abhängigen Veränderungen auf die Aktivierung weiterer Signalwege und damit auf die mRNA-Expression von Mucinen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

4.1 Das etablierte Zellkultur-Modell ist für Untersuchungen zu CF geeignet.

Für *in vitro*-Experimente mit Epithelzellen ist der Aspekt der Differenzierung von zentraler Bedeutung. Um einen entsprechenden Zustand der Zellen zu erreichen, wurden diese auf permeablen Membraneinsätzen unter Verwendung eines Differenzierungsmediums kultiviert. Das Wachstum unter sogenannten air-liquid interface (ALI)-Bedingungen führt zur Polarisierung und Differenzierung der Zellen, die auf diese Weise strukturelle und elektrophysiologische Eigenschaften des Originalgewebes beibehalten oder wiedergewinnen (107-109, 119). Leicht messbar und charakteristisch sind vor allem die elektrophysiologischen Eigenschaften, die Rückschlüsse auf den Ionentransport, insbesondere von Chlorid, zulassen. Der transepitheliale Widerstand ist die Folge der Ausbildung sogenannter tight junctions zwischen den Zellen, so dass eine parazelluläre Barriere entsteht. Mittels eines Ohmmeters kann ein elektrischer Widerstand gemessen werden, der als Maß für die Differenzierung dient (106). Im Vorfeld der durchgeführten Experimente konnten für HBE Werte um $500 \Omega \times \text{cm}^2$ sowie für CFBE und die genetisch veränderten Zellen Werte zwischen $200\text{-}300 \Omega \times \text{cm}^2$ gemessen werden. Da diese somit im Mittelfeld der erreichbaren Werte lagen, wurden die Zellen ab diesem Zeitpunkt als ausreichend differenziert betrachtet und den entsprechenden Versuchen unterzogen.

Des Weiteren zeigte sich bei verschiedenen Epithelzelltypen ein regulatorischer Einfluss der zellulären Differenzierung auf die CFTR-Expression, die im Vergleich zu den entsprechenden undifferenzierten Zellen deutlich erhöht war (120). Für Untersuchungen zu CF sind geeignete Kontroll-Zelllinien mit stabiler Expression des Wildtyp-CFTR unerlässlich. Zahlreiche Studien mussten sich zumeist auf

Vergleiche zwischen primären Kulturen oder immortalisierten Zelllinien von Gesunden auf der einen und Patienten mit CF auf der anderen Seite beschränken (41, 99, 101, 103). In ersten geeigneten Zellsystemen wurden gesunde Zelllinien transient entweder mit der R-Domäne des CFTR oder mit antisense-CFTR-Plasmiden transfiziert (42, 43, 121, 122). Die so entstandenen Zellen wiesen keinen cAMP-abhängigen Chlorid-Transport mehr auf und stellten demnach den CF-Phänotyp dar. Stabile Expressionssysteme für das Wildtyp-CFTR-Protein wurden unter Verwendung der bronchialen CF-Zelllinien CFT1 (91, 100, 123, 124) und IB3 (44, 45, 102) etabliert. Letztere ist jedoch nicht homozygot für die $\Delta F508$ -Mutation wie die CFT1-Zelllinie, sondern weist zwei Mutationen des CFTR-Gens ($\Delta F508/W1282X$) auf und wird demnach als compound-heterozygot bezeichnet. Zusätzlich kommt es unter den angewendeten Kulturbedingungen zu keiner Polarisierung beider Zelllinien.

Die Generierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CFTR-korrigierten Zelllinien wurde erstmalig 2006 beschrieben (98). Darin wurde bereits auf die erfolgreiche Korrektur der Zellen verwiesen, da eine transgene Expression des CFTR sowie ein wiederhergestellter cAMP-abhängiger Chlorid-Transport festgestellt werden konnten. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen in dieser Arbeit mittels Western Blot auf die Produktion des CFTR hin untersucht. Wie andere Glykoproteine auch wird das CFTR-Protein an ER-assoziierten Ribosomen synthetisiert. Dort erfolgt die Glykosylierung der Asparagin-Reste 894 und 900. Ein Großteil des Wildtyp-Proteins, etwa 70%, wird allerdings direkt am ER dem Abbau zugeführt. Der verbleibende Anteil wird zum Golgi-Apparat transportiert und entlang des sekretorischen Weges weiter modifiziert und glykosyliert, bis das mature Protein entstanden ist (10). Bei CF führen Mutationen des CFTR-Gens zu verschiedenen Defekten am Protein (9). Die häufigste Mutation, $\Delta F508$, führt bei etwa 70% aller Patienten aufgrund einer Deletion von drei Basenpaaren zum Fehlen eines Phenylalanins an Position 508 in der Aminosäuresequenz des CFTR-Proteins (13) (vgl. Abb. 3). Annähernd 100% der betroffenen CFTR-Kanäle werden aufgrund ihrer leicht veränderten Proteinstruktur am ER als fehlgefaltet erkannt und dem Abbau zugeführt, ohne dass es zu einer vollständigen Reifung und einem Einbau in die apikale Membran kommt (10, 12, 15, 16). Aus diesen Gründen können verschiedene Formen des CFTR anhand des Glykosylierungsgrades im Western Blot identifiziert werden (125, 126). Die Bande bei 130 kDa entspricht dem

neu synthetisierten, nicht glykosylierten Polypeptid, während bei 150 kDa die bereits am ER stellenweise glykosylierte, aber nicht mature Form zu finden ist. Diese beiden Banden waren bei allen Zelllinien in unterschiedlichen Mengen nachweisbar (vgl. Abb. 10). Das vollständig glykosylierte und mature Protein hingegen weist eine Größe von ungefähr 170 kDa auf und war deutlich bei HBE sowie etwas schwächer bei CFTR-korrigierten Zellen detektierbar. Diese Daten bestätigten die durchgeführte Korrektur des CFTR-Gens zusätzlich auch auf funktioneller Ebene.

4.2 Der TLR-4-Signalweg ist bei CF beeinträchtigt.

In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* und dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS bei CF-Zellen beeinträchtigt ist. Die CFTR-korrigierten Zellen waren in der Lage, stärker auf bakterielle Stimuli zu reagieren, und ließen bereits im basalen Zustand eine erhöhte IL-8-Sekretion erkennen (vgl. Abb. 11). Das entsprechende Verhalten der Zellen bestätigte sich auch für IL-6 und konnte aufgrund der LPS-Inhibition durch Polymyxin B, das Endotoxine durch Bindung an den Lipid A-Bereich inaktiviert (114), als spezifisch angesehen werden (vgl. Abb. 13).

Vergleichbare Ergebnisse für IL-8 konnten auch bei CFT1 und der CFTR-korrigierten Zelllinie gemessen werden (100, 103). Hier waren basale Werte bei den korrigierten Zellen bereits erhöht. Allerdings führte die Stimulation mit lebendem und hitzeinaktiviertem *P. aeruginosa* nur in den CF-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen, die aber weiterhin unter den Werten der korrigierten Zellen lagen. Alle Zellen reagierten fast gar nicht auf die Behandlung mit LPS und IL-1 β , als ein typisches von Alveolarmakrophagen sezerniertes Zytokin, wohingegen die Stimulation mit TNF- α zu einer ähnlichen Induktion von IL-8 führte (103). Hier zeigte sich, dass zwar ein Defekt in der IL-8-Sekretion des CF-Epithels bestand, der Verlust der CFTR-Funktion allein aber einen eher geringen Effekt auf den generellen Mechanismus der IL-8-Aktivierung hatte. Bei einer Studie an primären Epithelzellen von Gesunden und CF-Patienten wurden zwar basal erhöhte Werte der NF- κ B-Aktivität und des IL-8-Levels bei den CF-Zellen gefunden. Allerdings waren bei den Zellen von Gesunden stärkere Reaktionen in Bezug auf beide Parameter nach Stimulation mit IL-1 β und *P. aeruginosa* zu beobachten (99).

Hier schien bei den CF-Zellen ein Defekt der intrazellulären NF- κ B-Aktivität und möglicherweise weiterer Transkriptionsfaktoren oder eine Erschöpfung der IL-8-Synthese zutage zu treten.

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen, die keine Unterschiede zwischen CF- und gesunden Zellen in der sowohl basalen als auch verschiedenen stimulierten NF- κ B-Aktivierung und Sekretion von IL-8, IL-6 und GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), einem weiteren für die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen wichtigen Zytokin, fanden (127-129). Hier zeigte sich, dass die CFTR-Mutation nicht *per se* zu einer verstärkten Entzündungsreaktion des Epithels in Ab- und Anwesenheit einer bakteriellen Infektion führte. Vielmehr stand die erhöhte IL-8-Sekretion von primären CF-Epithelzellen mit einer bei CF beobachteten erhöhten Adhärenz von *P. aeruginosa* auf der Zelloberfläche in Verbindung (101). Nach Normalisierung auf die gleiche Bakterienzahl waren die Konzentrationen vergleichbar, wie ebenso basale Werte für IL-8 und NF- κ B. Weitere Untersuchungen an verschiedenen CF- und Nicht-CF-Zelllinien zu der Aktivierung von NF- κ B sowie der Sekretion von IL-8 und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), einem für die transepitheliale Passage von Leukozyten erforderlichen Adhäsionsmolekül, unterstützen die Ansicht, dass die bakterielle Last in der CF-Lunge für die Entzündung ausschlaggebend ist (102).

Der Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NF- κ B und der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen ist durch Untersuchungen am Transkriptionsfaktor belegt (130). Dabei resultieren proinflammatorische Stimuli letztendlich in der Freisetzung von NF- κ B und, nach dessen Translokation in den Nukleus, in der erhöhten Transkription proinflammatorischer Zytokine. Bei der IB3- und der CFTR-korrigierten Zelllinie wurden nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und verschiedenen isolierten Komponenten wie Pilin und Flagellin erhöhte Werte für IL-8 in Zusammenhang mit endogen verstärkt aktiviertem NF- κ B bei den CF-Zellen gemessen (44, 45, 131). Erklärt wird dies anhand von zwei Theorien. Zum einen kommt es aufgrund der Effekte des CFTR auf den intrazellulären pH-Wert zu Veränderungen der Sulfatierung, Sialylierung und Glykosylierung von Membran- und sekretorischen Proteinen (92, 93). Durch die verringerte Sialylierung bei CF stehen u.a. vermehrt Asialoganglioside wie asialoGM1 auf der Zelloberfläche für die Bindung der Bakterien über Pilin zur Verfügung. Diese erhöhte bakterielle Last führt zur exogenen Aktivierung einer Signalkaskade über NF- κ B zu IL-8 (94-96, 132).

Zum anderen kann eine verstärkte Aktivierung endogen durch Zellstress im Zusammenhang mit der Akkumulation von mutiertem CFTR am ER erfolgen (133, 134). Dabei stützt sich diese Theorie auf Untersuchungen an Nicht-Epithelzellen (134) oder Zellkultursystemen, bei denen die gesunden Zelllinien transient entweder mit der R-Domäne des CFTR oder mit antisense-CFTR-Plasmiden transfiziert wurden (133). Im Hinblick auf diese Thematik konnte anhand von immunocytochemischen Färbungen allerdings kein Unterschied in der cytosolischen Akkumulation des CFTR zwischen primären CF- und Nicht-CF-Zellen gefunden werden (99). Außerdem zeigten nukleäre Extrakte von CF-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zwar eine basal erhöhte Aktivierung von NF- κ B, insbesondere der Untereinheit p65 (135). Nach Stimulation mit *P. aeruginosa* waren aber nur eine schwache Induktion der Aktivierung und vor allem ein erhöhtes Level von I κ B α , dem Inhibitor von NF- κ B, bei den CF-Zellen festzustellen. Es kam somit zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der mRNA-Expression von IL-8. Ein Defekt der komplexen und empfindlichen Autoregulation von NF- κ B und I κ B α und eine damit verbundene zeitlich verzögerte Antwort könnten somit eine Erklärung für ausbleibende oder schwache Reaktionen der CF-Zellen liefern, während basal erhöhte Werte für NF- κ B möglicherweise auf andere dysregulierte Mechanismen zurückzuführen sind.

Die zahlreichen Untersuchungen machen deutlich, dass beim Vergleich verschiedener Individuen und Zellkultursysteme untereinander von vornherein große Schwankungen in der Zellantwort auf entzündliche Stimuli bestehen. Oftmals wurden eher nicht-differenzierende Zelllinien mit verschiedenen CFTR-Mutationen verwendet und mögliche zugrunde liegende Mechanismen nicht weiter aufgeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter differenzierenden Zellkulturbedingungen mit verschiedenen Kontrollen ein kompletter Signalweg beschrieben werden. Als Kontrolle diente auf der einen Seite die Δ F508-transfizierte Zelllinie dfCFBE und auf der anderen Seite die normale Bronchialepithel-Zelllinie HBE. In Bezug auf die Sekretion von IL-8 und IL-6 nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und LPS waren die Reaktionen bei CFBE und dfCFBE einerseits sowie corrCFBE und HBE andererseits grundsätzlich ähnlich (vgl. Abb. 11 & 25). In einem weiteren Schritt konnte festgestellt werden, dass die verminderte Zytokin-Sekretion bei den CF-Zellen mit einer verringerten Aktivierung von NF- κ B nach LPS-Stimulation einher ging (vgl. Abb. 16). Die Aspekte der erhöhten Adhärenz von Bakterien sowie der

CFTR-Akkumulation am ER bei CF-Zellen können hier somit ausgeschlossen werden, da korrigierte und normale Zellen stärker auf bakterielle Stimuli reagierten und sich alle Zellen im unstimulierten Niveau der NF- κ B-Aktivierung nicht voneinander unterschieden. Insbesondere dfCFBE-Zellen hätten deutlich höhere Werte der endogenen Aktivierung zeigen müssen, da diese als Transfektionskontrolle sogar drei mutierte Allele des CFTR-Gens aufweisen. Allerdings kann die Aktivierung von NF- κ B ebenso durch Bindung eines Liganden an TLRs ausgelöst werden (40, 49, 50). Hier konnte eindeutig ein TLR-abhängiger Mechanismus nach LPS-Stimulation aufgezeigt werden, da es bei allen Zellen durch gleichzeitige Transfektion von dominant-negativen Versionen der TLR-Adaptermoleküle MyD88 und Mal zur Inhibition kam. Insbesondere Mal P/H konnte effektiv die NF- κ B-Aktivierung blockieren. Die verwendeten Plasmide wurden bereits in ähnlichen Untersuchungen zu CF beschrieben (41). Dabei ist Mal als Adaptermolekül für die Aktivierung von NF- κ B über TLR-2 und TLR-4 in noch größerem Maße als MyD88 von entscheidender Bedeutung, da in MyD88-defizienten Mäusen weiterhin Reaktionen auf Stimuli beobachtet wurden (136, 137). Im vorliegenden Fall konnten weiterführende Untersuchungen insgesamt keinen Unterschied in der mRNA-Expression beider TLRs zeigen (vgl. Abb. 21). Auf der Zelloberfläche war TLR-4 allerdings bei den CF-Zellen deutlich verringert zu finden (vgl. Abb. 22). TLR-2 hingegen war bei allen Zellen auf der Oberfläche mit niedrigeren, aber untereinander ähnlichen Werten nachweisbar. Unterstützt wurden diese Daten zusätzlich durch Messungen an der HBE-Zelllinie, die für TLR-4 ähnliche Werte wie corrCFBE lieferte (vgl. Tab. 4). Bis dato sind wenig umfangreiche Studien zur TLR-Expression bei CF-Zellen durchgeführt worden. Nur in Bezug auf TLR-2 konnte eine leicht erhöhte Transkription bei CF-Zellen festgestellt werden (42). Ein Vergleich zwischen HBE- und CFTE-Zellen ließ keine Unterschiede in der mRNA-Expression der TLRs 1-6 und 9 sowie ihrer Reaktionen auf bakterielle Stimuli erkennen (41). In beiden Studien wurde die Expression der TLRs auf Proteinebene mittels verschiedener Verfahren zwar nachgewiesen, aber nicht quantifiziert. Dabei war TLR-4 eher basolateral, und TLR-2 vorwiegend apikal zu finden. An Bronchialbiopsien konnte ähnlich der hier gefundenen Zellkultur-Daten eine verringerte TLR-4-Expression in Epithelzellen von CF-Patienten verglichen mit Gesunden gefunden werden, während TLR-2 insgesamt ohne Unterschiede, aber auf niedrigerem Niveau als TLR-4 nachweisbar war (138).

Diese Daten decken sich auch mit der hier durchgeführten Immunhistochemie für TLR-4 an humanen Lungenschnitten, da eine starke Färbung der Epithelzellen, allerdings in apikalen Bereichen, bei gesunden Donor-Lungen zu erkennen war (vgl. Abb. 28). Das Gewebe der CF-Patienten hingegen war nur schwach bis gar nicht gefärbt. Die Erkenntnis, dass TLR-4 auf der Oberfläche von CF-Zellen signifikant verringert ist, liefert eine Möglichkeit zur Erklärung aller weiteren funktionellen Daten. Nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und LPS kommt es zu einer verminderten Bindung an TLR-4. Dies resultiert in einer schwächeren Aktivierung von NF- κ B und beeinträchtigt die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6. Neben der gestörten mukoziliären Reinigung und bakteriziden Wirkung der Sekrete aufgrund veränderter Wasser- und Salzgehalte (27, 57, 63, 64) könnte dies zusätzlich eine frühzeitige Infektion und bakterielle Besiedlung der CF-Lunge begünstigen.

In den durchgeführten Experimenten sollte der lebende Keim ein großes Repertoire an TLRs stimulieren. Die Verwendung von hitzeinaktiviertem *P. aeruginosa* sollte zusätzlich einen möglichen Einfluss des TLR-9, der als Rezeptor für CpG-Motive bakterieller DNA fungiert (49), im Entzündungsgeschehen aufklären. Da die relativen Unterschiede aber bei allen drei Varianten in gleichem Maße sichtbar waren, konnte eine Beeinträchtigung anderer TLRs weitgehend ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 11). Die spezifische Bindung von LPS, insbesondere des hier verwendeten aus *Salmonella enterica* sv. Arizona, an TLR-4 ist in der Literatur belegt (117, 139). Anhand der Versuche zur Inhibition der LPS-stimulierten Immunreaktion mittels eines blockierenden Antikörpers sowie siRNA gegen TLR-4 konnte dies hier ebenso bestätigt werden. Passend zu den Daten der Oberflächenexpression von TLR-4 war die Inhibition der LPS-stimulierten IL-8-Sekretion nur bei den korrigierten CF-Zellen effektiv (vgl. Abb. 17). Es war entweder nicht möglich, den gesamten Anteil der an der Signaltransduktion beteiligten Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu blockieren, oder diese waren bei den CF-Zellen nicht bzw. nur schwach an der Immunreaktion beteiligt. Dabei sind die Lokalisation des TLR-4 und damit die Art und Weise seiner Aktivierung in Epithelzellen weiterhin umstritten. Der Ansicht einer Expression auf der Zelloberfläche (41, 140) steht die Theorie einer intrazellulären Lokalisation gegenüber, die sich auf Untersuchungen an Alveolar- sowie intestinalen Epithelzelllinien stützt (141, 142). In diesem Zusammenhang konnte die hier

durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung aufzeigen, dass TLR-4 oder Komponenten des Rezeptors bei CF-Zellen verstärkt intrazellulär vorlagen (vgl. Abb. 23). Durch Transfektion von siRNA konnte TLR-4 bei allen Zellen bereits auf dem Niveau der mRNA-Expression inhibiert werden (vgl. Abb. 19). Entsprechende Effekte der siRNA in Bezug auf Knockdown und Silencing spezifischer Zielgene sind in der Literatur beschrieben (111). Dabei wird ein sogenannter RNA-induced silencing complex gebildet, der die korrespondierende mRNA bindet und somit deren Degradation durch RNasen einleitet. Außerdem bewirkte die Transfektion im vorliegenden Fall bei CFBE und corrCFBE eine signifikante Abnahme der Oberflächenexpression von TLR-4 (vgl. Abb. 24). Dieser effektive Eingriff in den TLR-4-Signalweg führte bei allen Zellen zu einer deutlich verringerten Sekretion von IL-8 nach LPS-Stimulation (vgl. Abb. 20). Es ist somit möglich, dass LPS in den CF-Zellen weniger an TLR-4 auf der Zelloberfläche bindet, sondern den Rezeptor auf andere Weise intrazellulär und dadurch schwächer oder zeitlich verzögert aktivieren kann. Durch siRNA-Transfektion konnte dieser Mechanismus noch zusätzlich geschwächt werden.

Bei den CF-Zellen war die geschwächte Reaktionsfähigkeit auf bakterielle Stimuli auch für ein weiteres chemotaktisches Zytokin, und zwar IP-10, festzustellen. IP-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T_H1 -Zellen zum Ort der Entzündung und ist somit für die Initiierung der zellvermittelten adaptiven Immunantwort von Bedeutung (115). Die Induktion von IP-10 durch LPS erfolgt dabei ebenso über TLR-4, aber über den MyD88-unabhängigen Weg unter Verwendung der Adapterproteine TRIF und TRAM bis zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (143, 144). CF-Zellen reagierten nicht auf die Stimulation mit LPS, während die korrigierten Zellen einen ca. dreifachen Anstieg der IP-10-Sekretion zeigten, ähnlich wie bei IL-8 und IL-6 (vgl. Abb. 15). Auch die Positivkontrolle Poly(I:C), die als synthetisches Analogon zu viraler doppelsträngiger RNA die IRF-regulierte Expression über TLR-3 aktiviert (48, 116), führte bei den korrigierten Zellen zu einer höheren Sekretion als bei den CF-Zellen. Diese Daten sind als bedeutend einzustufen, da keine weiteren Informationen zur Aktivierung dieses Signalwegs bei CF vorliegen. Lediglich aus Untersuchungen zum chemotaktischen Zytokin RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted, auch CCL5) wurde geschlossen, dass der Mechanismus der IRF-regulierten Expression von Interferonen, IP-10 und RANTES bei CF-Zellen

möglicherweise beeinträchtigt ist (129, 145, 146). Dies könnte neben der verringerten Oberflächenexpression von TLR-4 und vor allem im Hinblick auf Poly(I:C) eine weitere Erklärung für die beobachtete schwächere Reaktion der CF-Zellen liefern. Entgegen der Ergebnisse für IL-8 und IL-6 war das unstimulierte Niveau der IP-10-Sekretion allerdings bei den CF-Zellen zweifach erhöht. Hier kann ausschließlich vermutet werden, dass die basale Sekretion von Zytokinen einer komplexeren Regulation unterworfen ist und im vorliegenden Fall nicht mit der Veränderung des TLR-4-Signalwegs assoziiert ist.

Die Reaktion der Zellen auf Stimulation mit Gram-positiven Bakterien und LTA deckt sich mit der niedrigen und nicht unterschiedlichen Oberflächenexpression von TLR-2. Sowohl bei lebendem als auch hitzeinaktiviertem *S. aureus* war die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine in allen Zellen ähnlich (vgl. Abb. 11 B). Obwohl das hier verwendete LTA aus *S. aureus* humane Immunzellen über TLR-2 aktivieren konnte (110), führte die Stimulation mit dem reinen Zellwandbestandteil hier zu keiner Immunreaktion der Zellen (vgl. Abb. 14 & 25). Das Verhalten wurde durch Ausbleiben einer Reaktion auf Peptidoglycan als spezifisch für die Behandlung mit TLR-2-Liganden bestätigt. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei anderen Untersuchungen an gesunden Zellen erzielt werden (140, 147, 148). Hierbei wurde TLR-2 zwar ebenso funktionell und im Vergleich zu TLR-4 auf niedrigerem Niveau nachgewiesen. Die Reaktionsfähigkeit auf TLR-2-spezifische mikrobielle Strukturen war aber generell schwach oder nicht vorhanden, da der Rezeptor selber schwach exprimiert wurde und der Co-Rezeptor CD36 fehlte. Außerdem spiegelten mRNA-Daten das Verhältnis von TLR-2 zu TLR-4 auf Protein-Ebene nicht wider, so dass möglicherweise posttranskriptionale Mechanismen für die Regulation von TLR-2 verantwortlich sein könnten. Dies kann, wie auch bei den Daten einer intrazellulären Lokalisation von TLR-4, als Indiz für die Fähigkeit des Epithels gewertet werden, die eigene Sensitivität in einem Milieu permanenter mikrobieller Belastung durch Veränderungen der Rezeptorexpression zu regulieren und anzupassen. Andererseits könnte die Ursache dieser Modifikation im Zusammenhang mit CF ebenso in verschiedenen Defekten liegen.

4.3 Mögliche Ursachen der verringerten TLR-4-Oberflächenexpression.

Auf funktioneller Ebene war die verringerte NF- κ B-Aktivierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine bzw. die geschwächte Reaktionsfähigkeit von CF-Zellen mit der reduzierten Verfügbarkeit von TLR-4 auf der Zelloberfläche assoziiert. Diese Daten gingen allerdings nicht mit einer Hochregulation der mRNA-Expression von TLR-4 bei den korrigierten CF-Zellen einher (vgl. Abb. 21). Vielmehr kam es in den CF-Zellen zu einer Akkumulation von Rezeptoren oder Rezeptorkomponenten (vgl. Abb. 23), obwohl auf mRNA-Ebene sogar die Expression der erforderlichen Co-Rezeptoren CD14 und MD-2 nachgewiesen werden konnte. Dabei war die durchgeführte Färbung der Zellen mittels Immunfluoreszenz als verlässlich anzusehen, da die Permeabilisierung der Zellmembran keinen Einfluss auf die spezifische Bindung des Antikörpers hatte.

Die intrazelluläre Lokalisation des Rezeptors oder von Rezeptorkomponenten und die damit verbundene verringerte Oberflächenexpression könnten verschiedene Ursachen haben. Bei CF werden mutierte Formen des CFTR-Proteins aufgrund ihrer leicht veränderten Struktur am ER als fehlgefaltet erkannt und dem Abbau zugeführt (10, 12, 15, 16). Im Falle des Δ F508-Proteins sind annähernd 100% von der Degradation betroffen. Die molekularen Komponenten dieser offenbar strikt angewendeten Qualitätskontrolle könnten ebenso andere abnormale oder veränderte Membran- und sekretorische Proteine angreifen, die somit zusammen mit CFTR als Substrat für das Proteasom dienen (11, 149). Davon könnten bei CF TLR-4 und weitere Komponenten betroffen sein, sofern sie eine veränderte Struktur aufweisen. Möglicherweise gehen Mutationen des CFTR-Gens mit Mutationen oder Polymorphismen anderer Gene einher, die für Entzündungsprozesse relevant sind (9, 61, 150). Dabei werden z.B. TLR-4-Polymorphismen vor allem mit einer verringerten Reaktionsfähigkeit auf eine Stimulation mit LPS in Verbindung gebracht (62, 151). Splice-Varianten des TLR-4 könnten in verschiedenen Translationsprodukten resultieren, die letztendlich nicht in die Zellmembran eingebaut, sondern degradiert werden (152).

Es ist aber davon auszugehen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vitro*-Korrektur des mutierten CFTR-Gens nicht zur Korrektur eventuell gekoppelter Mutationen oder Polymorphismen führt. Somit sind möglicherweise sekundäre Veränderungen aufgrund der fehlenden CFTR-Funktion für die verringerte Oberflächenexpression und intrazelluläre Lokalisation des TLR-4 verantwortlich.

Dieser Aspekt wurde ebenso bei der Studie an Bronchialbiopsien als Erklärung für die reduzierte TLR-4-Expression im Epithel von CF-Patienten verglichen mit Gesunden angebracht (138). Der Verlust der CFTR-Funktion verursacht einen erhöhten intrazellulären pH-Wert, insbesondere von Organellen wie dem Golgi-Apparat (92). Dies hat wiederum zur Folge, dass es zu Veränderungen posttranslationaler Modifikationen wie Sulfatierung, Sialylierung und Glykosylierung von Membran- und sekretorischen Proteinen kommt und damit letztendlich deren Lokalisation beeinflusst werden kann. Beim TLR-4 sind verschiedene Glykosylierungsgrade des Proteins bekannt (153). Ähnlich dem CFTR wird aber nur die vollständig glykosylierte Form des funktionellen TLR-4 in die Zellmembran eingebaut, während andere Varianten intrazellulär verbleiben. Des Weiteren erfordert ein funktioneller TLR-4 die Anwesenheit der Co-Rezeptoren CD14 und MD-2 (48, 51). Hierbei scheint MD-2 für die vollständige Glykosylierung von TLR-4 unerlässlich zu sein und ist somit im Komplex mit TLR-4 an der Zelloberfläche zu finden (153). CD14 hingegen kann sowohl gelöst (solubleCD14) als auch über Glykosylphosphatidylinositol in der Membran verankert (GPI-anchored CD14) vorliegen und erleichtert durch Bindung an LPS die Signalübertragung an TLR-4 (117, 154). Da die mRNA-Expression dieser Co-Rezeptoren jedoch, ähnlich der Daten für TLR-4, keine Unterschiede zwischen den Zellen aufzeigte (vgl. Abb. 21), könnten CD14 und MD-2 möglicherweise auf Proteinebene eine veränderte Expression erkennen lassen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Ebenso hätte ein Western Blot für die Proteine des Rezeptorkomplexes u.a. über verschiedene Glykosylierungsgrade aufklären können. Dennoch war eine Rekrutierung des Rezeptors anhand der Zunahme der Oberflächenexpression 24 h nach LPS-Stimulation auch bei den CF-Zellen zu erkennen (vgl. Abb. 24). Hier schien der Rezeptor somit in gewissem Umfang vollständig glykosyliert in der Zelle vorzuliegen und konnte auf einen Stimulus hin in die Membran eingebaut werden, ähnlich wie bei Monozyten (117). Passend zu den möglichen sekundären Veränderungen konnten Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien den Golgi-Apparat als Kompartiment einer grundsätzlich eher intrazellulären Lokalisation des TLR-4 bestimmen (141, 155, 156). Hier stehen sich allerdings verschiedene Theorien der Aktivierung von TLR-4 durch LPS gegenüber. Einerseits wurde beobachtet, dass die Stimulation mit LPS zu einer rapiden Rekrutierung von TLR-4 und dem Komplex aus TLR-4-CD14-MD-2 zur Zelloberfläche führt. Andererseits

war ebenso eine Internalisierung des LPS anhand Co-Lokalisation mit TLR-4 am Golgi-Apparat festzustellen. Gerade eine strikt intrazelluläre Lokalisation von TLR-4 setzt den Prozess der Internalisierung des entsprechenden Liganden, also von LPS, voraus. Die Internalisierung erfolgt dabei über verschiedene endocytotische Vorgänge, zumeist CD14-abhängig (141, 157). Auch CFTR scheint als Rezeptor für die Erkennung und Aufnahme von LPS aus *P. aeruginosa* zu fungieren (90, 91, 124). In diesem Prozess wird LPS nicht nur durch CFTR erkannt und gebunden, sondern ebenso aus der äußeren Membran der Bakterien extrahiert und endocytiert. Darauf folgt die Aktivierung von NF- κ B und dessen Translokation in den Nukleus. Bei CF verursacht das Fehlen des CFTR somit zusätzlich eine verringerte spezifische Bindung der Pathogene und damit verbunden eine schwächere Immunantwort.

4.4 Die indirekte Aktivierung von MAPKs und Mucinen.

Als größte makromolekulare Bestandteile bestimmen die Mucine maßgebend die rheologischen und physikalischen Eigenschaften der Atemwegssekrete und damit die Effektivität der mukoziliären Reinigung (69). Bei CF sind Mutationen oder der Funktionsverlust des CFTR möglicherweise mit Veränderungen des Mucin-Gehalts in den Sekreten assoziiert und tragen auf diese Weise zu bakterieller Besiedlung, Infektion und Entzündung bei (66). Entgegen der allgemeinen Annahme, dass Mucine im Sputum von CF-Patienten aufgrund der chronischen Entzündungsprozesse deutlich erhöht sein müssen, konnten zwei Studien eine signifikante Reduzierung des Gehalts von MUC5AC und MUC5B im Vergleich zu gesundem Mucus, aber ebenso einen starken Anstieg während einer Exazerbation zeigen (88, 89). Dabei sind die Ursachen dieser kontrovers diskutierten Beobachtungen weiterhin unklar. *In vitro*-Untersuchungen zur mRNA Expression und Sekretion von Mucinen in gesunden und CF-Zellen lieferten zumeist widersprüchliche oder nicht aussagekräftige Ergebnisse (71). Auch ist die Regulation der Transkription, Synthese und Sekretion von Mucinen komplex und unterliegt verschiedenen Mechanismen. Vor allem Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β) und bakterielle Komponenten (u.a. LPS, LTA) sind in der Lage, an spezifische Rezeptoren wie TLRs auf der Zellmembran zu binden. Auf direkte oder indirekte Weise werden anschließend MAPK-Signalwege aktiviert, die letztendlich auch in der Hochregulation der Mucin-Transkription resultieren (82). Anhand des im

Rahmen dieser Arbeit etablierten Zellkultur-Modells sollte somit überprüft werden, inwiefern die CFTR-abhängigen Veränderungen des TLR-4-Signalwegs bei CF ebenso Auswirkungen auf den MAPK-Signalweg und damit auf die Transkription der Mucine MUC5AC und MUC5B haben.

Der Western Blot für verschiedene MAP-Kinasen konnte in allen Zellen eine Aktivierung der MEK1/2 unter sowohl basalen als auch LPS-stimulierten Bedingungen nachweisen (vgl. Abb. 26). Dabei erfolgt die Aktivierung des klassischen MAPK-Signalwegs in der Regel durch Wachstumsfaktoren, die Rezeptorkinasen wie EGFR (epidermal growth factor receptor) phosphorylieren. Nach Dimerisierung, Phosphorylierung und Aktivierung über die Adapterproteine RAS und RAF sowie die MEK1/2 akkumuliert letztlich ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase) im Nucleus. Als Hauptregulator der Zellproliferation bewirkt ERK1/2 nicht nur die Aktivierung zellulärer, sondern auch nukleärer Substrate wie c-Myc (cellular myelocytomatosis), STAT (signal transducer and activator of transcription)-3 und zytoskeletalen Proteinen. Demgegenüber wird die Phosphorylierung von JNK und p38 eher durch Stress und Entzündungsprozesse freigesetzte Zytokine ausgelöst. Im Falle von JNK erfolgt die Aktivierung über MKK4/7. Neben weiteren Transkriptionsfaktoren ist c-Jun ein bekanntes Substrat für JNK. p38 wird zusätzlich, aber nicht nennenswert aufgrund mitogener Stimuli phosphoryliert. Dabei ist MKK3/6 sehr spezifisch für p38 und aktiviert weder ERK1/2 noch JNK. Zu den Substraten von p38 zählen verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B (158, 159). Im vorliegenden Fall war eine LPS-bedingte Phosphorylierung von JNK und p38 allerdings nicht festzustellen. Passend dazu war somit keine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von MUC5AC und MUC5B nach LPS-Stimulation zu erkennen (vgl. Abb. 27). Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Untersuchungen an Epithelzellen, bei denen eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 sowie der Transkription des Mucins MUC2 nur durch Bindung von intaktem *P. aeruginosa* und *S. aureus* an das Glykolipid asialoGM1 auf der Zelloberfläche erfolgte (132, 160). Reines LPS hingegen konnte diesen Signalweg nicht induzieren. Zusätzlich ist ein Einfluss von *P. aeruginosa* oder LPS auf die Transkription der hier untersuchten Mucine nur für MUC5AC und ausschließlich bei der mukoepidermoiden Lungenkarzinom-Zelllinie H292 beschrieben (161). Durch Stimulation mit LPS erfolgte somit keine indirekte und im Falle der CF-Zellen beeinträchtigte Aktivierung des MAPK-Signalwegs

sowie der Mucin-Transkription über den TLR-4-Signalweg, die als Erklärung für die Reduzierung des Mucin-Gehalts in Sekreten von CF-Patienten dienen könnte (88, 89). Des Weiteren lässt die im basalen Zustand ähnliche mRNA-Expression der Mucine bei CF- und CFTR-korrigierten Zellen vermuten, dass mögliche Veränderungen des Mucin-Gehalts nicht direkt mit der CFTR-Mutation einhergehen. Hierbei ist denkbar, dass es wie bei der TLR-4-Produktion vielmehr sekundär zu krankheitsbedingten Veränderungen der Synthese oder Sekretion von Mucinen kommt und möglicherweise auch andere Komponenten oder Faktoren die Funktionalität der Sekrete und damit die Effektivität der mukoziliären Reinigung beeinflussen (162). Anhand dieses Zellkulturmodells könnten Untersuchungen der Mucine und anderer Parameter auf Protein-Ebene weitere Erkenntnisse liefern.

5 Zusammenfassung

Mutationen des Gens für den *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), einem cAMP-regulierten Chlorid-Kanal in der apikalen Membran von Epithelzellen sekretorischer Organe, führen zur klinischen Manifestation der letal verlaufenden Erbkrankheit Cystische Fibrose (CF). Diese ist gekennzeichnet durch eine frühe von Neutrophilen dominierte chronische Entzündung der Lunge mit letztlich permanenter bakterieller Besiedlung, vor allem mit *Pseudomonas aeruginosa*. Dabei lassen die Mutation und der Funktionsverlust des CFTR eine intrinsisch dysregulierte Immunantwort bei CF vermuten. *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zur Expression von Komponenten der angeborenen Immunabwehr, wie Toll-like Rezeptoren (TLRs) und proinflammatorische Zytokine, liefern widersprüchliche oder nicht aussagekräftige Ergebnisse, insbesondere aufgrund des Fehlens geeigneter Kontrollen. Somit ist weiterhin unklar, ob Immunreaktionen bei CF beeinträchtigt oder bereits frühzeitig übermäßig stark aktiviert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einem Zellkulturmodell der bronchialen CF-Epithelzelllinie CFBE und der CFTR-korrigierten Kontrolle gezeigt werden, dass die durch Signaltransduktion über TLR-4 vermittelte Immunreaktion nach Stimulation mit dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* und dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS bei CF-Zellen beeinträchtigt war. Die CFTR-korrigierten Zellen waren in der Lage, durch dreifache Steigerung der Sekretion von IL-8, IL-6 und IP-10 stärker auf Stimuli von *P. aeruginosa* zu reagieren als CF-Zellen. Dabei handelt es sich in Bezug auf das Chemokin IP-10, das durch Rekrutierung von T_H1-Zellen adaptive Immunität vermittelt, um die ersten ausführlichen Daten, die eine Sekretion bei CF-Zellen beschreiben. Die Ursache der geschwächten Reaktionsfähigkeit bei CF lag in der verringerten Oberflächenexpression von TLR-4, die in einer reduzierten Bindung bakterieller Komponenten und damit in einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB resultierte. Die verringerte Oberflächenexpression von TLR-4 ging allerdings nicht mit einer reduzierten mRNA-Expression einher. Vielmehr lagen der Rezeptor oder seine Vorstufen bei CF-Zellen vermehrt intrazellulär vor. Dies ist vermutlich auf Veränderungen im Zusammenhang mit dem Funktionsverlust des CFTR zurückzuführen. Hierbei kommt es zu einem erhöhten intrazellulären pH-Wert, der

die Aktivität und Effektivität posttranslationaler Modifikationen wie die Glykosylierung von Membranproteinen beeinträchtigt. Das verringerte Vorliegen von maturem TLR-4 oder erforderlichen Co-Rezeptoren könnte einen reduzierten Einbau in die Zellmembran bedeuten. Des Weiteren erfolgte über TLR-4 keine indirekte und im Falle der CF-Zellen beeinträchtigte Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie der Transkription der Mucine MUC5AC und MUC5B. Da diese maßgebend die rheologischen und physikalischen Eigenschaften der Atemwegssekrete und damit die Effektivität der mukoziliären Reinigung bestimmen, wird ein veränderter Mucin-Gehalt bei CF mit dem Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht. Die geschwächte TLR-4-vermittelte Immunantwort konnte allerdings nicht als Erklärung für mögliche Veränderungen des Mucin-Gehalts in Sekreten von CF-Patienten dienen.

Zusammenfassend unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die Ansicht eines durch den Funktionsverlust des CFTR verursachten Krankheitsbildes bei CF. Die Veränderungen des TLR-4-Signalwegs könnten eine effektive Pathogenabwehr durch sowohl angeborene als auch adaptive Immunität nachhaltig beeinflussen und auf diese Weise eine frühzeitige Infektion und bakterielle Besiedlung der CF-Lunge begünstigen. Im Hinblick auf umstrittene gentherapeutische Ansätze müsste eine Korrektur der Mutation somit frühzeitig erfolgen, um der Manifestation sekundärer Veränderungen vorzubeugen. Da die Risiken eines solchen Verfahrens aber bis heute nicht abzuschätzen sind, müssen im Rahmen herkömmlicher Strategien weiterhin die Behandlung der verschiedenen Symptome und die stete Verbesserung bzw. Entwicklung von Medikamenten unter Berücksichtigung neuer Forschungsergebnisse im Vordergrund stehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Welsh, M. J., B. W. Ramsey, F. J. Accurso, and G. R. Cutting 2001. Cystic fibrosis. In C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, editors *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8 ed. McGraw-Hill, New York. 5121-5188.
2. Heijerman, H. 2005. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *J.Cyst.Fibros.* 4 Suppl 2:3-5.
3. Aitken, M. L. 1995. Cystic fibrosis. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 1:425-434.
4. Davis, P. B. 2006. Cystic fibrosis since 1938. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 173:475-482.
5. Rommens, J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, and . 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065.
6. Sheppard, D. N. and M. J. Welsh. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 79:S23-S45.
7. Augarten, A., B. S. Kerem, Y. Yahav, S. Noiman, Y. Rivlin, A. Tal, H. Blau, L. Ben-Tur, A. Szeinberg, E. Kerem, and . 1993. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849 + 10 kb C-->T mutation. *Lancet* 342:25-26.
8. Zielenski, J. 2000. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67:117-133.
9. Southern, K. W. 2007. Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease. *Respiration* 74:241-251.
10. Cheng, S. H., R. J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D. W. Souza, G. A. White, C. R. O'Riordan, and A. E. Smith. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63:827-834.
11. Jensen, T. J., M. A. Loo, S. Pind, D. B. Williams, A. L. Goldberg, and J. R. Riordan. 1995. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83:129-135.
12. Ward, C. L., S. Omura, and R. R. Kopito. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83:121-127.
13. Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L. C. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-1080.

14. Lukacs, G. L., A. Mohamed, N. Kartner, X. B. Chang, J. R. Riordan, and S. Grinstein. 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 13:6076-6086.
15. Kopito, R. R. 1999. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev.* 79:S167-S173.
16. Du, K., M. Sharma, and G. L. Lukacs. 2005. The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 12:17-25.
17. Denning, G. M., M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith, and M. J. Welsh. 1992. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358:761-764.
18. Sato, S., C. L. Ward, M. E. Krouse, J. J. Wine, and R. R. Kopito. 1996. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J.Biol.Chem.* 271:635-638.
19. Rubenstein, R. C., M. E. Egan, and P. L. Zeitlin. 1997. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J.Clin.Invest* 100:2457-2465.
20. Sharma, M., M. Benharouga, W. Hu, and G. L. Lukacs. 2001. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J.Biol.Chem.* 276:8942-8950.
21. Gentzsch, M., X. B. Chang, L. Cui, Y. Wu, V. V. Ozols, A. Choudhury, R. E. Pagano, and J. R. Riordan. 2004. Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol.Biol.Cell* 15:2684-2696.
22. Dalemans, W., P. Barbry, G. Champigny, S. Jallat, K. Dott, D. Dreyer, R. G. Crystal, A. Pavirani, J. P. Lecocq, and M. Lazdunski. 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354:526-528.
23. Haws, C. M., I. B. Nepomuceno, M. E. Krouse, H. Wakelee, T. Law, Y. Xia, H. Nguyen, and J. J. Wine. 1996. Delta F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. *Am.J.Physiol* 270:C1544-C1555.
24. Quinton, P. M. 1990. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *FASEB J.* 4:2709-2717.
25. Boucher, R. C., M. J. Stutts, M. R. Knowles, L. Cantley, and J. T. Gatzky. 1986. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J.Clin.Invest* 78:1245-1252.

26. Boucher, R. C., C. U. Cotton, J. T. Gatzky, M. R. Knowles, and J. R. Yankaskas. 1988. Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J.Physiol* 405:77-103.
27. Stutts, M. J., C. M. Canessa, J. C. Olsen, M. Hamrick, J. A. Cohn, B. C. Rossier, and R. C. Boucher. 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269:847-850.
28. Davis, P. B. 2001. Cystic fibrosis. *Pediatr.Rev.* 22:257-264.
29. Knowles, M. R., K. N. Olivier, K. W. Hohneker, J. Robinson, W. D. Bennett, and R. C. Boucher. 1995. Pharmacologic treatment of abnormal ion transport in the airway epithelium in cystic fibrosis. *Chest* 107:71S-76S.
30. Rosenstein, B. J. and G. R. Cutting. 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J.Pediatr.* 132:589-595.
31. Rosenstein, B. J. 1998. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin.Chest Med.* 19:423-41, v.
32. Weibel, E. R., P. H. Burri, and J. Gil 1977. The ultrastructure and morphometry of the human lung. In T. W. Shields, editor General Thoracic Surgery Lea and Febiger, Philadelphia. 21-54.
33. Weibel, E. R. 1980. Design and structure of the human lung. In A. P. Fishman, editor Pulmonary Diseases and Disorders McGraw-Hill, New York. 224-271.
34. Diamond, G., D. Legarda, and L. K. Ryan. 2000. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol.Rev.* 173:27-38.
35. Jacquot, J., A. Hayem, and C. Galabert. 1992. Functions of proteins and lipids in airway secretions. *Eur.Respir.J.* 5:343-358.
36. Lillehoj, E. R. and K. C. Kim. 2002. Airway mucus: its components and function. *Arch.Pharm.Res.* 25:770-780.
37. Fujiwara, N. and K. Kobayashi. 2005. Macrophages in inflammation. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 4:281-286.
38. Curtis, J. L. 2005. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:412-416.
39. Luster, A. D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N.Engl.J.Med.* 338:436-445.
40. Dunne, A. and L. A. O'Neill. 2003. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci.STKE.* 2003:re3.

41. Greene, C. M., T. P. Carroll, S. G. Smith, C. C. Taggart, J. Devaney, S. Griffin, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney. 2005. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J.Immunol.* 174:1638-1646.
42. Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M. I. Gomez, H. A. Van, and A. Prince. 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 30:777-783.
43. Kube, D., U. Sontich, D. Fletcher, and P. B. Davis. 2001. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 280:L493-L502.
44. DiMango, E., H. J. Zar, R. Bryan, and A. Prince. 1995. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J.Clin.Invest* 96:2204-2210.
45. Stecenko, A. A., G. King, K. Torii, R. M. Breyer, R. Dworski, T. S. Blackwell, J. W. Christman, and K. L. Brigham. 2001. Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Inflammation* 25:145-155.
46. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
47. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
48. Carpenter, S. and L. A. O'Neill. 2007. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol.* 9:1891-1901.
49. Liew, F. Y., D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O'Neill. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* 5:446-458.
50. O'Neill, L. A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr.Opin.Immunol.* 18:3-9.
51. da Silva, C. J., K. Soldau, U. Christen, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J.Biol.Chem.* 276:21129-21135.
52. Chow, C. W., L. I. Landau, and L. M. Taussig. 1982. Bronchial mucous glands in the newborn with cystic fibrosis. *Eur.J.Pediatr.* 139:240-243.
53. Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso, and D. W. Riches. 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 151:1075-1082.

54. Armstrong, D. S., K. Grimwood, J. B. Carlin, R. Carzino, J. P. Gutierrez, J. Hull, A. Olinsky, E. M. Phelan, C. F. Robertson, and P. D. Phelan. 1997. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1197-1204.
55. Meyer, K. C. and A. Sharma. 1997. Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1536-1540.
56. Gutierrez, J. P., K. Grimwood, D. S. Armstrong, J. B. Carlin, R. Carzino, A. Olinsky, C. F. Robertson, and P. D. Phelan. 2001. Interlobar differences in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Eur.Respir.J.* 17:281-286.
57. Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh. 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85:229-236.
58. Bonfield, T. L., J. R. Panuska, M. W. Konstan, K. A. Hilliard, J. B. Hilliard, H. Ghnaim, and M. Berger. 1995. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152:2111-2118.
59. Bonfield, T. L., M. W. Konstan, P. Burfeind, J. R. Panuska, J. B. Hilliard, and M. Berger. 1995. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13:257-261.
60. Starosta, V., F. Ratjen, E. Rietschel, K. Paul, and M. Griese. 2006. Anti-inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung disease. *Eur.Respir.J.* 28:581-587.
61. Devaney, J., M. Maher, T. Smith, J. A. Houghton, and M. Glennon. 2003. HFE alleles in an Irish cystic fibrosis population. *Genet.Test.* 7:155-158.
62. Urquhart, D. S., J. Allen, M. Elrayess, K. Fidler, N. Klein, and A. Jaffe. 2006. Modifier effect of the Toll-like receptor 4 D299G polymorphism in children with cystic fibrosis. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 54:271-276.
63. Zabner, J., J. J. Smith, P. H. Karp, J. H. Widdicombe, and M. J. Welsh. 1998. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol.Cell* 2:397-403.
64. Matsui, H., B. R. Grubb, R. Tarran, S. H. Randell, J. T. Gatzky, C. W. Davis, and R. C. Boucher. 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95:1005-1015.
65. Boat, T. F., P. W. Cheng, and M. W. Leigh 1994. Biochemistry of mucus. In T. Takishima and S. Shimura, editors *Airway Secretion. Lung Biology in Health and Disease* Marcel Dekker, New York. 217-282.

66. Puchelle, E., B. S. de, and J. M. Zahm. 1995. Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches. *Respiration* 62 Suppl 1:2-12.
67. Puchelle, E., J. M. Zahm, S. de Bentzmann, and D. Gaillard 1997. Mucus and airway epithelium alterations in cystic fibrosis. In D. F. Rogers and M. I. Lethem, editors *Airway Mucus: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives* Birkhaeuser Publishing Limited, Basel, Switzerland. 301-326.
68. Widdicombe, J. G. 1997. Airway surface liquid: concepts and measurements. In D. F. Rogers and M. I. Lethem, editors *Airway Mucus: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives* Birkhaeuser Publishing Limited, Basel, Switzerland. 1-18.
69. Thornton, D. J., J. R. Davies, I. Carlstedt, and J. K. Sheehan 1997. Structure and biochemistry of human respiratory mucins. In D. F. Rogers and M. I. Lethem, editors *Airway Mucus: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives* Birkhaeuser Publishing Limited, Basel, Switzerland. 19-40.
70. Gendler, S. J. and A. P. Spicer. 1995. Epithelial mucin genes. *Annu.Rev.Physiol* 57:607-634.
71. Rose, M. C. and J. A. Voynow. 2006. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 86:245-278.
72. Rose, M. C. and S. J. Gendler 1997. Airway mucin genes and gene products. In D. F. Rogers and M. I. Lethem, editors *Airway Mucus: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives* Birkhaeuser Publishing Limited, Basel, Switzerland. 41-66.
73. Voynow, J. A., S. J. Gendler, and M. C. Rose. 2006. Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 34:661-665.
74. Hovenberg, H. W., J. R. Davies, and I. Carlstedt. 1996. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem.J.* 318 (Pt 1):319-324.
75. Wickstrom, C., J. R. Davies, G. V. Eriksen, E. C. Veerman, and I. Carlstedt. 1998. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem.J.* 334 (Pt 3):685-693.
76. Williams, O. W., A. Sharafkhaneh, V. Kim, B. F. Dickey, and C. M. Evans. 2006. Airway mucus: From production to secretion. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 34:527-536.
77. Davis, C. W. 2002. Regulation of mucin secretion from in vitro cellular models. *Novartis.Found.Symp.* 248:113-125.

78. Verdugo, P. 1991. Mucin exocytosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 144:S33-S37.
79. Levine, S. J., P. Larivee, C. Logun, C. W. Angus, F. P. Ognibene, and J. H. Shelhamer. 1995. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12:196-204.
80. Neutra, M. R. and J. F. Forstner 1987. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. In L. R. Johnson, editor *Physiology of the Gastrointestinal Tract* Raven Press, New York. 975-1009.
81. Adler, K. B. and Y. Li. 2001. Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 25:397-400.
82. Basbaum, C., H. Lemjabbar, M. Longphre, D. Li, E. Gensch, and N. McNamara. 1999. Control of mucin transcription by diverse injury-induced signaling pathways. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:S44-S48.
83. Lemjabbar, H. and C. Basbaum. 2002. Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat.Med.* 8:41-46.
84. Song, K. S., W. J. Lee, K. C. Chung, J. S. Koo, E. J. Yang, J. Y. Choi, and J. H. Yoon. 2003. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 278:23243-23250.
85. Rose, M. C., F. M. Piazza, Y. A. Chen, M. Z. Alimam, M. V. Bautista, N. Letwin, and B. Rajput. 2000. Model systems for investigating mucin gene expression in airway diseases. *J.Aerosol Med.* 13:245-261.
86. Kirkham, S., J. K. Sheehan, D. Knight, P. S. Richardson, and D. J. Thornton. 2002. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem.J.* 361:537-546.
87. Rosenfeld, M., J. Emerson, J. Williams-Warren, M. Pepe, A. Smith, A. B. Montgomery, and B. Ramsey. 2001. Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J.Pediatr.* 139:359-365.
88. Henke, M. O., A. Renner, R. M. Huber, M. C. Seeds, and B. K. Rubin. 2004. MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31:86-91.
89. Henke, M. O., G. John, M. Germann, H. Lindemann, and B. K. Rubin. 2007. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 175:816-821.

90. Pier, G. B., M. Grout, T. S. Zaidi, J. C. Olsen, L. G. Johnson, J. R. Yankaskas, and J. B. Goldberg. 1996. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271:64-67.
91. Pier, G. B., M. Grout, and T. S. Zaidi. 1997. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:12088-12093.
92. Barasch, J., B. Kiss, A. Prince, L. Saiman, D. Gruenert, and Q. Al-Awqati. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352:70-73.
93. Cheng, P. W., T. F. Boat, K. Cranfill, J. R. Yankaskas, and R. C. Boucher. 1989. Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J.Clin.Invest* 84:68-72.
94. Saiman, L. and A. Prince. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J.Clin.Invest* 92:1875-1880.
95. Imundo, L., J. Barasch, A. Prince, and Q. Al-Awqati. 1995. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:3019-3023.
96. de, B. S., P. Roger, F. Dupuit, O. Bajolet-Laudinat, C. Fuchey, M. C. Plotkowski, and E. Puchelle. 1996. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect.Immun.* 64:1582-1588.
97. Chmiel, J. F. and P. B. Davis. 2003. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir.Res.* 4:8.
98. Shuto, T., T. Furuta, M. Oba, H. Xu, J. D. Li, J. Cheung, D. C. Gruenert, A. Uehara, M. A. Suico, T. Okiyoneda, and H. Kai. 2006. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J.* 20:782-784.
99. Carrabino, S., D. Carpani, A. Livraghi, C. M. Di, D. Costantini, E. Copreni, C. Colombo, and M. Conese. 2006. Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J.Cyst.Fibros.* 5:113-119.
100. Massengale, A. R., F. Quinn, Jr., J. Yankaskas, D. Weissman, W. T. McClellan, C. Cuff, and S. C. Aronoff. 1999. Reduced interleukin-8 production by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:1073-1080.

101. Scheid, P., L. Kempster, U. Griesenbach, J. C. Davies, A. Dewar, P. P. Weber, W. H. Colledge, M. J. Evans, D. M. Geddes, and E. W. Alton. 2001. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur.Respir.J.* 17:27-35.
102. Aldallal, N., E. E. McNaughton, L. J. Manzel, A. M. Richards, J. Zabner, T. W. Ferkol, and D. C. Look. 2002. Inflammatory response in airway epithelial cells isolated from patients with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:1248-1256.
103. Black, H. R., J. R. Yankaskas, L. G. Johnson, and T. L. Noah. 1998. Interleukin-8 production by cystic fibrosis nasal epithelial cells after tumor necrosis factor-alpha and respiratory syncytial virus stimulation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 19:210-215.
104. Cozens, A. L., M. J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W. E. Finkbeiner, J. H. Widdicombe, and D. C. Gruenert. 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10:38-47.
105. Cozens, A. L., M. J. Yezzi, L. Chin, E. M. Simon, W. E. Finkbeiner, J. A. Wagner, and D. C. Gruenert. 1992. Characterization of immortal cystic fibrosis tracheobronchial gland epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5171-5175.
106. Gruenert, D. C., M. Willems, J. J. Cassiman, and R. A. Frizzell. 2004. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J.Cyst.Fibros.* 3 Suppl 2:191-196.
107. Yamaya, M., W. E. Finkbeiner, S. Y. Chun, and J. H. Widdicombe. 1992. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am.J.Physiol* 262:L713-L724.
108. Cozens, A. L., M. J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W. E. Finkbeiner, J. H. Widdicombe, and D. C. Gruenert. 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10:38-47.
109. Gray, T. E., K. Guzman, C. W. Davis, L. H. Abdullah, and P. Nettekheim. 1996. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 14:104-112.
110. Schroder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber, and R. R. Schumann. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J.Biol.Chem.* 278:15587-15594.

111. McManus, M. T. and P. A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat.Rev.Genet.* 3:737-747.
112. Trapnell, B. C., C. S. Chu, P. K. Paakko, T. C. Banks, K. Yoshimura, V. J. Ferrans, M. S. Chernick, and R. G. Crystal. 1991. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:6565-6569.
113. Mendes, F., L. Doucet, A. Hinzpeter, C. Ferec, J. Lipecka, J. Fritsch, A. Edelman, H. Jorna, R. Willemsen, A. G. Bot, H. R. De Jonge, J. Hinnrasky, N. Castillon, K. Taouil, E. Puchelle, D. Penque, and M. D. Amaral. 2004. Immunohistochemistry of CFTR in native tissues and primary epithelial cell cultures. *J.Cyst.Fibros.* 3 Suppl 2:37-41.
114. Morrison, D. C. and D. M. Jacobs. 1976. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry.* 13:813-818.
115. Neville, L. F., G. Mathiak, and O. Bagasra. 1997. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:207-219.
116. Kumar, A., J. Zhang, and F. S. Yu. 2006. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology* 117:11-21.
117. Jiang, Q., S. Akashi, K. Miyake, and H. R. Petty. 2000. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J.Immunol.* 165:3541-3544.
118. Flo, T. H., O. Halaas, E. Lien, L. Ryan, G. Teti, D. T. Golenbock, A. Sundan, and T. Espevik. 2000. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 164:2064-2069.
119. Wiszniewski, L., L. Jornot, T. Dudez, A. Pagano, T. Rochat, J. S. Lacroix, S. Suter, and M. Chanson. 2006. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 34:39-48.
120. Montrose-Rafizadeh, C., W. B. Guggino, and M. H. Montrose. 1991. Cellular differentiation regulates expression of Cl⁻ transport and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in human intestinal cells. *J.Biol.Chem.* 266:4495-4499.
121. Perez, A., A. C. Issler, C. U. Cotton, T. J. Kelley, A. S. Verkman, and P. B. Davis. 2007. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 292:L383-L395.

122. Kube, D. M., D. Fletcher, and P. B. Davis. 2005. Relation of exaggerated cytokine responses of CF airway epithelial cells to PAO1 adherence. *Respir.Res.* 6:69.
123. Sarkadi, B., D. Bauzon, W. R. Huckle, H. S. Earp, A. Berry, H. Suchindran, E. M. Price, J. C. Olson, R. C. Boucher, and G. A. Scarborough. 1992. Biochemical characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 267:2087-2095.
124. Schroeder, T. H., M. M. Lee, P. W. Yacono, C. L. Cannon, A. A. Gerceker, D. E. Golan, and G. B. Pier. 2002. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:6907-6912.
125. Farinha, C. M., D. Penque, M. Roxo-Rosa, G. Lukacs, R. Dormer, M. McPherson, M. Pereira, A. G. Bot, H. Jorna, R. Willemsen, H. Dejonge, G. D. Heda, C. R. Marino, P. Fanen, A. Hinzpeter, J. Lipecka, J. Fritsch, M. Gentzsch, A. Edelman, and M. D. Amaral. 2004. Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. *J.Cyst.Fibros.* 3 Suppl 2:73-77.
126. da Paula, A. C., A. S. Ramalho, C. M. Farinha, J. Cheung, R. Maurisse, D. C. Gruenert, J. Ousingsawat, K. Kunzelmann, and M. D. Amaral. 2005. Characterization of novel airway submucosal gland cell models for cystic fibrosis studies. *Cell Physiol Biochem.* 15:251-262.
127. Bedard, M., C. D. McClure, N. L. Schiller, C. Francoeur, A. Cantin, and M. Denis. 1993. Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 9:455-462.
128. Pizurki, L., M. A. Morris, M. Chanson, M. Solomon, A. Pavirani, I. Bouchardy, and S. Suter. 2000. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator does not affect neutrophil migration across cystic fibrosis airway epithelial monolayers. *Am.J.Pathol.* 156:1407-1416.
129. Becker, M. N., M. S. Sauer, M. S. Muhlebach, A. J. Hirsh, Q. Wu, M. W. Verghese, and S. H. Randell. 2004. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 169:645-653.
130. Rothwarf, D. M. and M. Karin. 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci.STKE.* 1999:RE1.
131. DiMango, E., A. J. Ratner, R. Bryan, S. Tabibi, and A. Prince. 1998. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J.Clin.Invest* 101:2598-2605.

132. McNamara, N., A. Khong, D. McKemy, M. Caterina, J. Boyer, D. Julius, and C. Basbaum. 2001. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:9086-9091.
133. Weber, A. J., G. Soong, R. Bryan, S. Saba, and A. Prince. 2001. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl- channel function. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281:L71-L78.
134. Pahl, H. L. and P. A. Baeuerle. 1996. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett.* 392:129-136.
135. Joseph, T., D. Look, and T. Ferkol. 2005. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 288:L471-L479.
136. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
137. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
138. Hauber, H. P., M. K. Tulic, A. Tsicopoulos, B. Wallaert, R. Olivenstein, P. Daigneault, and Q. Hamid. 2005. Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. *Can.Respir.J.* 12:13-18.
139. Tapping, R. I., S. Akashi, K. Miyake, P. J. Godowski, and P. S. Tobias. 2000. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J.Immunol.* 165:5780-5787.
140. Armstrong, L., A. R. Medford, K. M. Uppington, J. Robertson, I. R. Witherden, T. D. Tetley, and A. B. Millar. 2004. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31:241-245.
141. Hornef, M. W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors. 2002. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J.Exp.Med.* 195:559-570.
142. Guillot, L., S. Medjane, K. Le-Barillec, V. Balloy, C. Danel, M. Chignard, and M. Si-Tahar. 2004. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J.Biol.Chem.* 279:2712-2718.

143. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
144. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J.Exp.Med.* 198:1043-1055.
145. Koller, D. Y., I. Nething, J. Otto, R. Urbanek, and I. Eichler. 1997. Cytokine concentrations in sputum from patients with cystic fibrosis and their relation to eosinophil activity. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 155:1050-1054.
146. Tabary, O., C. Muselet, S. Escotte, F. Antonicelli, D. Hubert, D. Dusser, and J. Jacquot. 2003. Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am.J.Pathol.* 162:293-302.
147. Mayer, A. K., M. Muehmer, J. Mages, K. Gueinzus, C. Hess, K. Heeg, R. Bals, R. Lang, and A. H. Dalpke. 2007. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J.Immunol.* 178:3134-3142.
148. Melmed, G., L. S. Thomas, N. Lee, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, Y. Zhou, B. Hu, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2003. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J.Immunol.* 170:1406-1415.
149. Jarosch, E., U. Lenk, and T. Sommer. 2003. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int.Rev.Cytol.* 223:39-81.
150. Tesse, R., F. Cardinale, T. Santostasi, A. Polizzi, A. Manca, L. Mappa, G. Iacoviello, R. F. De, V. P. Logrillo, and L. Armenio. 2008. Association of beta-defensin-1 gene polymorphisms with *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis. *Genes Immun.* 9:57-60.
151. Arbour, N. C., E. Lorenz, B. C. Schutte, J. Zabner, J. N. Kline, M. Jones, K. Frees, J. L. Watt, and D. A. Schwartz. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat.Genet.* 25:187-191.
152. Iwami, K. I., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikachoen, and Y. Yoshikai. 2000. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J.Immunol.* 165:6682-6686.
153. Ohnishi, T., M. Muroi, and K. Tanamoto. 2003. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 10:405-410.

154. Backhed, F., L. Meijer, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors. 2002. TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cell Microbiol.* 4:493-501.
155. Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. T. Golenbock, and T. Espevik. 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J.Biol.Chem.* 277:47834-47843.
156. Monick, M. M., T. O. Yarovinsky, L. S. Powers, N. S. Butler, A. B. Carter, G. Gudmundsson, and G. W. Hunninghake. 2003. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J.Biol.Chem.* 278:53035-53044.
157. Poussin, C., M. Foti, J. L. Carpentier, and J. Pugin. 1998. CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. *J.Biol.Chem.* 273:20285-20291.
158. Kyriakis, J. M. and J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81:807-869.
159. Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb. 2001. MAP kinases. *Chem.Rev.* 101:2449-2476.
160. Ratner, A. J., R. Bryan, A. Weber, S. Nguyen, D. Barnes, A. Pitt, S. Gelber, A. Cheung, and A. Prince. 2001. Cystic fibrosis pathogens activate Ca²⁺-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 276:19267-19275.
161. Shao, M. X., I. F. Ueki, and J. A. Nadel. 2003. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:11618-11623.
162. Thornton, D. J. and J. K. Sheehan. 2004. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1:54-61.

7 Anhänge

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ALI	air liquid interface
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pair
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CF	Cystische Fibrose
d.h.	dass heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GT	Glykosyltransferase
h	Stunde
HRP	Horseradish-Peroxidase
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IL	Interleukin
IP-10	Interferon- γ -inducible protein-10
kDa	Kilodalton
LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
Mal	MyD88 adapter-like
mEq/l	Milliequivalent pro Liter
min	Minute
mm	Millimeter

mRNA	messenger RNA
MUC	Mucin
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TR	Tandem repeat
u.a.	unter anderem
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

7.2 Publikationen

John G, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO. TLR-4 expression is reduced in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Am J Respir Crit Care Med** 2008;177:A930.

Yildirim AO, Moyal V, **John G**, Mueller B, Seifart C, Fehrenbach H. Palifermin induces regeneration of alveoli in emphysematous mice via transforming growth factor- β . **Am J Respir Crit Care Med** 2008; in Revision.

Henke MO, **John G**, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during a pulmonary exacerbation. **Am J Respir Crit Care Med** 2007;175:816-821.

Henke MO, **John G**, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during a pulmonary exacerbation. **Proc Am Thorac Soc** 2006;3:A688.

Ergebnisse dieser Arbeit werden auf dem internationalen Kongress der **European Respiratory Society** vom 04.-08. Oktober 2008 in Berlin unter dem Titel 'TLR-4 expression is reduced in cystic fibrosis bronchial epithelial cells' in der Session 'Cystic Fibrosis: Novel aspects of airway function and inflammation' als Vortrag präsentiert.