

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. Claus Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

Rauchen supprimiert das angeborene Immunsystem



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.) dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg vorgelegt von

Christian Herr

aus Bad Soden-Salmünster

Marburg 2009

Angenommen am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 03.07.2009

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. R. Bals

Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

SIE waren die fleißigsten Tiere, die es gab. Man nannte sie „Fleißtiere“. Ständig rannten sie umher, um irgendetwas zu tun. Bis die Sache mit Bonifacio geschah: Bonifacio fand eines Tages gefallen daran, einfach nur an einem Ast zu hängen, die Regentropfen zu beobachten und ein bisschen nachzudenken...

„Faultiere !“, beschlossen die Fleißtiere einstimmig, „So sollt ihr von nun an heißen !“ Sprachen's und verließen den Urwald. Man hat nie wieder etwas von den Fleißtieren gehört. Wahrscheinlich haben sie noch mehr tun wollen und darüber das Kinderkriegen vergessen.

Wenn ihr heute ein Faultier trifft, dann fragt es mal nach dem „Sinn von allem“, vielleicht hat es die Antwort schon gefunden. Sie haben ja alle Zeit der Welt gehabt.

Florentine Joop, Bonifacio oder Das Geheimnis der Faultiere, 2000, Edition Riesenrad GmbH, Hamburg

Zusammenfassung

Das Epithel der Atemwege stellt einen direkten Kontakt zwischen dem Blutkreislauf und der eingeatmeten Luft her. Das Epithel der Atemwege ist ein Teil des angeborenen Immunsystems und bildet, zusammen mit löslichen Faktoren, einen wirksamen Schutz gegen die Besiedlung pathogener Mikroorganismen. Extrinsische Faktoren wie Umweltverschmutzung und Zigarettenrauch, oder intrinsische Faktoren wie eine allergische Entzündung können das angeborene Immunsystem in seiner Funktion schwächen und damit zu einer Erkrankung beitragen. Raucher erkranken zu einem höheren Prozentsatz an Infektionen der Lunge, außerdem ist Zigarettenrauch ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD. Die Mechanismen, die dieser erhöhten Suszeptibilität zu Grunde liegen, sind weitgehend unklar. Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Einflusses von Zigarettenrauch auf das angeborene Immunsystem der Lunge im Rahmen einer bakteriellen Infektion.

Im Sputum von rauchenden Pneumoniepatienten wurden geringere Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids hBD-2 gefunden, als bei nicht rauchenden Patienten. Dieses Ergebnis konnte in einem *in vitro* Berauchungsmodell mit primären humanen Atemwegsepithelzellen bestätigt werden. Dabei wurde die Expression von hBD-2 nach der Infektion mit *P.aeruginosa* PAOI signifikant durch Zigarettenrauch unterdrückt, was mit einer verringerten Konzentration von hBD-2 und einem besseren Überleben der Bakterien korrelierte. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine wurde durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst. Die Behandlung der Zellen mit Katalase vor und während des Berauchens konnte die Induktion von hBD-2 durch *P.aeruginosa* zum Teil wieder herstellen. Da Katalase als Antioxidanz die Funktion des angeborenen Immunsystems beeinflusst, wurde die Expression einzelner Proteine des antioxidativen Systems der Zellen in Abhängigkeit von Zigarettenrauch und bakterieller Stimulation untersucht. Zigarettenrauch induzierte die Expression von Thioredoxin-1; MnSOD wurde nur durch die Infektion mit *P.aeruginosa* hochreguliert.

Da andere Gruppen bereits zeigen konnten, dass Inhaltsstoffe von Zigarettenrauch die antioxidativ wirksamen Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigen können und direkten Einfluss auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren haben, wurde die Expression von Proteinen untersucht, die mit Zellstress assoziiert sind. Die Chaperone Hsp-70 und Hsp-90 spielen bei der Proteinfaltung und dem Proteintransport eine Rolle. Ihre Expression wird allerdings auch durch Hitzestress oder chemisch hervorgerufenen Stress induziert. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Hsp-70 durch Zigarettenrauch signifikant induziert und konnte durch Katalase reduziert werden. Des Weiteren zeigte sich, dass durch Zigarettenrauch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach der Stimulation mit *P.aeruginosa* verhindert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das antimikrobielle Peptid hBD-2 eine wichtige Rolle bei der Reaktion des angeborenen Immunsystems der Lunge spielt. Seine Expression nach bakterieller Stimulation wird durch Zigarettenrauch verhindert und kann durch Katalase wieder verstärkt werden. Der zu Grunde liegende Mechanismus beinhaltet eine Inhibition der Aktivierung von NF- κ B p65 durch Zigarettenrauch nach bakterieller Stimulation. Da die Abgabe der Zytokine IL-6 und IL-8 durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst wird, ist anzunehmen, dass die Expression dieser Zytokine nur zum Teil durch NF- κ B reguliert wird.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Das angeborene Immunsystem	2
1.1.1	Mechanismen des angeborenen Immunsystems	2
1.1.1.1	Toll-like Rezeptoren	3
1.1.1.2	TLR-Signaltransduktion	5
1.1.2	Antimikrobielle Peptide	7
1.1.2.1	Cathelizidine	8
1.1.2.2	Defensine	11
1.1.2.3	Biologische Funktionen antimikrobieller Peptide	16
1.2	Der NF- κ B Signalweg	18
1.2.1	Signaltransduktion	19
1.3	Zelluläre Funktionen von Hitzeschockproteinen	22
1.3.1	Alternative Funktionen von Hitzeschockproteinen	23
1.4	Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei entzündlichen Infektionen der Atemwege	24
1.4.1	Pneumonie	24
1.4.2	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	25
2	Fragestellung	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Lösungen und Puffer	29
3.1.3	Patientenmaterial	29
3.1.4	Peptide	29
3.1.5	Antikörper	30
3.2	Methoden	30
3.2.1	Methoden der Zellkultur	30
3.2.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	30
3.2.1.2	Kultivierung primärer humaner Atemwegsepithelzellen im Air-Liquid-Interface System	30
3.2.1.3	Bestimmung des Zelltiters	31
3.2.1.4	Rauchexposition im Air-Liquid-Interface System	31
3.2.1.5	Zellstimulationen	32
3.2.1.6	Antimikrobieller Assay mit Air-Liquid-Interface-Kulturen	32

3.2.1.7	Bestimmung der Zellviabilität	33
3.2.2	Gentechnische Methoden	33
3.2.2.1	RNA-Isolation	33
3.2.2.2	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Abschätzung der Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen	33
3.2.2.3	cDNA-Synthese	34
3.2.2.4	Real-Time-quantitative-PCR (qRT-PCR)	34
3.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2.3	Proteinbiochemisch Methoden	36
3.2.3.1	Antimikrobieller Assay	36
3.2.3.2	Festphasen-Extraktion von Proteinen aus Sputum	36
3.2.3.3	Gesamtzellextraktion eukaryotischer Zellen unter denaturierenden Bedingungen	37
3.2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.2.3.5	Subzelluläre Fraktionierung	37
3.2.3.6	SDS-Gelelektrophorese	38
3.2.3.7	Western-Blot-Analyse	38
3.2.3.8	hBD-2 ELISA	39
3.2.3.9	Zytokin-ELISA	39
3.2.3.10	Transkriptionsfaktor-ELISA	40
3.2.3.11	Immunfluoreszenz	40
3.2.4	Statistische Analyse	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Rauchen verringert die hBD-2 Konzentration im Sputum	42
4.2	Zigarettenrauch unterdrückt die Induktion von hBD-2 <i>in vitro</i>	43
4.3	Zigarettenrauch beeinflusst nicht die antimikrobielle Aktivität von hBD-2	46
4.4	Rauchexposition führt zu keiner erhöhten LDH-Abgabe	48
4.5	CS hat keine Auswirkungen auf die Adhärenz von <i>P.aeruginosa</i>	49
4.6	Die Abgabe von IL-6 und IL-8 wird durch CS nicht beeinflusst	50
4.7	CS und <i>P.aeruginosa</i> induzieren unterschiedliche antioxidative Proteine	51
4.8	Antioxidantien erhöhen die Expression von hBD-2	53
4.9	Zigarettenrauch erhöht die Expression von Chaperonen	54
4.10	Zigarettenrauch inhibiert die Kernlokalisation von p65	56
4.11	Zigarettenrauch inhibiert die Aktivierung von p65	59

5 Diskussion	61
5.1 Zigarettenrauch verhindert die Aktivierung des angeborenen Immunsystems	61
5.2 Die Stimulation mit <i>P.aeruginosa</i> führt zu einer pro-inflammatorischen Zytokinantwort von pHBEs	63
5.3 Antioxidantien beeinflussen die Expression von hBD-2	65
5.4 pHBEs reagieren auf Zigarettenrauch und <i>P.aeruginosa</i> mit der Expression unterschiedlicher antioxidativer Proteine	65
5.5 Die Stimulation von pHBEs mit Zigarettenrauch und <i>P.aeruginosa</i> führt zu einer Expression von Chaperonen	67
5.6 Zigarettenrauch inhibiert die Aktivierung von NF- κ B	68
5.7 Schlussbemerkung	71
Literatur	74
6 Anhang	98
6.1 Veröffentlichungen	98
6.2 Kongressbeiträge	98
6.2.1 Vorträge	98
6.2.2 Posterbeiträge	100

Abkürzungen

3'UTR	3' nichttranslatierter Bereich		(<i>fetal calf serum</i>)
5'UTR	5' nichttranslatierter Bereich	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Abb	Abbildung	HRP	Meerrettichperoxidase
ALI	„ <i>Air-Liquid-Interface</i> “		(<i>horse radish peroxidase</i>)
AK	Antikörper	kb	Kilobase
APS	Ammoniumperoxodisulfat	kDa	Kilodalton
aq.dest.	aqua destilata	LB	<i>Luria broth</i>
ARDS	„ <i>Acute respiratory distress syndrome</i> “ Akutes progressives Lungenversagen	mRNA	„ <i>messenger ribonucleic acid</i> “
ATP	Adenosintriphosphat	NLS	Kernimportsequenz „ <i>nuclear localisation sequence</i> “
bp	Basenpaar	OD	Optische Dichte
BAL	Bronchoalveolare Lavage	p.A.	Analysequalität (<i>per analysis</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CAP	Noskomiale Pneumonie (<i>community acquired pneumonia</i>)	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (<i>phosphate buffered saline</i>)
CFU	koloniebildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)	PCR	Polymerasekettenreaktion
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung („ <i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> “)	pHBE	primäre humane Bronchialepithelzellen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	RNA	Ribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	RT	Raumtemperatur
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TAD	Transaktivierungsdomäne
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
ECL	Verstärkende Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TFA	Trifluoressigsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure	Tris	α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)- methylamin
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest	Tween® -20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmono- laurat
FCS	Fötales Kälberserum	WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das Epithel des respiratorischen Traktes ist ständig mit der Umwelt in Kontakt. Dazu gehören neben Staub und Pollen auch mikrobielle Bestandteile oder ganze Mikroorganismen, die über unsere Atemluft mit dem Epithel des Respirationstraktes in Kontakt kommen. Das angeborene Immunsystem ist ein integraler Bestandteil des Epithels und wird durch eine Vielzahl von Faktoren geschützt. Dazu gehören strukturelle Komponenten, wie der geschlossene Zellverband des Epithels und lösliche Faktoren (Whitsett, 2002). Proteine und Peptide, die in der Atemwegsflüssigkeit enthalten sind, wirken direkt antimikrobiell, sind aber auch in der Lage, Entzündungsreaktionen zu beeinflussen. Prominente antimikrobielle Bestandteile der Atemwegsflüssigkeit sind neben Lysozym, Lactoferrin, Surfactant Proteine und dem Komplement-System die Defensine und Cathelicidin. Letztere gehören zu einer Gruppe kationischer Peptide, die von Epithelzellen, von myeloiden Zellen wie Neutrophilen, Makrophagen und lymphoiden natürlichen Killerzellen gebildet werden. Die Erkennung eindringender Pathogene erfolgt über Muster-erkennende Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLR) an der Zelloberfläche oder im Zytosol durch NOD-Rezeptoren („*nucleotide binding and oligomerization domain*“).

1.1.1 Mechanismen des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem schützt unseren Körper an vorderster Front vor eindringenden Pathogenen. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist die Erkennung der Mikroorganismen und die Unterscheidung zwischen Kommensalen und Pathogenen. Dem Organismus stehen dafür unterschiedlichste Rezeptoren zur Verfügung, unter denen die TLRs die am besten charakterisierten sind. Sie dienen als mustererkennende Rezeptoren (PRR = „*pattern recognition receptors*“), die eine Vielzahl von konservierten Strukturen erkennen, die mit Pathogenen (PAMP = „*pathogen-associated molecular pattern*“) und vermutlich auch wirtsspezifischen Mustern assoziiert sind (Akira et al., 2006; Basu and Fenton, 2004; Greene and McElvaney, 2005; Janeway and Medzhitov, 2002).

Neben den TLRs gibt es noch Typ I C-Typ Lectin Transmembranrezeptoren, zu denen der Mannose Rezeptor und Dectin-1 zählen. Diese Familie von PRRs ist gekennzeichnet durch vielfältige extrazelluläre Lectin-ähnliche Domänen, die Kalzium-abhängig mit Bakterien, Hefen und Viren interagieren können (McGreal et al., 2005). Zusätzlich besitzen Mannose-Rezeptoren eine Cystein-reiche Domäne, die es ihnen ermöglicht, endogene Glykoproteine zu binden (Fiete et al., 1998) und eine Fibronectin Typ II Domäne, von

bisher ungeklärter Funktion. Dectin-1 ist an der pro-inflammatorischen Reaktion, der Phagozytose und angeborenen Immunreaktion gegenüber Zellwandbestandteilen von Pilzen durch Makrophagen beteiligt (Brown, 2006; Brown and Gordon, 2001).

Zwei weitere Familie von PRRs, die wie die TLRs auch durch eine leuzinreiche Domäne zur Erkennung von PAMPs gekennzeichnet sind, sind die zytosolischen NOD-like Rezeptoren (NLR) und RIG-like („*retinoic acid inducible protein 1*“) Rezeptoren (RLR). RLRs erkennen virale dsRNA, die aus dem Endosom in das Zytosol gelangt ist. Unter den NLRs sind NOD1 und NOD2 die am besten charakterisierten, die intrazellulär Bestandteile von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien erkennen. Die Bakterien werden dabei entweder endosomal aufgenommen und gelangen mittels Pathogenitätsfaktoren aus dem Endosom in das Zytosol (Typ-III oder Typ-IV Sekretionssystem), benutzen porenbildende Toxine oder aktivieren Poren in der Zelloberfläche (auch endosomal), durch die sie in das Zytosol gelangen können. Je nach Ligand und NLR kann es zu einer Aktivierung von IL-1 β durch Caspase-1 kommen, zur NF- κ B und JNK abhängigen IL-8 und COX-2 Abgabe oder zur Expression von antimikrobiellen Peptiden kommen.

1.1.1.1 Toll-like Rezeptoren TLRs sind hoch konservierte Rezeptoren, die man von den Fadenwürmern bis zu den Säugetieren nachweisen kann (Akira and Takeda, 2004; Beutler, 2004; Hoffmann, 2003; Janeway and Medzhitov, 2002). Ursprünglich wurde der Toll-Rezeptor bei *Drosophila* gefunden und ist dort verantwortlich für die dorsoventrale Polarität des Embryos. Toll spielt in *Drosophila* auch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegenüber Pilzinfektionen (Lemaitre et al., 1996).

Bis jetzt wurden 13 unterschiedliche TLRs in Säugetieren gefunden, wovon 11 im Menschen und 13 in der Maus exprimiert werden (Akira et al., 2006). Sie sind integrale Membran-Glykoproteine, die in der extrazellulären Domäne eine unterschiedliche Anzahl Leuzinhaltiger Sequenzmotive haben (LRR = „*leucine-rich-repeats*“), deren proteinbiochemischen Eigenschaften Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Akira and Sato, 2003). Die zytoplasmatische Signaldomäne der TLRs weist Homologien zu dem Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) auf (TIR = „*Toll / IL-1R homology domain*“) (Bowie and O’Neill, 2000) und hat eine große Bedeutung in der Signaltransduktion, da hierüber nach der Aktivierung des Rezeptors die weitere Signalkaskaden in der Zelle angesprochen werden (O’Neill, 2002).

Die TLRs unterscheiden sich in der Abfolge der Aminosäuren in der LRR-Domäne, die für die Erkennung verschiedene PAMPs verantwortlich ist (Barton and Medzhitov, 2002). Eine Gruppe besteht aus TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6, die überwiegend Lipide wie Lipoteichonsäure und Peptidoglycan erkennen und an der Zelloberfläche lokalisieren.

TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkennen Nukleinsäuren, wie RNA oder DNA und sind intrazellulär zu finden. Die LRR Domäne ist außerdem für die Dimerisation der TLRs verantwortlich. Der allgemeine Signalweg über TLRs beinhaltet die Interaktion mit dem Liganden und die Dimerisierung des TLR, woraufhin liganden- und rezeptorspezifisch unterschiedliche Signalwege der Zelle aktiviert werden (siehe 1.1.1.2).

- TLR4 ist der am besten charakterisierte TLR. Er wird sowohl durch externe Stimuli wie Lipopolysaccharide Gram-positiver Bakterien, Mannuronsäure von *P.aeruginosa* und F-Protein des RSV-Virus („*respiratory syncytial virus*“) aktiviert, als auch von endogenen Signalen wie Hitzeschockproteine Hsp60, Hsp70 und Fibronectin (Rallabhandi et al., 2006). TLR4 wird von Lungenepithelzellen (Alveolar- und Trachealepithelzellen) intrazellulär gebildet, was biologisch sinnvoll ist, da diese Zellen andauernd mit LPS in Kontakt sind und damit ununterbrochen pro-inflammatorische Signale generieren würden (Guillot et al., 2004). Pro-inflammatorische Signale führen zu einem Einstrom von Neutrophilen und der Freisetzung von Neutrophiler Elastase, die für das Gewebe schädlich ist. Bei Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems wird TLR4 an der Zelloberfläche exprimiert.
- TLR2 interagiert mit einer Vielzahl unterschiedlichster Liganden, zu denen Bestandteile Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien gehören, aber auch Mykobakterien, protozoische Parasiten (*Trypanosoma cruzi*) und Zymosan aus der Zellwand von Hefen (Sandor and Buc, 2005). Zusätzlich erkennt TLR2 lösliche Faktoren von *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis* oder hitzegetötete *Listeria monocytogenes*. Zur Erkennung dieser Liganden bildet TLR2 Heterodimere mit TLR1 und TLR6 (Kirschning and Schumann, 2002), was die Diversität und Spezifität der TLR-vermittelten Immunreaktion erhöht. TLR2 ist in Atemwegsepithelzellen nachweisbar, wird aber nicht sehr stark exprimiert (Hertz et al., 2003).
- TLR3 wird durch dsRNA aktiviert, das als ein Kennzeichen einer viralen Infektion gilt und induziert über einen NF- κ B abhängigen Signalweg die Produktion von Interferon- α (IFN- α) und trägt damit direkt zur antiviralen Abwehr bei. Da TLR3 an endosomalen Membranen gebildet wird, nimmt man an, dass die virale dsRNA, die TLR3 erkennt, von infizierten und lysierten Zellen stammt, die endozytotisch aufgenommen worden sind (Schröder and Bowie, 2005) oder von Viren, die über das Endosom aufgenommen wurden.
- TLR5 ist für die Erkennung einer stark konservierten Aminosäure-Sequenz von Flagellin, einem strukturellen Bestandteil von Flagellen vieler pathogener Bakterien, verantwortlich (Hayashi et al., 2001). Die Aktivierung von TLR5 durch Flagellin

führt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine und führt außerdem zu einer Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen. TLR5 wird in Atemwegsepithelzellen basolateral exprimiert und kann nur mit Flagellin interagieren, welches entweder über Endozytose aufgenommen worden ist oder über andere Wege (z.B. Verletzung des Epithels) in den Organismus gelangt ist (Steiner, 2007). Es wird auch angenommen, dass Flagellin danach die apikale Lokalisation von TLR5 induziert (Hayashi et al., 2001).

- TLR9 interagiert mit unmethylierter CpG DNA und löst damit eine Th1-gerichtete Immunreaktion aus (Hemmi et al., 2000). Prokaryoten besitzen nur unmethylierte DNA während Wirbeltiere neben einer Anzahl weiterer DNA-Modifikationen ihre DNA methylieren können. Im Genom von Bakterien kommen unmethylierte CpG-Motive in hoher Anzahl vor, die bei Wirbeltieren unterdrückt, methyliert oder durch immunneutralisierende Sequenzen flankiert werden (Daubenberg, 2007). TLR9 wird intrazellulär an Membranen des Endosoms gebildet und kann daher besonders gut mit bakterieller DNA interagieren, die von endozytierten und lysierten Pathogenen stammt. Neben TLR9 werden TLR7 und TLR8 ebenfalls endosomal gebildet und erkennen antivirale Bestandteile und einzelsträngige RNA (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2006).

1.1.1.2 TLR-Signaltransduktion TLRs werden von Zellen des angeborenen Immunsystems und Epithelzellen exprimiert. Die Bindung eines Liganden an die LRR-Domäne des TLRs bewirkt eine Dimerisierung des Rezeptors (Ozinsky et al., 2000) und die Aktivierung der intrazellulären TIR-Domäne, die über unterschiedliche Signalkaskaden zu der Expression und Abgabe einer Vielzahl von Effektorproteinen, wie Chemokinen und Zytokinen (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, IL-8, IL-6, IL- 1β) oder antimikrobiellen Peptiden wie hBD-2 (Akira and Sato, 2003) führt. Die Diversität und Spezifität der Interaktion von TLRs mit ihren Liganden und der ligandenabhängigen Expression unterschiedlicher Zielgene wird über verschiedene Mechanismen erreicht. Zum einen können TLRs untereinander kooperieren und dabei nach der Bindung eines Liganden Heterodimere oder Homodimere bilden. TLR1 und TLR2 sowie TLR2 und TLR6 bilden Heterodimere, TLR4 und TLR9 bilden jeweils Homodimere (O'Neill and Bowie, 2007). Ebenso wird angenommen, dass TLR3 und TLR5 Homodimere bilden. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass TLR8 mit TLR7 und TLR9 Heterodimere bilden kann, die sich untereinander durch ihre Liganden stark in der Signaltransduktion beeinflussen können (Wang et al., 2006a).

Ein weiterer Mechanismus zur Erhöhung der Komplexität und Spezifität der TLR-Signaltransduktion ist die Verwendung von Adaptermolekülen, die in Abhängigkeit der extrazellulären Liganden mit der hoch konservierten intrazellulären TIR-Domäne interagieren und

damit zur Expression verschiedener Zielgene durch den selben TLR führen können (Takeda and Akira, 2004). Derzeit sind beim Menschen fünf TLR-Adapterproteine bekannt, die sich alle durch eine TIR-Domäne kennzeichnen, die auch schon für die TLRs charakteristisch ist. Die TLR-Adapterproteine werden als MyD88 („*myeloid differentiation primary-response gene 88*“, wobei „88“ für die Zahl der Gene steht, die in der ursprünglichen Publikation durch IL-6 induziert wurden (Lord et al., 1990)), MAL (*MyD88-adaptor-like*, teilweise auch als TIRAP beschrieben), TRIF („*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β* “, manchmal auch als TICAM1 bezeichnet), TRAM („*TRIF-related adaptor molecule*“, auch TICAM2) und SARM („*sterile α - and armadillo-motif-containing protein*“) bezeichnet (O’Neill and Bowie, 2007).

MyD88 ist das zentrale Adapterprotein in der TLR-Signalkaskade, das, außer bei TLR3 und teilweise TLR4, mit allen Toll-Like Rezeptoren, IFN γ R1, IL-1R und IL-18R interagiert. Der MyD88 abhängige Signalweg führt im Wesentlichen über die Kinasen IRAK-1 und IRAK-4 („*IL-1R-associated kinase*“) zur Aktivierung von NF- κ B und der Expression NF- κ B abhängiger Zielgene (Suzuki et al., 2002; Takeuchi and Akira, 2002) aber auch zur Aktivierung und Kerntranslokation der Transkriptionsfaktoren p38, JNK, IRF1, IRF5 und IRF7. Im Fall von TLR8 führt die Aktivierung von TLR8 zu einer Interaktion von MyD88 mit IRF1 mit anschließender Kerntranslokation von MyD88 und IRF1 (O’Neill and Bowie, 2007). Im Fall von TLR1-TLR2 oder TLR2-TLR6 Heterodimeren kann MyD88 nur über den Adapter MAL mit der TIR-Domäne der TLRs interagieren.

Der TLR4-Signalweg kann sowohl MyD88 abhängig als auch MyD88 unabhängig aktiviert werden. Bei dem MyD88 abhängigen Signalweg kann TLR4, ähnlich wie bei TLR1/2 und TLR2/6, nur über MAL mit MyD88 interagieren, was zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, p38 und JNK führt.

Der MyD88-unabhängige Weg verläuft im Fall von TLR4 über die Adapter-Proteine TRAM und TRIF, was zu einer Aktivierung von NF- κ B, IRF3, IRF7 oder über FADD zur Apoptose führen kann (O’Neill and Bowie, 2007). Über TLR3 wird ausschließlich eine MyD88-unabhängige Signalkaskade aktiviert, die die Adapterproteine TRIF, TRAF3 und TRAF6 zur Aktivierung weiterer Kinasen und Initiation der Genexpression von IRF3, IRF7, NF- κ B oder FADD abhängiger Gene nutzt.

SARM, das einzige inhibitorische TIR-Adapterprotein, wird in unstimulierten Zellen kaum gebildet. Nach einer Stimulation von TLR3 oder TLR4 erhöht sich die Expression von SARM, woraufhin es zu einer vermehrten Interaktion von SARM mit TRIF kommt, dass die weitere TRIF-abhängige Signalkaskade unterbindet ohne MyD88-abhängige Signalwege zu stören (Carty et al., 2006).

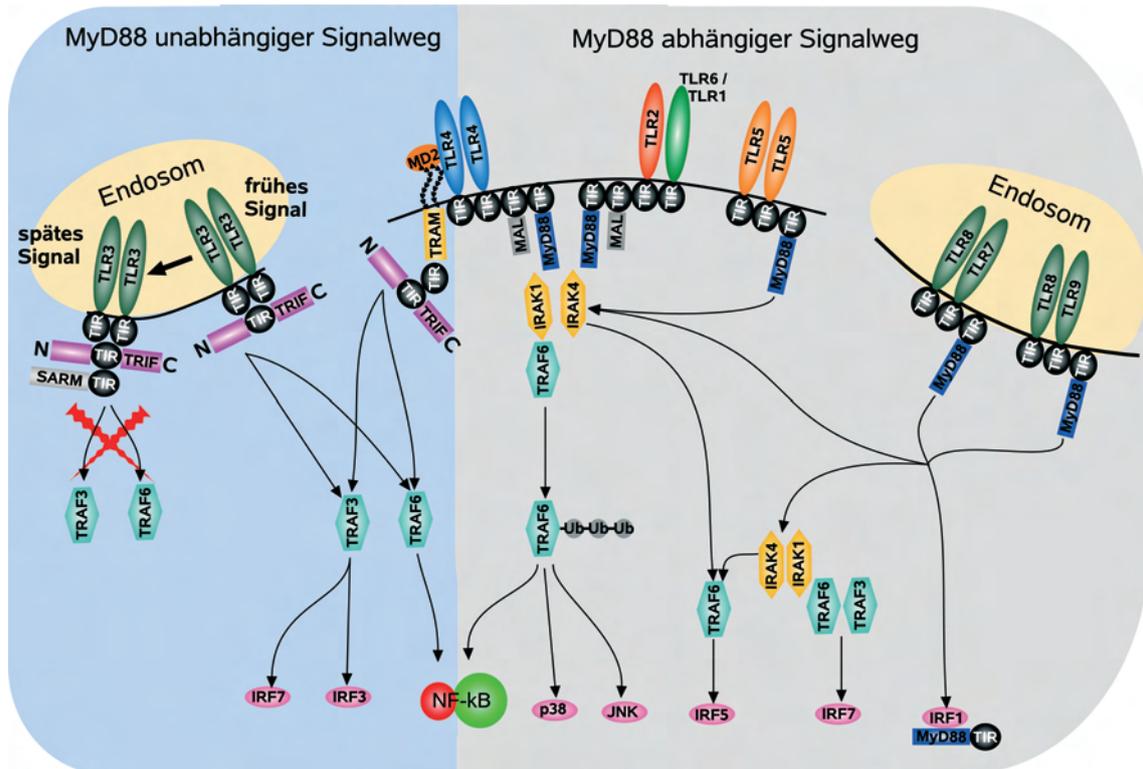


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TLR-Signalwegs (verändert nach O'Neill and Bowie (2007)). MyD88 ist, mit der Ausnahme von TLR3 und einigen TLR4-Signalen, das zentrale TLR-Adaptermolekül. Alle TLR-Rezeptoren besitzen eine TIR-Domäne, die mit der TIR-Domäne der Adaptermoleküle interagieren und dadurch Signalkaskaden aktivieren. Die Aktivierung von NF- κ B kann sowohl über den MyD88 abhängigen als auch den MyD88 unabhängigen Weg erfolgen.

1.1.2 Antimikrobielle Peptide

Als antimikrobielle Peptide bezeichnet man Peptide, die Bakterien abtöten oder deren Wachstum hemmen können. Antimikrobielle Peptide werden auf Grund ihrer Größe, Faltung oder Aminosäurezusammensetzung in verschiedene Familien eingeteilt. In den Atemwegen von Vertebraten spielen Defensine und Cathelizidine die größte Rolle. Die Defensine werden auf Grund ihrer unterschiedlich ausgebildeten Disulfidbrücken in α -Defensine, β -Defensine und θ -Defensine unterteilt. α -Defensine werden beim Menschen überwiegend von Neutrophilen, Makrophagen und Darmepithelzellen gebildet (Ganz et al., 1985; Lehrer, 2007). β -Defensine spielen bei der epithelialen Abwehr von Mikroorganismen eine große Rolle (Selsted and Ouellette, 2005). θ -Defensine sind bis jetzt nur beim Rhesusaffen gefunden worden, der Mensch besitzt davon nur ein Pseudogen (Tang et al., 1999). Aus der Familie der Cathelizidine besitzt der Mensch nur ein Peptid, hCAP-18/LL-37, dass überwiegend von Neutrophilen aber auch von Epithelzellen gebildet wird (Bals

and Wilson, 2003). Im Folgenden soll näher auf das humane Cathelizidin hCAP-18/LL-37 und die Defensine eingegangen werden.

1.1.2.1 Cathelizidine

Vorkommen

Ausgehend von einem konservierten Cathelizidin Sequenzmotiv können Peptide aus der Familie der Cathelizidine in fast allen Säugetieren wie Primaten, dem Rind, der Maus oder dem Hasen nachgewiesen werden (Ganz and Lehrer, 1998; Lehrer and Ganz, 1999; Zanetti et al., 1995). Cathelizidine konnten auch bei Nicht-Säugetieren wie Vögeln (Lynn et al., 2004) oder Fischen (Chang et al., 2005, 2006; Uzzell et al., 2003) identifiziert werden. Die weite Verbreitung unter den Spezies und der hohe Grad an Konservierung des Propeptids unterstreichen seine Wichtigkeit. Cathelizidine kennzeichnen sich durch ein konserviertes Signalpeptid, einem Cathelin-ähnlichen Propeptid (Cathelin = *cathepsin L inhibitor*) und einer heterogenen, antimikrobiellen c-terminalen Domäne, die durch Proteasen vom Propeptid abgespalten wird. Die Struktur des reifen c-terminalen Peptides kann neben α -helikalen Formen beim Menschen, Kaninchen und Maus (Frohm et al., 1997; Hirata et al., 1994a) auch β -Faltblatt Strukturen wie bei Schweinen annehmen (Aumelas et al., 1996) und hat eine Länge von 12 bis 80 Aminosäuren (Zanetti et al., 1995).

Genomische Organisation und Expression

Die Anzahl der gefundenen Cathelizidin Gene innerhalb einer Spezies reicht von einem beim Mensch, der Maus und der Ratte, bis zu 11 beim Schwein. LL-37/hCAP-18 ist der einzige Vertreter der Cathelizidine beim Menschen und wurde zuerst aus Knochenmark isoliert (Cowland et al., 1995). hCAP-18/LL-37 wird beim Menschen durch das Gen CAMP kodiert, das auf Chromosom 3p21.31 liegt. Es ist etwa 2 kb lang und besteht aus einer konservierten Abfolge von 4 Exons und 3 Introns (Zhao et al., 1995a,b). Auf Exon I bis II sind die 5'UTR mit positiven und negativen regulatorischen Elementen und die konservierte Cathelizidin Prodomäne kodiert. Exon IV enthält den hochvariablen antimikrobiellen C-terminalen Teil und die 3'UTR. Das Cathelizidin Propeptid hat bei physiologischem pH eine anionische Ladung und enthält ein Cathelizidin-Konsensusmuster am N-terminalen Teil des Propeptids (Y-x-[ED]-x-V-x-[RQ]-A-[LIMVMA]-[DQG]-x-[LIVMFY]-N-[EQ]) und eine zweite Konsensussequenz mit 2 der 4 konservierten Cysteine im mittleren Teil (F-x-[LIVM]-K-E-T-x-C-x(10)-C-x-F-[KR]-[KE]) (Tomasinsig and Zanetti, 2005). Das Peptid wird in myeloiden Zellen in seiner Proform exprimiert und in spezifischen Granula gespeichert. Es wird von Atemwegsepithelzellen und Alveolarmakrophagen gebildet und

in die Atemwegsflüssigkeit abgegeben (Agerberth et al., 2000; Bals et al., 1998b). LL-37/hCAP-18 ist *in vitro* aus Zellüberständen primärer Explantate der Atemwege als auch *in vivo* in bronchoalveolarer Spülflüssigkeit von Patienten nachgewiesen worden (Agerberth et al., 1999; Bals et al., 1998b). Im Knochenmark gibt es eine Splicevariante, die ein zusätzliches Exon Ib und ein verändertes Exon IV besitzt, das als Exon IIIb bezeichnet wird (siehe Abb.2 und (Elloumi and Holland, 2008)).

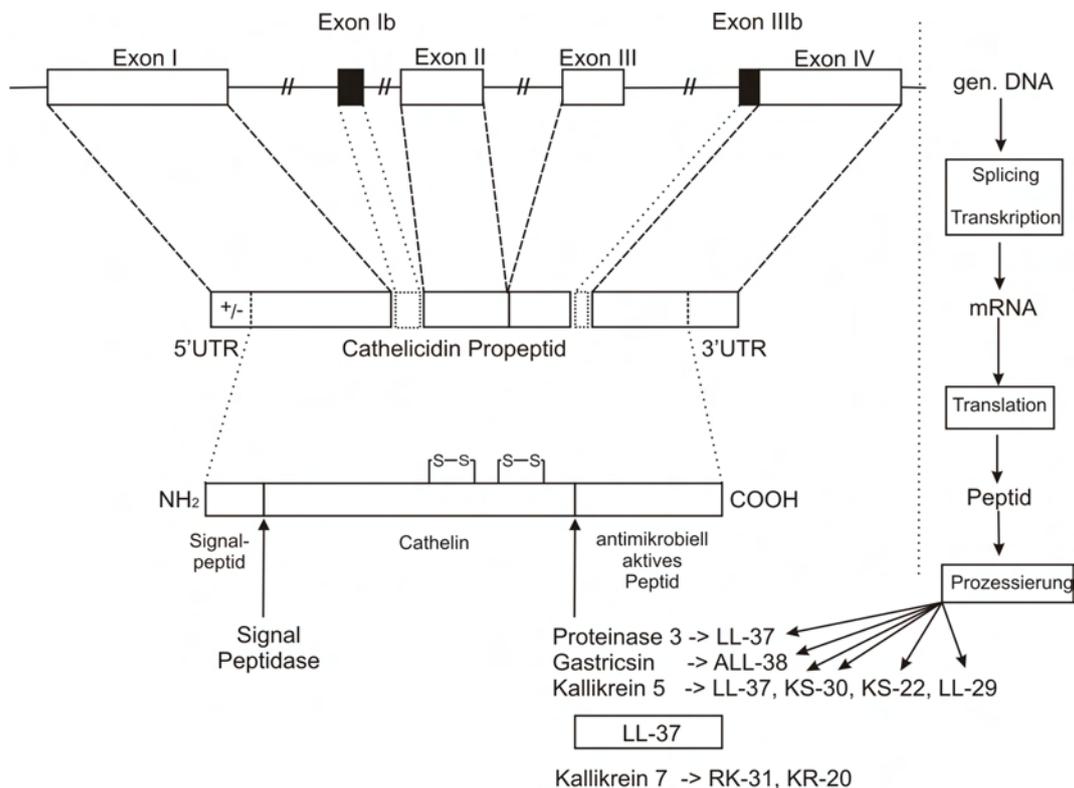


Abbildung 2: Die Struktur und Prozessierung des humanen Cathelidins hCAP-18/LL-37. Das Gen besteht aus 4 Exons und hat eine Länge von etwa 2 kb. Im Knochenmark findet sich eine Variante, die durch unterschiedliches Splicen ein Exon Ib und ein verändertes Exon IV, hier mit Exon IIIb gekennzeichnet, enthält. Das Cathelidins Pro-Peptid wird prozessiert und anschließend von einer Vielzahl gewebe- und spezies-spezifischer Proteasen gespalten, um den antimikrobiellen, C-terminalen Teil zu aktivieren.

Aktivierung

LL-37/hCAP-18 wird beim Mensch von Serin-Proteasen aktiviert und dabei in einen Cathelin-ähnlichen N-terminalen Teil und einen C-terminalen, antimikrobiellen Teil von 38 Aminosäuren oder weniger gespalten. Das Peptid wird in Neutrophilen in einer inaktiven pro-Form in spezifischen Granula gespeichert und nach der Sekretion durch die Serin-Protease Proteinase-3 aktiviert (Sørensen et al., 2001). Im Samenplasma wird von dem Pro-Peptid von der Protease Gastricin das antimikrobielle Peptid ALL-38 abgespalten

(Sørensen et al., 2003). Auf der Haut werden durch Serin-Proteasen der Kallikrein-Familie mehrere kleine Peptide, mit veränderter und erhöhter antimikrobieller Aktivität als LL-37, gebildet (Murakami et al., 2004; Yamasaki et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Cathelin-ähnliche Prosequenz ebenfalls signifikante antimikrobielle und antiprotease Aktivität besitzt (Zaiou et al., 2003).

Regulation

LL37/hCAP-18 wird von unterschiedlichen Zelltypen in verschiedenen Geweben gebildet. Beim Menschen wird es durch Epithelzellen der Hornhaut, Keratinozyten, Atemwegsepithelzellen und intestinalen Epithelzellen gebildet (Agerberth et al., 1995; Dorschner et al., 2001; Nilsson et al., 1999), es wird aber auch von Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen abgegeben (Agerberth et al., 2000). Durch die Analyse der Promotorregion des Cathelizidin Gens in unterschiedlichen Spezies sind Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NF-IL-6, *acute phase response factor* und IFN γ bindende Sequenzen (Frohm et al., 1997; Gudmundsson et al., 1996; Wu et al., 2000; Zhao et al., 1995a) und ein Vitamin-D bindendes Element identifiziert worden (Gombart et al., 2005). In Neutrophilen, im Knochenmark und im Hoden wird die Expression des humanen Cathelizidin hCAP-18/LL-37 durch inflammatorische Stimuli oder durch eine Infektion induziert (Agerberth et al., 1995; Cowland et al., 1995). In humanen und murinen Mastzellen kann die Expression durch bakterielle Komponenten wie Lipopolysaccharid (LPS) oder Lipoteichonsäure (LTA) induziert werden (Nardo et al., 2003). In Epithelzellen des Darms wird die Expression durch kurzkettige Fettsäuren über einen Erk-abhängigen (*extracellular signal regulated protein kinase*) Signalweg reguliert (Schauber et al., 2003). Die Regulation in humanen Makrophagen wird durch Toll-like Rezeptoren gesteuert und über Vitamin D vermittelt (Gombart et al., 2005; Liu et al., 2006). Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Exposition mit Sonnenlicht (UVB-Strahlen) und der Induktion der hCAP-18/LL-37 Expression durch TLR-2 Agonisten wie *Mycobacterium tuberculosis*.

Sonnenlicht, insbesondere die darin enthaltenen UVB-Strahlen, lösen in Monozyten und Keratinozyten eine Umwandlung von 7-Dehydroxycholesterol in Vitamin D₃ aus, dass dann durch die Vitamin-D Hydroxylase in bioaktives 1,25-Dihydroxy-D₃ (1,25-D₃) reduziert wird (Mallbris et al., 2005). TLR-2 Liganden, wie Zellwandbestandteile von *M.tuberculosis*, aktivieren TLR2/1 Heterodimere auf der Zelloberfläche zirkulierender Makrophagen und induzieren dadurch die Expression des Vitamin-D Rezeptors (VDR) in der Zelle. Die Aktivierung des VDR durch 1,25-D₃ und damit seine Kerntranslokation bewirkt unmittelbar die Expression von hCAP-18/LL-37 über die VDR-bindende Sequenz im Promoter des CAMP-Gens (Gombart et al., 2005; Liu et al., 2006). Verwundungen

der Haut führen ebenfalls zu einer Vitamin-D abhängigen hCAP-18/LL-37 Expression. Keratinozyten werden dabei durch TGF- β 1 oder TLR2/6 Liganden aktiviert, was zu einer Expression der 1 α -Hydroxylase CYP27B1 führt, die an der Synthese von 1,25-D3 beteiligt ist. Als Konsequenz wird mehr 1,25-D3 gebildet, was zu einer Expression von hCAP-18/LL-37, TLR-2 und CD-14 führt. Höhere TLR-2 Konzentrationen ermöglichen den Keratinozyten besser auf TLR-2 Liganden zu reagieren, was wiederum zu einer erhöhten hCAP-18/LL-37 Expression führt (Schauber et al., 2007).

Die Induktion der Expression von hCAP-18/LL-37 in Lungenepithelzellen kann ebenfalls durch Vitamin-D reguliert werden. Die Inkubation von primären Atemwegsepithelzellen mit Vitamin-D führte nach 12 h zu einer 10-fach erhöhten Induktion der Cathelizidin Genexpression, die durch eine Co-Inkubation mit Kalzium nochmals um den Faktor 2 gesteigert werden konnte. Funktionelle Studien zeigten einen Anstieg der antimikrobiellen Aktivität der mit Vitamin-D3 behandelten Zellen, woraus man schließen kann, dass in diesem Modell Cathelizidin in eine biologisch aktive Form umgewandelt wird (Yim et al., 2007).

1.1.2.2 Defensine

Klassifizierung, Expression und Struktur

Die Defensine der Vertebraten werden in 3 größere Gruppen untergliedert, die sich durch ein hoch konserviertes Muster von Disulfidbrücken unterscheiden (Ganz and Lehrer, 1995). Sie sind allgemein charakterisiert durch ihren kationischen Charakter mit einer Nettoladung von +1 bis +11, ihre kurze Sequenz (18 bis 45 aa) und 3 intramolekulare Disulfidbrücken. Defensine werden nicht durch Glykosylierung oder Acetylierung modifiziert und bilden typischerweise Tertiärstrukturen, die aus antiparallelen β -Faltblättern bestehen. Auf Grund des Abstands der einzelnen Cysteine zueinander und der Verknüpfung durch Disulfidbrücken untereinander, werden sie in α -Defensine, β -Defensine und zyklische θ -Defensine eingeteilt.

Die α -Defensine 1-4 wurden zuerst aus azurophilen Granula von Neutrophilen isoliert. Daher bezeichnet man sie auch als HNP1-4 (*human neutrophil peptides 1-4*) (Ganz et al., 1985; Hill et al., 1991; Selsted and Harwig, 1989; Wilde et al., 1989). Die sechs Cysteine der α -Defensine sind untereinander 1-6, 2-4, 3-5 verknüpft und die Konsensus-Sequenz der α -Defensine lautet $x_{1-2}C_xCR_{x_{2-3}}C_{x_3}Ex_3GxC_{x_3}G_{x_5}CC_{x_{1-4}}$, wobei x eine beliebige natürliche Aminosäure sein kann (siehe Abb. 3). HNP1-4 werden von Neutrophilen in die Atemwegsflüssigkeit der größeren Atemwege oder Alveolen abgegeben. Die humanen α -Defensine 5 und 6 (HD-5, HD-6) findet man vorwiegend im Verdauungstrakt (Jones and Bevins, 1992, 1993).

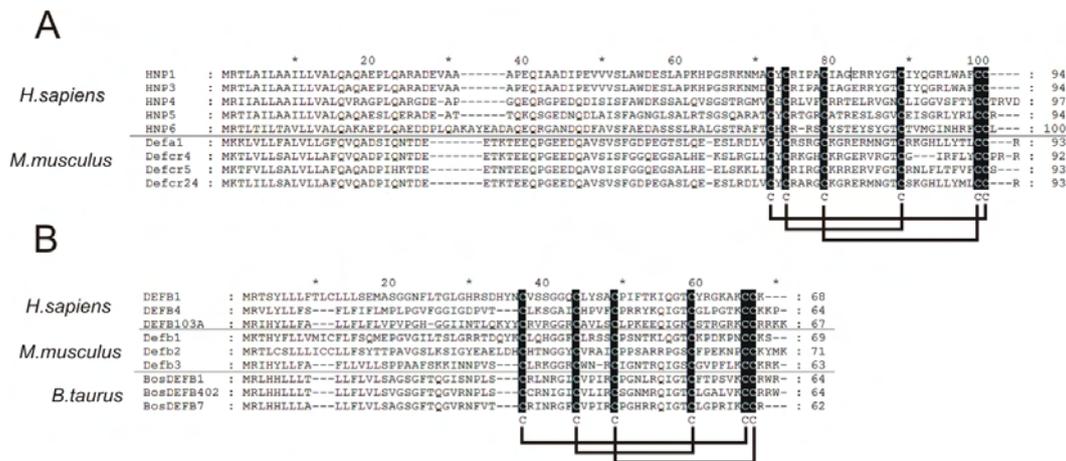


Abbildung 3: Das Muster der Disulfidbrücken ist innerhalb der Spezies konserviert. In (A) ist die Aminosäuresequenz einiger α -Defensine des Menschen und der Maus dargestellt mit den typischen Verknüpfungen der Cysteine über Schwefelbrücken. In (B) ist die Aminosäuresequenz einiger β -Defensine gezeigt, die ebenfalls das typische Verknüpfungsmuster der Cysteine zeigen.

Das erste β -Defensin hBD-1 (*human beta-defensin-1*) wurde aus Hemofiltrat isoliert (Bensch et al., 1995). Es wird konstitutiv von Epithelien des Harnleiters und des respiratorischen Traktes gebildet (Goldman et al., 1997; McCray and Bentley, 1997; Valore et al., 1998) und wird von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen sezerniert. Die charakteristischen sechs Cysteine sind untereinander 1-5, 2-4, 3-6 verknüpft und die Konsensussequenz lautet $x_{2-10}C_{x5-6}(G/A)x_{x3-4}C_{x9-13}C_{x4-7}CC_{x_n}$, wobei x wieder jede beliebige natürliche Aminosäure sein kann. Humanes β -Defensin-2 (hBD-2) wurde mit chromatographischen Methoden aus psoriatischen Hautläsionen isoliert (Harder et al., 1997) und spielt in der Pathogenese dieser Krankheit eine wichtige Rolle (de Jongh et al., 2005; Gambichler et al., 2008; Hollox et al., 2008; Nomura et al., 2003). Etwa zur gleichen Zeit wurde hBD-2 in Atemwegsepithelzellen durch bioinformatische Methoden identifiziert und isoliert (Bals et al., 1998a). Ein anderes Mitglied der Familie der β -Defensine, hBD-3, wurde parallel durch Bioscreening und bioinformatische Methoden identifiziert (García et al., 2001a; Harder et al., 2001; Jia et al., 2001), mittlerweile aber auch in Muttermilch, den Atemwegen und im Serum gefunden (Armogida et al., 2004; Ishimoto et al., 2006). hBD4 wurde zuerst durch die Analyse genomischer DNA-Sequenzen entdeckt (García et al., 2001b), dann aber auch in den unteren Atemwegen und der Haut gefunden (Trivedi et al., 2006; Yanagi et al., 2005). Durch den vermehrten Einsatz bioinformatischer Methoden und die Entstehung detaillierter genomischer Datenbanken, hat sich der Zeitraum, in dem neue Gene entdeckt werden stark verkürzt. So wurden allein durch Computer-basierte Datenbankrecherche des humanen und murinen Genoms bis zu 28 neue humane und 43

neue murine β -Defensin Gene in 5 unabhängigen chromosomalen Regionen identifiziert (Schutte et al., 2002).

Die dritte Klasse der Defensine, die in Säugetieren vorkommen, wurde bis jetzt allein in Neutrophilen und Monozyten von Rhesusaffen und Pavianen gefunden und wird als θ -Defensine oder Retrozykline bezeichnet. Auf molekularer Ebene bilden die θ -Defensine eine zirkuläre Struktur, die aus zwei verkürzten α -Defensinen besteht (Garcia et al., 2008; Tang et al., 1999; Tran et al., 2002). Genau wie α - und β -Defensine sind sie gegen ein breites Spektrum von Bakterien und Pilzen antimikrobiell aktiv und können Monozyten des peripheren Blutkreislaufs vor der Infektion durch einige HIV-Stämme schützen (Fuhrman et al., 2007; Münk et al., 2003; Wang et al., 2007, 2006c, 2004b). Im Gegensatz zu den anderen bis jetzt charakterisierten Defensinen, ist die antimikrobielle Aktivität der θ -Defensine nicht salzabhängig (Selsted, 2004). Eine phylogenetische Analyse mehrerer Altwelt- und Neuweltaffen hat ergeben, dass θ -Defensine nur von Altweltaffen gebildet werden, während Menschen, Schimpansen, Bonobos und Gorillas nur θ -Defensin Pseudogene besitzen, bei denen die mRNA eine Mutation im Bereich der Signalsequenz besitzt, die ein Stopp-Codon erzeugt und so die Translation des reifen Genprodukts verhindert (Nguyen et al., 2003).

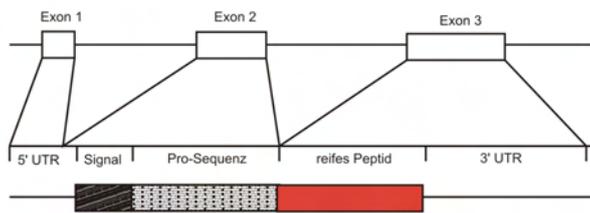
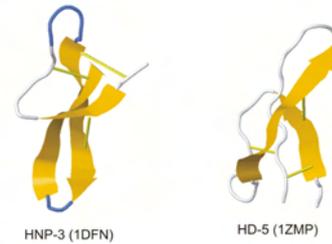
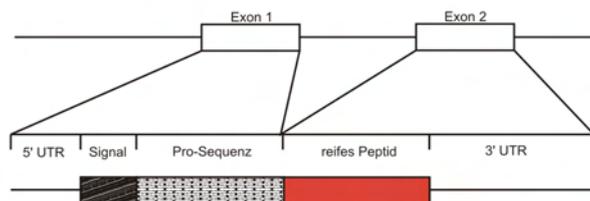
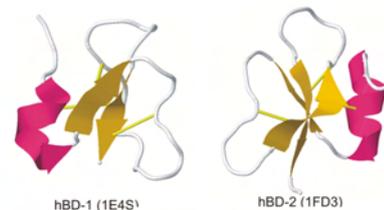
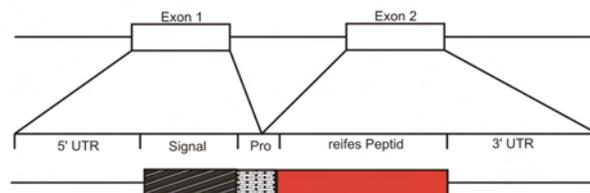
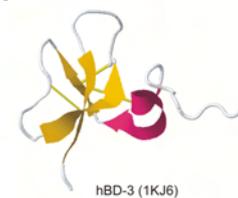
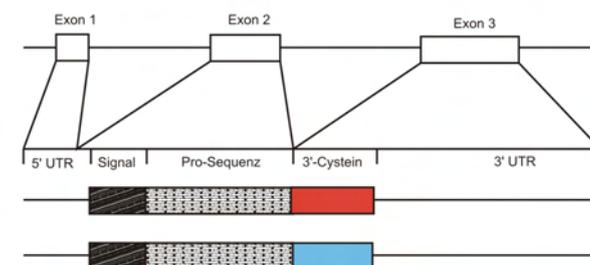
Genomische Organisation

Die Genfamilie der Defensine in Säugetieren ist bei Menschen und Schimpansen an 5 unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert, beim Menschen jedoch hauptsächlich auf Chromosom 8p22-23. Bei Ratten, Mäusen und Hunden sind die Defensincluster auf 5 Bereiche im Genom verteilt, das bei der Maus hauptsächlich auf Chromosom 8A3 liegt (Patil et al., 2005; Schutte et al., 2002). Man kann davon ausgehen, dass sich die Defensine aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben, wobei die β -Defensine als die ursprünglichsten gelten (Linzmeier and Ganz, 2005).

Die Defensine sind auf 2-3 Exons kodiert, wobei die 5'UTR, das Signalpeptid und das Propeptid von dem ersten und teilweise dem zweiten Exon kodiert werden. Das terminale Exon kodiert das reife Peptid und die 3'UTR. Für die α -Defensine existieren zwei unterschiedliche Varianten: HD-5 und HD-6, die vorwiegend im Verdauungstrakt exprimiert werden, besitzen 2 Exons. Auf dem ersten Exon wird der 5'UTR und das Signal- und Propeptid kodiert, das reife Peptid und die 3'UTR werden von dem zweiten Exon kodiert. Die myeloiden α -Defensine HNP1-4 besitzen 3 Exons, wobei das erste Exon die 5'UTR enthält, das zweite Exon das Signal- und Propeptid kodiert und das dritte Exon das reife Peptid und die 3'UTR enthält. Die β -Defensine werden einheitlich auf 2 Exons kodiert, wobei das erste Exon die 5'UTR, das Signalpeptid und einen Teil des Propeptids enthält und das zweite Exon einen Teil des Propeptids, das reife Peptid

und die 3'UTR kodiert. θ -Defensine bestehen aus zwei verkürzten α -Defensinen, die in ihrer Exon-Struktur denen der myeloiden α -Defensine entsprechen und 4 Aminosäuren nach der carboxyterminalen Seite des vierten Cysteins im reifen Peptid ein Stopp-Codon enthalten. Zwei verkürzte α -Defensin Propeptide werden durch Splicen „Head-to-Tail“ miteinander verknüpft und ergeben dadurch ein zyklisches Polypeptid, dass durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird (siehe Abb. 4). θ -Defensine sind die einzigen bekannten zyklischen Polypeptide in Tieren.

Polymorphismen der Defensin-Gene sind sowohl für α - als auch für β -Defensine bekannt. Die α -Defensin Gene für HNP1 (DEFA1) und HNP3 (DEFA3) variieren in der Anzahl der Kopien als auch der genomischen Lokalisation im 19-kb großen Tandem-Repeat auf Chromosom 8p23.1 (Aldred et al., 2005; Mars et al., 1995). Dabei korreliert die Anzahl der Kopien mit der RNA-Konzentration von HNP1 und HNP3 in Leukozyten (Aldred et al., 2005). Beim β -Defensin Gencluster, dass die Gene für hBD2 (DEFB4), hBD3 (DEFB103) und hBD4 (DEFB104) umfasst und bis zu 240 kB groß ist, reicht die Anzahl der Kopien von 1 bis 12, wobei am häufigsten 2 bis 7 Kopien vorhanden sind (Hollox et al., 2003). Eine niedrige Kopienzahl des Genclusters korreliert mit einem erhöhten Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Morbus Crohn ≤ 3 Kopien des DEFB-4 Gens besitzen, während sich bei gesunden Menschen ≥ 4 Kopien des hBD-2 kodierenden Gens finden (Fellermann et al., 2006). Eine weitere Studie an einem Holländischen und Deutschen Patientenkollektiv konnte zeigen, dass die Zahl der Genkopien dieses Bereiches positiv mit dem Risiko an Psoriasis zu erkranken korreliert (Hollox et al., 2008).

α -DefensineMyeloische α -DefensineGastrische α -Defensine β -Defensine θ -Defensine

Ausschneiden
und Ligation



Abbildung 4: Die Struktur der Defensingene und der Peptide (verändert nach Selsted and Ouellette (2005)). Links ist die genomische Struktur der Defensingene dargestellt. Defensine bestehen typischerweise aus zwei Exons, eine Ausnahme bilden die myeloischen α -Defensine, die aus drei Exons bestehen. Die θ -Defensine entstehen aus der Ligation von zwei verkürzten myeloischen α -Defensinen und enthalten daher auch drei Exons. Auf der rechten Seite ist die Tertiär-Struktur einiger Defensine dargestellt. Die Strukturbilder wurden mit Hilfe von Firstglance (<http://firstglance.jmol.org>) und den pdb-Bezeichnungen („*protein data bank*“, Koordinaten von 3D-Protein- und Peptid-Strukturen) der jeweiligen Peptide erstellt. α -Helices sind in pink dargestellt, β -Faltblattstrukturen in gelb, die Disulfidbrücken sind hellgelb markiert.

Regulation der Defensine

Die Expression der Defensine kann abhängig vom Zelltyp und Stimulus sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein. Die myeloiden α -Defensine HNP1-4, die α -Defensine des Verdauungstrakts HD-5 -6 und hBD-1 werden konstitutiv exprimiert (Bensch et al., 1995; Ganz et al., 1985; Jones and Bevins, 1992, 1993; Zhao et al., 1996). Proinflammatorische Stimuli, Bakterien, Viren oder Pilze führen zu einer Induktion der Expression von hBD-2, hBD-3 und hBD-4 (Donnarumma et al., 2004; Duits et al., 2003; García et al., 2001a,b; Harder et al., 2001, 1997, 2000), die damit einen wesentlichen Beitrag zur angeborenen Abwehrreaktion der Epithelien beitragen. Für die Regulation der Expression von Defensinen in Epithelzellen liegen bislang nur Daten für hBD-2 vor. Die Induktion der hBD-2 Expression kann sowohl über den NF- κ B Signalweg (Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2002), AP-1 (Wehkamp et al., 2006) und über MAPKs (Krisanaprakornkit et al., 2002) erfolgen. Die NF- κ B abhängige Induktion von hBD-2 in Atemwegsepithelzellen scheint dabei über lösliche Faktoren, die nach bakterieller Stimulation von Monozyten abgegeben werden, verstärkt zu werden (Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2003). Dabei müssen zur effektiven Aktivierung der hBD-2 Transkription beide im Promoter vorhandenen NF- κ B Bindestellen mit p50-p65 Heterodimeren besetzt sein (Kao et al., 2008). In Atemwegsepithelzellen kann die Expression von hBD-2 noch über einen NF- κ B unabhängigen Weg über den Transkriptionsfaktor MEF („*myeloid ELF-1-like factor*“), einem Mitglied der Familie der ETS Transkriptionsfaktoren induziert werden (Lu et al., 2004).

Die Expression von hBD-2 in Atemwegsepithelzellen erfolgt durch einen TLR-2 abhängigen Weg nach der Stimulation der Zellen durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und kann durch eine Erhöhung der hBD-2 mRNA-Konzentration und Proteinkonzentration nachgewiesen werden (Hertz et al., 2003). Die Induktion der hBD-2 Expression nach einer Stimulation der Zellen mit LPS ist außerdem CD14-abhängig (Becker et al., 2000) und kann durch Neutrophile Elastase ausgelöst werden (Griffin et al., 2003). Da die Promoterregion des hBD-2 Gens auch Bindestellen für den Vitamin-D Rezeptor enthält, bewirkt die Applikation von 1,25D3 nicht nur eine Induktion des TLR Co-Rezeptors CD14, sondern auch eine verstärkte hBD-2 Expression in Keratinozyten, Monozyten, Neutrophilen und der humanen Lungenepithelzelllinie Calu-3. Die erhöhte hBD-2 Expression korreliert dabei mit einer verstärkten antimikrobiellen Aktivität gegenüber *P.aeruginosa* und *E.coli* (Wang et al., 2004a).

1.1.2.3 Biologische Funktionen antimikrobieller Peptide Die Hauptfunktion der antimikrobiellen Peptide besteht in ihrer antimikrobiellen Aktivität. α -Defensine, β -Defensine und Cathelizidine zeigen eine antimikrobielle Wirkung gegenüber Gram positiven und Gram negativen Bakterien, Viren und Hefen, besonders unter niedrigen Salz- und

Plasmaproteinkonzentrationen (García et al., 2001a,b; Harder et al., 2001, 1997). α -Defensine sind außerdem noch wirksam gegen einzellige Parasiten (Eckmann, 2003). Der Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung besteht sehr wahrscheinlich in einer Permeabilisierung der Zellmembran, ist aber im Detail noch nicht verstanden. Es werden dafür mehrere Modelle vorgeschlagen, die alle eine Anlagerung der Peptide an die Membran vorsehen, woraufhin es zu einer Störung der Integrität der Membran kommt und sich Poren bilden können, durch die dann Metabolite der Mikroorganismen entweichen können oder es durch einen freien Ionenfluß zu einer Störung des Membranpotentials kommt (Brogden, 2005; Lehrer et al., 1989).

Komponenten der Atemwegsflüssigkeit können die Wirkung antimikrobieller Peptide negativ beeinflussen. Entzündliche Krankheiten der Atemwege wie COPD oder chronisches Asthma sind Risikofaktoren für eine bakterielle Infektion der Atemwege (Martin et al., 2001; Murphy, 2006). Gründe könnten in einer Beeinträchtigung des Mucus-Transports liegen (Chilvers and O'Callaghan, 2000), einer Inaktivierung des Immunsystems durch pro-inflammatorische Zytokine (Beisswenger et al., 2006) oder in einer Inaktivierung der antimikrobiellen Peptide durch bakterielle Proteasen (Schmidtchen et al., 2002). LL-37 interagiert mit Mucinen in der Atemwegsflüssigkeit und wird dadurch in seiner Wirkung beeinflusst, was besonders bei Krankheiten wie cystischer Fibrose eine Rolle spielen kann (Felgentreff et al., 2006; Smith et al., 1996). α -Defensine können auch mit Antiproteasen wie α 1-Antitrypsin interagieren und dadurch ihre Antiprotease-Aktivität behindern, was zu einer Verstärkung der Inflammation führt (Panyutich et al., 1995).

Neben der antimikrobiellen Aktivität besitzen diese Peptide weitere biologisch relevante Funktionen. Auf Grund ihres hohen kationischen Potentials, könne Defensine nicht nur mit mikrobiellen Zellmembranen interagieren, sondern auch mit eukaryotischen Zellen. Das spielt besonders bei Krankheiten mit einer persistierenden Inflammation eine Rolle, wie man es z.B. bei chronischer Bronchitis oder zystischer Fibrose beobachtet (Ashitani et al., 1998; Soong et al., 1997). Die hohen Konzentrationen von α -Defensinen in den Atemwegssekreten dieser Patienten können eine direkte zytotoxische Wirkung auf die eigenen Zellen haben (Aarbiou et al., 2006; Wetering et al., 1997a) und führen zudem zu einer Exazerbation der Entzündung durch die proinflammatorischen Eigenschaften der α -Defensine (van Wetering et al., 2002; Wetering et al., 1997b), die ein Einströmen von Neutrophilen zur Folge hat (Aarbiou et al., 2006). Die bereits erwähnte kationische Natur der antimikrobiellen Peptide hat aber auch zur Folge, das z.B. Cathelizidin in der Lage ist, LPS zu binden und zu inaktivieren (Hirata et al., 1994b) und damit im Tiermodell vor septischem Schock schützen kann (Brackett et al., 1997). Viele antimikrobielle Peptide haben eine chemotaktische Wirkung auf Zellen des erworbenen Immunsystems. Die Defensine HNP1-3, hBD-1, hBD-2, hBD-3, mBD-2 (murines β -Defensin-2) und

mBD-3 sind chemotaktisch für unreife dendritische Zellen (Yang et al., 2004), humane α -Defensine sind chemotaktisch für Lymphozyten und HNP1-3 wirken über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor chemotaktisch auf Monozyten (Chertov et al., 1996; Yang et al., 2000a). Das humane Cathelizidin LL-37 bindet an den FPRL1-Rezeptor („*formyl peptide receptor-like 1*“), der von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten exprimiert wird (Yang et al., 2000b). LL-37 unterdrückt durch seine Interaktion mit dem FPRL1-Rezeptor und P2X₇-Rezeptoren auf Neutrophilen die neutrophile Apoptose bei bakteriellen Infektionen (Nagaoka et al., 2006). Daneben fördert LL-37 die Angiogenese und Neovaskularisation (Koczulla et al., 2003) und das Wachstum von Atemwegsepithelzellen und Lungenkrebszellen (Shaykhiev et al., 2005; von Haussen et al., 2008).

Obwohl neben den oben aufgezählten Eigenschaften noch eine Vielzahl an rezeptorvermittelter Aktivität antimikrobieller Peptide bekannt sind, ist die biologische Bedeutung bislang unklar, da es bis jetzt nicht bewiesen ist, ob die antimikrobielle Peptide als Hauptliganden an den entsprechenden Rezeptoren agieren oder die Aktivität andere Liganden mit dem Rezeptor modulieren.

1.2 Der NF- κ B Signalweg

NF- κ B wurde ursprünglich als DNA-bindender Faktor an das transkriptionsverstärkende Element der leichten Immunglobulin- κ Kette in aktivierten B-Zellen (Sen and Baltimore, 1986) entdeckt. Weitere Analysen zeigten, dass NF- κ B ein universeller Transkriptionsfaktor ist, der in allen Zelltypen vorhanden ist und die Transkription unterschiedlichster Gene und zellulärer Prozesse steuert (Baldwin, 1996; Lenardo and Baltimore, 1989). Die NF- κ B Transkriptionsfaktoren gehören zu einer Familie von Proteinen, die eine N-terminale Rel-Domäne besitzen. Dieses etwa 300 Aminosäuren lange Sequenzmotiv wurde zuerst in einem Oncogen eines Gammaretrovirus von Vögeln identifiziert (Rel = Reticuloendotheliose Virus) (Chen et al., 1983). Zu den Rel-Proteinen gehören zwei Familien von Transkriptionsfaktoren, die NF- κ B Transkriptionsfaktoren und die NFAT-Transkriptionsfaktoren („*nuclear factor of activated T-cells*“). Beide Transkriptionsfaktoren müssen Hetero- oder Homodimere bilden wenn sie in den Zellkern wandern, um dort an die DNA zu binden und die Gentranskription zu initiieren oder zu modulieren. Für beide Aktionen ist die Rel-Domäne essentiell, da sie sowohl für die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die Kerntranslokation verantwortlich ist.

NFAT-Transkriptionsfaktoren sind an der Aktivierung von T-Zell Rezeptoren, Entzündungsreaktionen, dem osmotischem Gleichgewicht (Macian, 2005), aber auch am Zellwachstum und der Entwicklung in unterschiedlichen Zelltypen beteiligt (Benedito et al., 2005; Hogan et al., 2003).

Die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren sind an unterschiedlichsten Prozessen in der Zelle beteiligt. Dazu gehören inflammatorische Reaktionen, Funktionen in der Immunantwort sowie Entwicklungsprozesse, Zellwachstum und Apoptose (Baldwin, 1996). Sie sind eine Familie von hoch konservierten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren, die bei einer Vielzahl von Organismen wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Wasserman, 1993), und auch bei einfacheren Lebewesen wie den *Cnidaria* (Seeanemonen und Korallen) (Sullivan et al., 2007) und den *Porifera* (Schwämme) (Gauthier and Degnan, 2008) nachgewiesen werden konnten. Unter den gebräuchlichsten eukaryotischen Modellorganismen sind NF- κ B Proteine bei der Hefe und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nicht nachweisbar, wobei *C.elegans* den NF- κ B Signalweg evolutionsgeschichtlich verloren hat und Hefe einige Haupteffektorfunktionen des NF- κ B Signalwegs, wie Inflammation und Immunität, nicht besitzt (Graef et al., 2001).

1.2.1 Signaltransduktion

NF- κ B Transkriptionsfaktoren sind im nicht-stimulierten Zustand an inhibitorische Proteine gebunden oder werden als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert, die überwiegend im Zytoplasma zu finden sind und keine Gentranskription im Zellkern beeinflussen können. Zu den NF- κ B Proteinen gehören fünf verschiedene Untereinheiten, die Hetero- und Homodimere bilden und alle als gemeinsames Merkmal eine Rel-Domäne besitzen, von denen jedoch nur RelA (p65), RelB und cRel auch eine Transaktivierungs-Domäne (TAD) haben, und damit die Gentranskription auslösen können. Die anderen Untereinheiten, p50 und p52, haben keine TAD und werden als Vorläuferproteine p100 und p105 im Zytoplasma gebildet (Hayden and Ghosh, 2004). Zur Aktivierung der Transkription über den klassischen NF- κ B-Weg sind deshalb immer Heterodimere oder Homodimere nötig, die aus Untereinheiten mit einer TAD bestehen. Heterodimere aus p50 und p52 oder Homodimere aus diesen Untereinheiten wirken hemmend auf die Gentranskription.

Im inaktiven Zustand binden die NF- κ B Dimere an inhibitorische Proteine, die so genannten I κ Bs („inhibitors of NF- κ B“), I κ B α , I κ B β oder I κ B ϵ und die Vorläuferproteine p100 und p105. Alle I κ B-Proteine besitzen als gemeinsames Merkmal fünf bis sieben Ankyrin-Sequenzmotive, die sich in länglichen Zylindern anordnen und an die Dimerisierungsdomäne der NF- κ B Dimere binden (Hatada et al., 1992). Die Strukturanalysen kristallographischer Modelle von I κ B α und I κ B β mit daran gebundenen Heterodimeren aus p65/p50 oder p65/cRel hat gezeigt, dass I κ B α -Proteine nur die NLS von p65 blockieren, während die NLS von p50 weiterhin zugänglich ist. Dadurch würde der Komplex aus I κ Bs und Rel-Proteinen in den Zellkern translozieren können. Eine Kernexportsequenz von p65 und I κ B α führt jedoch dazu, dass sich der Komplex nur sehr kurz im Zellkern

aufhält und daher überwiegend im Zytoplasma zu finden ist (Huxford et al., 1998; Malek et al., 2001, 2003). Durch die Degradation von I κ B α wird die NLS von p65 wieder frei zugänglich und es kommt zu einer Kernlokalisation von p65/p50.

Bcl-3 und I κ B ζ sind atypische I κ B-Proteine, die ebenfalls Ankyrin-Sequenzmotive besitzen, zusätzlich jedoch die Gentranskription mit NF- κ B Untereinheiten initiieren können (Hayden and Ghosh, 2004). Bcl-3 gehört zu den Proto-Oncogenen, besitzt jedoch eine TAD und kann mit p50 und p52 Hetero- und Homodimere im Zellkern bilden. Der genaue Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch Bcl-3 ist weitgehend unklar. Ein Mechanismus könnte die Stabilisierung der Bindung von p50 Homodimeren durch Bcl-3 an die DNA sein, wodurch die Bindung anderer aktivierender NF- κ B Dimere an den Promoter verhindert werden würde. Dieser Mechanismus könnte eine Rolle bei der LPS Toleranz von Makrophagen spielen (Carmody et al., 2007).

I κ B ζ hat mehr Ähnlichkeit mit Bcl-3, als mit den anderen Mitgliedern der I κ B-Proteinfamilie. Die Expression von I κ B ζ wird in Abhängigkeit von IL-1 und TLR4 Liganden induziert, die eine Kerntranslokation von I κ B ζ bewirken (Hayden and Ghosh, 2004).

Es gibt insgesamt drei Arten der NF- κ B Aktivierung, den kanonischen Weg, den atypischen Weg und den nicht-kanonischen Weg (Perkins, 2007). Am besten untersucht ist der kanonische Weg der NF- κ B Aktivierung, der durch pro-inflammatorische Zytokine, LPS oder die Aktivierung des T-Zell Rezeptors ausgelöst wird (Hayden and Ghosh, 2004). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt hier durch eine Phosphorylierung von I κ B α an mehreren Serin-Resten, was zu einer Ubiquitinierung und der Degradation von I κ B α führt und eine Kerntranslokation des p50/p65 Heterodimers ermöglicht. Die Phosphorylierung von I κ B α wird durch eine Aktivierung des IKK-Komplexes (I κ B-Kinase) initiiert, der aus drei Untereinheiten besteht. Die Aktivität der katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β wird durch mehrere Kopien einer regulatorischen Untereinheit NEMO („NF- κ B *essential modifier*“, auch IKK γ) reguliert. Durch Knockout-Studien konnte gezeigt werden, dass im kanonischen NF- κ B Signalweg IKK β die dominante I κ B-Kinase ist (Pasparakis et al., 2006).

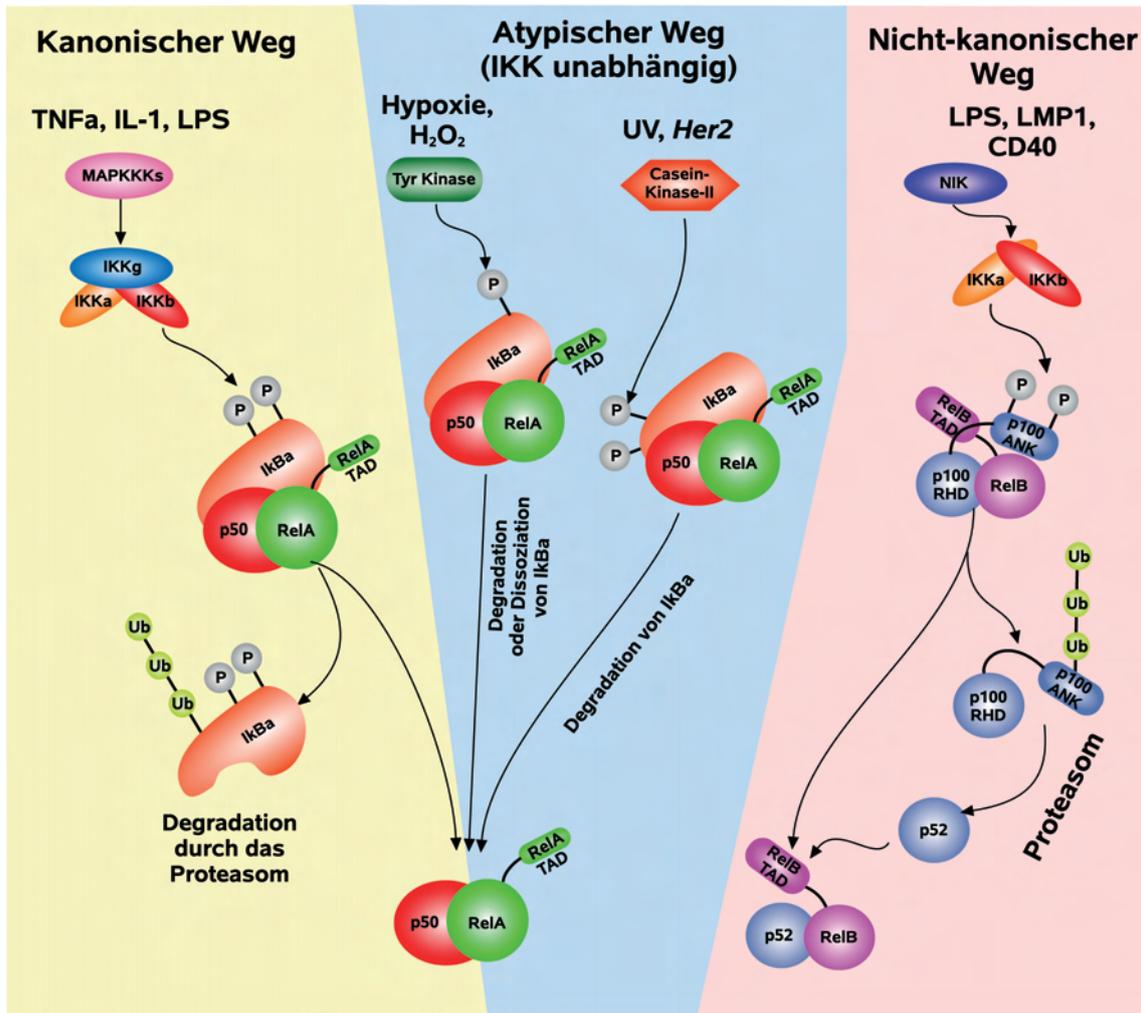


Abbildung 5: Die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs durch verschiedene Liganden und Kinasen. Der kanonische NF- κ B Weg wird IKK-abhängig durch TNF α , IL-1 oder LPS aktiviert und führt nach der Degradation des NEMO-Komplexes (I κ B γ) zu der Kerntranslokation und DNA-Bindung von p50/p65 Heterodimeren. In einer IKK-unabhängigen Aktivierung von p50/p65 (atypischer NF- κ B Weg) wird die Aktivierung von NF- κ B durch H₂O₂, Hypoxie, UV-Strahlung oder die Expression von Her2 (erbB2) gesteuert. Der nicht-kanonische Weg kann durch LPS, LMP1 (Membranprotein des Epstein-Barr Virus) oder CD40 aktiviert werden und führt über NIK („NF- κ B inducing kinase“) zu einer Phosphorylierung von p100 durch IKK α . Eine anschließende Ubiquitinierung und Prozessierung von p100 zu p52 erlaubt die Gentranskription durch p52/RelB Heterodimere (verändert nach Perkins (2007)). I κ B α - I κ B α ; IKK α - IKK α ; IKK β - IKK β ; IKKg - IKK γ ; TNF α - TNF α ; Ub - Ubiquitinierung; P - Phosphorylierung.

Der nicht-kanonische Weg wird unter anderem durch LPS, Lymphotoxin Rezeptoren oder CD40 induziert (Bonizzi and Karin, 2004). Hier werden NF- κ B Heterodimere aus p52 und RelB durch IKK α aktiviert. Der atypische NF- κ B Signalweg beinhaltet eine IKK-

unabhängige Aktivierung von p50/RelA, die im Wesentlichen von Hypoxie, oxydativem Stress oder UV-Strahlung ausgelöst werden kann (Perkins, 2007).

1.3 Zelluläre Funktionen von Hitzeschockproteinen

Hitzeschockproteine (Hsp) wurden durch einen Zufall in den Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster* entdeckt (Ritossa, 1962). Aus Versehen wurde die Temperatur eines Zellinkubators höher eingestellt, als beabsichtigt. Daraufhin kam es zu einem veränderten Genexpressionsmuster in den Speicheldrüsen der darin befindlichen Fliegen. Hitzeschockproteine werden unmittelbar nach der Applikation eines Hitzeschocks exprimiert und finden sich in allen eukaryotischen Lebewesen (Kregel, 2002). Hsps werden nach ihrem apparenten Molekulargewicht in unterschiedliche Familien eingeteilt. Daraus ergibt sich die Benennung in Hsp-25, Hsp-32, Hsp-47, Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90 und Hsp-110.

Unter normalen Bedingungen lagern sich Chaperone an naszierende Proteine an und verhindern deren ungeordnete Faltung während der Synthese, indem sie die Aminosäureketten in einem geordneten Zustand halten, bis die Proteindomäne komplett synthetisiert ist. Sie unterstützen die Translokation von ungefalteten Peptidketten durch die Membran von Organellen. Für Hsp-60 und dem prokaryotischen Homolog GroEL konnte gezeigt werden, dass es die Faltung monomerer Peptidketten (Ostermann et al., 1989) und die Faltung von Untereinheiten oligomerer Proteine in einer ATP-abhängigen Reaktion unterstützt (Zheng et al., 1993). Weitere Untersuchungen mit Hsp-70 zeigten, dass Chaperone Proteine vor der Denaturierung durch Hitzestress schützen (Pelham, 1984) und mit naszierenden Peptidketten an Ribosomen interagieren, um Protein-Untereinheiten so lange in einem geordneten Zustand zu halten, bis die Proteinsynthese einer Untereinheit fertiggestellt ist (Beckmann et al., 1990; Frydman et al., 1994).

Chaperone liegen meistens als Monomere (z.B. Hsp-70) oder als Dimere (Hsp-90 α und Hsp90 β) mit anderen Co-Chaperonen komplexiert im Zytosol vor. Sie haben eine aminoterminal ATPase Domäne, eine carboxyterminale Polypeptid-Bindedomäne und im Falle von Homodimeren eine Dimerisierungsdomäne in der Nähe des C-Terminus. Über die Polypeptid-Bindedomäne findet die Interaktion mit hydrophoben Bereichen von linearisierten oder teilweise denaturierten Proteinen statt. Dabei wird die Kinetik der Interaktion der Chaperone mit dem Substrat über Co-Chaperone reguliert, die die Aktivität der ATPase-Domäne des Chaperons regulieren und den Austausch von hydrolysiertem ATP ermöglichen (Young et al., 2004). Chaperone interagieren mit ihrem Substrat in einer ADP-gebunden Form und dissoziieren von ihrem Substrat weg, nachdem ADP durch ATP mit Hilfe der Co-Chaperone ersetzt wurde.

Außer der klassischen Aufgabe in der Induktion der Thermotoleranz des Organismus werden Hsps durch eine Vielzahl anderer Stimuli induziert, so dass der Terminus Stressproteine passender scheint. Die Induktion von Chaperonen kann Zellen vor dem schädlichen Einfluss von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (Szabó et al., 1996; Wang et al., 1996) oder der LPS-induzierten Apoptose (Wong et al., 1996) schützen.

1.3.1 Alternative Funktionen von Hitzeschockproteinen

Außer protektiven Eigenschaften für die Struktur von Proteinen können Hsps Signalwege der Zelle modulieren. Für Hsp-70 und Hsp-90 ist gezeigt worden, dass sie die Aktivierung von NF- κ B beeinflussen können. Hsp-70 kann durch eine Bindung an IKK γ (NEMO) die Aktivierung von NF- κ B verhindern, indem es die Dissoziation des NEMO-Komplexes unterdrückt, worauf die Phosphorylierung von I κ B α durch IKK β nicht stattfinden kann. Dadurch kommt es zu keiner Aktivierung von p50/p65 Heterodimeren und der darauf folgenden Genexpression (Agou et al., 2002; Ran et al., 2004; Weiss et al., 2007). Hsp-70 kann außerdem in die Signaltransduktion des MyD88-abhängigen TLR-Signalweges eingreifen, indem es durch eine Bindung an TRAF6 dessen Ubiquitinierung und damit Aktivierung verhindert (Chen et al., 2006).

Hsp-90 dagegen scheint für die Aktivierung von NF- κ B essentiell zu sein, da es mit Untereinheiten im IKK-Komplex interagiert. Eine neue Studie zeigt, dass Hsp-90 für die Biosynthese der IKK-Untereinheiten nötig ist und zusammen mit dem Cofaktor Cdc-37 die Reifung des IKK-Komplexes ermöglicht. Weiterhin ist der Hsp-90/Cdc-37-Chaperonkomplex für die Aktivierung des IKK-Komplexes nötig (Broemer et al., 2004; Hinz et al., 2007). Eine Inhibition von Hsp-90 durch Inhibitoren, die die ATPase-Funktion von Hsp-90 inhibieren, oder eine Hitzeschockbehandlung führte zu einem proteasomalen Abbau der IKK-Proteine und einer Inhibition des NF- κ B-Signalwegs (Pittet et al., 2005).

Neben der intrazellulären Funktion bei der Aufrechterhaltung und Initiation der Proteinfaltung und Regulation der NF- κ B Aktivität deuten immer mehr Daten auf eine extrazelluläre Funktion von Hsps als Signalmoleküle und Faktoren in der Vesikelbildung, dem Vesikelrecycling, dem Proteintransport und der Aktivierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems hin. Dabei wird die Aktivität und Spezifität in vielen Fällen über Cochaperone spezifiziert (Young et al., 2003).

Hsp70 kann von Zellen aktiv über einen exosomalen Weg abgegeben werden und mit TLR2 und TLR4 Rezeptoren interagieren. Je nach Zelltyp kommt es danach zu unterschiedlichen Zytokinantworten, die sowohl pro-inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch sein können (Asea et al., 2000, 2002; Hunter-Lavin et al., 2004; Luo et al., 2008; Mezayen et al., 2007; Vabulas et al., 2002). Extrazelluläres Hsp-70 aktiviert Makrophagen und

erhöht spezifisch die Phagozytose der Makrophagen (Vega et al., 2008; Wang et al., 2006b). Es ist ein Adjuvans bei der Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen (Mezayen et al., 2007; Zitzler et al., 2008). Außerdem erhöht extrazelluläres Hsp-70 die Proliferation und zytolytische Aktivität von CD4⁺ T-Helferzellen und die unspezifische Expression von Granzym B (Figueiredo et al., 2008).

Für Hsp-90 ist gezeigt worden, dass es vermehrt an der Oberfläche von Krebszellen zu finden ist. Es konnte eine vermehrte Expression von Hsp-90 an der Zelloberfläche von kleinzelligen Lungenkrebszellen und malignen Melanomen gezeigt werden. Dabei scheint das Protein vor allem für die Metastasierung, Invasion und Migration von Krebszellen verantwortlich zu sein (Tsutsumi and Neckers, 2007). Die Expression von Hsp-90 ist in Tumorzellen etwa 2-10 mal höher, als in normalen Zellen. Eine Inhibition von Hsp-90 in Tumorzellen führte in verschiedenen Xenotransplantations-Modellen zu einem Rückgang des Tumors oder zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber einer konventionellen Therapie (Isaacs et al., 2003; Lang et al., 2007, 2008).

1.4 Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei entzündlichen Infektionen der Atemwege

1.4.1 Pneumonie

Bei einer Pneumonie handelt es sich im Allgemeinen um eine akute oder chronische Entzündung des Lungengewebes, die durch eine Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen hervorgerufen wird. Die Pneumonie wird in drei Klassen unterteilt. Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP, „*community acquired pneumonia*“) ist eine außerhalb des Krankenhauses erworbene Pneumonie, wozu aber auch im Alters- oder Pflegeheim erworbene Pneumonien zählen. Zu den häufigsten Erregern gehören hier *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae* und *Legionella sp.* Die nosokomiale Pneumonie ist eine im Krankenhaus erworbene Pneumonie (HAP = „*hospital acquired pneumonia*“), die erst nach einigen Tagen stationären Aufenthalts auftritt. Eine Sonderform stellt die beatmungsassoziierte Pneumonie (VAP = „*ventilator associated pneumonia*“) dar. HAP und VAP sind häufig mit Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella pneumoniae* (Friedländer-Pneumonie) verbunden.

Risikofaktoren für die Entwicklung einer Pneumonie sind Grunderkrankungen der Lunge, wie z.B. COPD, Mukoviszidose, oder Lungenemphysem. Ein geschwächtes Immunsystem auf Grund einer Chemotherapie, HIV-Infektion, Krebs, Immunsuppression, Diabetes Mellitus oder hohem und niedrigem Alter kann ebenfalls ein Risikofaktor für eine Pneumonie

sein.

1.4.2 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist durch eine nicht vollständig reversible Verengung (Obstruktion) der Atemwege charakterisiert (Rabe et al., 2007; Vogelmeier et al., 2007). Ein weiteres Kriterium ist eine abnorme Entzündungsreaktion, die durch inhalierte Partikel oder Gase verursacht wird. Ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer COPD ist Zigarettenrauch. Die starke inflammatorische Reaktion führt zu einer Zerstörung von parenchymalem Lungengewebe, einer gestörten Immunreaktion sowie Reparatur von zerstörtem Lungengewebe (Hogg, 2004). Ein weiteres Kennzeichen der COPD ist ein Protease-Antiprotease Ungleichgewicht sowie ein erhöhter oxidativer Stress durch eine Störung des antioxidativen Systems. Dies kann eine Konsequenz der abnormen Inflammation in der Lunge sein. Ein Mechanismus, der zu der voranschreitenden Entwicklung eines Emphysems im Verlauf einer COPD führen könnte, ist die vermehrte Freisetzung von Elastase aus Neutrophilen. Die Inaktivierung des protektiven α_1 -Antitrypsins kann durch Oxidantien hervorgerufen werden, die im Zigarettenrauch enthalten sind oder durch Neutrophile in Folge der Inflammation freigesetzt wurden (Hogg, 2004; Pryor et al., 1985). Daneben finden sich noch weitere Proteasen und Antiproteasen in der Lunge, deren funktionelles oder stöchiometrisches Ungleichgewicht ebenfalls zu einer Zerstörung von Lungengewebe, zu einer Verstärkung der Inflammation und zu einem Emphysem führen kann. Ein weiteres Kennzeichen der COPD ist die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Lungenparenchym und den Atemwegen von COPD-Patienten verglichen mit Rauchern ohne COPD und gesunden Menschen. Die vermehrte Apoptose deutet auf eine verringerte Reparatur geschädigten Gewebes hin, was zu einem Gewebeverlust führt und damit eine weitere Möglichkeit für die Entstehung eines Emphysems sein kann (Henson et al., 2006). Ein weiterer Mechanismus, der in der Literatur für die Entstehung einer COPD diskutiert wird, ist eine verringerte Expression von HDAC2 (Histon-Deacetylase 2) in peripherem Lungengewebe und Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten (Barnes, 2008). HDAC2 deacetyliert Histone und bewirkt damit eine Auflockerung des Chromatins, wodurch die Transkription inflammatorischer Gene ermöglicht wird. Die Resistenz gegenüber der Behandlung mit Corticosteroiden bei COPD-Patienten wird durch die verringerte Expression von HDA2 verursacht, da Corticosteroide HDAC2 hemmen. Allerdings ist hier auch wieder die verringerte Expression von HDAC2 auf den oxidativen Stress bei COPD zurückzuführen (Barnes, 2008).

Die COPD wird unter der Verwendung der Lungenfunktion diagnostiziert und klassifiziert. Auf Grund der spirometrischen Untersuchungen wird die COPD in vier Schweregrade

eingeteilt, den sogenannten GOLD-Kriterien (GOLD I-IV, „*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*“) (Rabe et al., 2007). Dabei wird nach der Verabreichung eines Bronchodilators das forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde (FEV₁, „*forced expired volume in 1 second*“, Einsekundenkapazität) ermittelt und der Quotient aus dem FEV₁ und der forcierten Vitalkapazität (FVC) gebildet.

Ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist aktives oder passives Tabakrauchen. Obwohl Tabakrauch der am intensivsten untersuchte Risikofaktor für eine COPD ist, gibt es einige Studien die belegen, dass auch andere Faktoren zur Entwicklung einer COPD beitragen können (Behrendt, 2005; Celli et al., 2005). Für die COPD ist der α_1 -Antitrypsin-Mangel der am besten dokumentierte genetische Risikofaktor für die Entstehung einer COPD (Stoller and Aboussouan, 2005). α_1 -Antitrypsin ein wichtiger Serin-Proteaseinhibitor im Serum. Auf Grund einer Mutation kommt zu einer Fehlfaltung des Proteins, was eine intrazelluläre Akkumulation, eine verminderte enzymatische Aktivität und einen erniedrigten Serumspiegel zu Folge hat. Die Organe, die davon am meisten betroffen sind, ist die Leber als Syntheseort und die Lunge, wo α_1 -Antitrypsin eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung der Neutrophilen Elastase und bakterieller Serin-Proteasen spielt.

Im Verlauf einer COPD sind ein bis zwei Exazerbationen pro Jahr charakteristisch. Exazerbationen sind intermittierende Verschlechterungen im Krankheitsverlauf (Vogelmeier et al., 2007), deren Hauptursache Infekte der Lunge durch Bakterien oder Viren sind. In 20-30% der Fälle ist *Haemophilus influenzae*, gefolgt von *Streptococcus pneumoniae* (10-15%) und *Moraxella catarrhalis* (10-15%) für die Exazerbationen verantwortlich. In etwa 5-10% der Exazerbationen ist die Infektion mit *P.aeruginosa* die Ursache einer Exazerbation. Auch in der stabilen Phase der Erkrankung scheint die Besiedlung der Lunge mit Mikroorganismen den Verlauf zu beeinflussen (Sethi and Murphy, 2008).

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Einfluss von Zigarettenrauch auf das angeborene Immunsystem der Lunge. Die epitheliale Barriere der Atemwege ist ein Teil des angeborenen Immunsystems, das eine wichtige Rolle bei der Abwehr eingedrungener Pathogene in der Lunge spielt. Raucher erkranken häufiger an Infektionen der Atemwege als Nicht-Raucher. Außerdem ist Zigarettenrauch ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer COPD. Im Verlauf einer COPD treten Exazerbationen auf, die in etwa 5-10% der Fälle durch eine Infektion mit *P.aeruginosa* verursacht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit soll der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Rahmen einer Infektion untersucht werden. Dafür wird die Konzentration von hBD-2 im Sputum von Rauchern und Nicht-Rauchern verglichen, die an einer Pneumonie erkrankt sind. Da zelluläre Mechanismen der Pathogenität des Zigarettenrauchs und der Einfluss auf das angeborene Immunsystem weitgehend unbekannt sind, wird ein *in vitro* Brauchungsmodell verwendet. Dabei wird in primären Atemwegsepithelzellen, die vorher ausdifferenziert wurden, der Einfluss von Zigarettenrauch und die Infektion durch *P.aeruginosa* auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems untersucht. Dabei soll neben der Expression und Funktion antimikrobieller Peptide auch die Entzündungsreaktion der Zellen analysiert werden.

Zigarettenrauch enthält eine Vielzahl zytotoxischer und reaktiver Bestandteile. Um die zellulären Mechanismen der Pathogenität des Zigarettenrauchs zu analysieren, soll die Expression von Proteinen des antioxidativen Systems analysiert werden. Da reaktive Bestandteile des Zigarettenrauchs einen Einfluss auf die Faltung und Funktion von Proteinen haben können, wird die Induktion von Chaperonen untersucht, da diese neben ihrer Funktion bei der Faltung von Proteinen auch intra- und interzelluläre Signalwege beeinflussen können.

Da die Aktivierung von NF- κ B durch ROS beeinflusst werden kann und die Transkription von hBD-2 durch NF- κ B induziert wird, sollte der Einfluss von Antioxidantien im Zusammenhang mit Zigarettenrauch und der Infektion mit *P.aeruginosa* an pHBEs untersucht werden. In diesem Zusammenhang wird auch die Aktivierung von NF- κ B nach der Stimulation mit Zigarettenrauch und der Infektion mit *P.aeruginosa* untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

β -Mercaptoethanol	Sigma, Karlsruhe	Katalase	Sigma, Steinheim
1 kb DNA-Leiter	Fermentas	KCl	Roth, Karlsruhe
100 bp DNA-Leiter	Fermentas	KOH	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe	Milchpulver	Sigma, Steinheim
Acetonitril	Roth, Karlsruhe	MgCl ₂	Fluka, Buchs (CH)
Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe	MgSO ₄	Fluka, Buchs (CH)
Agarose	Sigma, Karlsruhe	NaCl	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt	Na ₂ HPO ₄	Fluka, Buchs (CH)
Aprotinin	Sigma, Steinheim	NaOH	AppliChem, Darmstadt
APS	Sigma, Steinheim	PBS	PAA, Pasching, Österreich
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München	Protein Standard (SeeBlue® Plus2)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (CH)	RPMI-Medium	Gibco, Karlsruhe
DMEM	Gibco, Karlsruhe	SDS	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma, Steinheim Merck, Darmstadt	SDS-Probenpuffer (Roti® -Load 1)	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim	Sep-Pak Plus C18 Cartridges	Waters Corp., Massachusetts (USA)
ELISA Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Streptomycin	Gibco, Paisley
Ethanol	Roth, Karlsruhe	TEMED	Sigma, Steinheim
Ethidium Bromid	Sigma, Steinheim	TFA	Fluka, Buchs (CH)
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco, Karlsruhe	Tris	AppliChem, Darmstadt
Glutamax	Gibco, Karlsruhe	Triton-X 100	Fluka, Buchs (CH)
Glyzerin	Roth, Karlsruhe	Tween® 20	Fluka, Buchs (CH)
H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe		
HCl	Roth, Karlsruhe		
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt		

3.1.2 Lösungen und Puffer

BSA-T	5% BSA in PBS, 0,3% Triton X-100
DAPI	1 mg/ml Stammlösung, 1:1000 in PBS, 25 µl pro Probe
ELISA-Beschichtungspuffer	50 mM NaHCO ₃ , pH mit Na ₂ CO ₃ auf pH=9.6 einstellen
ELISA Blocking-Reagenz (10x)	Blocking-Reagenz (27g, Roche, Mannheim) in 100 ml aq.dest., zu 3 ml aliquotiert, bei -20°C gelagert
ELISA Diluent	1% BSA in PBS
Dunn-Carbonate-Puffer	10 mM NaHCO ₃ , 3 mM Na ₂ CO ₃ , pH 9.9, 20% Methanol
Formalin	Formaldehyd (37%) 1:10 in PBS
PBS (1x)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS mit 0,1% Tween® 20
RIPA-Puffer	50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% NP40, 0,5% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 192-250 mM Glyzin, 0,1 % SDS

3.1.3 Patientenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Patientenmaterial vom CAPNETZ gearbeitet, einem deutschen Netzwerk, das epidemiologische und mikrobiologische Daten, sowie den klinischen Verlauf einer CAP erforscht (Welte et al., 2004). Die Aufnahmekriterien für die Patienten sind die klinisch erhobenen Daten für eine Pneumonie und ein positiver Röntgenbefund der Lunge. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der daran beteiligten Institute genehmigt. Die Patienten wurden schriftlich von der Studie unterrichtet und gaben schriftlich ihre Einwilligung. Es wurde mit Sputum von 12 akuten Rauchern und 9 Nicht-Rauchern gearbeitet. Die Raucher hatten ein Durchschnittsalter von 49,9 (±12,8) Jahren und die Nichtraucher waren im Durchschnitt 67 (±14,6) Jahre alt. Die Geschlechterverteilung in den beiden Gruppen lag bei 7:5 (m:w) bei den Rauchern und 5:4 (m:w) bei den Nicht-Rauchern. Die Mortalität war in beiden Gruppen Null.

3.1.4 Peptide

Das Peptid LL-37 wurde im Rahmen dieser Arbeit in antimikrobiellen Assays als Positivkontrolle verwendet. Es ist der c-terminale, antimikrobiell aktive Teil der humanen Cathe-

lizidins hCAP-18/LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-COOH) und wurde von Dr. Peter Henklein (Charité Berlin) synthetisiert. Das im Western-Blot als Positivkontrolle verwendete humane β -Defensin-2 wurde kommerziell bezogen (Abcam plc., Cambridge, UK). Der hBD-2 Standard aus dem ELISA stammt aus unserem Labor und das hBD-2, das in den antimikrobiellen Assays und den Berauchungsexperimenten benutzt wurde, stellte uns freundlicherweise Prof. Schröder aus Kiel zur Verfügung. Es handelte sich dabei um ein Peptid, das aus humanen Hautschuppen aufgereinigt worden ist.

3.1.5 Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit bei Western-Blots und der Immunfluoreszenz verwendet.

Antigen	Spezifität
hBD-2	Kaninchen polyklonal, (Bals et al., 1998a)
Nf- κ B p50 (H-119)	Kaninchen polyklonal, IgG, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Nf- κ B p65 (C-20)	Kaninchen polyklonal, IgG, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
FITC	Huhn, anti-Maus, IgG, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Alexa Fluor® 647	Ziege, anti-Kaninchen, IgG (H+L), Invitrogen
HRP	Esel, anti-Kaninchen, IgG, Amersham, GE-Healthcare, München

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen Alle Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator mit 5% CO₂ kultiviert. Adhärente Zellen wurden zum Vereinzeln mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (2 ml pro 75 cm² Kulturflasche) bei 37°C von der Kulturflasche gelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann in Medium aufgenommen, pelletiert und in Kulturmedium resuspendiert. Nach dem Bestimmen der Zellzahl (siehe 3.2.1.3) wurde die einzusetzende Zellmenge in neuen Zellkulturgefäßen verteilt.

3.2.1.2 Kultivierung primärer humaner Atemwegsepithelzellen im Air-Liquid-Interface System Primäre humane Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden aus der Trachea und den Bronchien von Patientenmaterial durch einen enzymatischen Verdau mit Protease 14 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gewonnen (Bals et al., 2004). Das

Protokoll wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Marburg genehmigt. Die Patienten wurden aufgeklärt und ihre Zustimmung eingeholt. Die Zellen wurden in „Airway epithelial cell growth medium“ (Promocell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Das Medium besteht aus einem Basalmedium mit Phenolrot und einem Aliquot Wachstumsfaktoren und anderer Zusätze, die dem Medium bei Anbruch einer neuen Flasche hinzugefügt wurden. Zusätzlich wurde noch 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Für das Anlegen von *air-liquid-interface* Kulturen wurden primären Epithelzellen, die zuvor in Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert wurden, verwendet. Die Zellen wurden mit Trypsin vereinzelt und auf zuvor mit Kollagen Typ 1 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) beschichteten, semipermeablen Membranen mit einer Porengröße von 0,4 µm (Durchmesser 12 mm, 12 Well; Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA) ausgesät. Die Zelldichte betrug dabei 2,5-3·10⁵ Zellen pro Well. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde das Medium von der apikalen Seite entfernt. Das basolaterale Medium wurde durch eine 1:1 Mischung von DMEM und HAM-F12 mit 2% Ultrosor G (Biosepra, Fremont, USA) ersetzt. Als Grad der Differenzierung wurde die Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*) angenommen, die durch Messung des transepithelialen Widerstandes überprüft wurde. Für die Versuche wurden nur Kulturen verwendet, die mindestens 2 Wochen kultiviert wurden und bei denen ein transepithelialer Widerstand von mehr als 1000 Ω·cm² gemessen wurde. Um donorspezifische Effekte auszuschließen, wurden die Experimente mit Zellen von verschiedenen Patienten wiederholt.

3.2.1.3 Bestimmung des Zelltiters Der Zelltiter eukaryotischer Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zum Bestimmen der Zellzahl wurden gleiche Teile Zellsuspension mit Trypanblaulösung gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. 10 µl des Gemisches wurden nach vorsichtigem Resuspendieren in die Zählkammer pipettiert. Durch die Verwendung von Trypanblau kann zwischen toten und vitalen Zellen unterschieden werden, da tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und tiefblau gefärbt erscheinen. In die Berechnung des Zelltiters gehen nur die vitalen Zellen ein. Zusätzlich muss der Verdünnungsfaktor von 2 einbezogen werden, der von der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau herrührt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet, wobei die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und mindesten 6 Großquadrate ausgezählt wurden:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \cdot 2 \cdot 10^4$$

3.2.1.4 Rauchexposition im Air-Liquid-Interface System Air-liquid-Interface Kulturen von primären Atemwegsepithelzellen wurden in einer Rauchexpositions-kammer Zigarettenrauch ausgesetzt wie von Beisswenger et al. (2004) beschrieben. Der Rauch

einer kommerziell erhältlichen Marlboro 100 Zigarette (11 mg Teer, 0,9 mg Nikotin) wurde mit Luft aus einem Zellinkubator (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) gemischt und durch den Unterdruck einer Membranpumpe in eine Expositionskammer gezogen. Der Luftstrom wurde so eingestellt, dass eine Zigarette in 5 Minuten konstant bis zum Filter abgebrannt war. Die ausdifferenzierten primären Atemwegsepithelzellen wurden dem Rauch von 3 Zigaretten ausgesetzt. Um konstante Bedingungen zu gewährleisten, befand sich die Expositionskammer in einem Zellkulturinkubator (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Referenzkulturen wurden für den gleichen Zeitraum in der Expositionskammer mit warmer und feuchter Inkubatorluft inkubiert. Direkt nach der Rauchexposition wurden die ALI-Kulturen apikal mit Medium oder PBS gewaschen und basal neues Medium gegeben.

3.2.1.5 Zellstimulationen Um den Einfluss von Zigarettenrauch auf die Genexpression und Stimulationsfähigkeit der ALI-Kulturen zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem Berauchen für 8 Stunden mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* PAOI (10⁷CFU/ml in 30 µl PBS) oder für 6 Stunden mit lebendigen *P.aeruginosa* PAOI (10⁴CFU in 15 µl PBS) stimuliert. Die Stimulation erfolgte von der apikalen Seite der ausdifferenzierten ALI-Kulturen. Die Bakterien wurden dazu aus einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀<0,5 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀=1 in LB-Medium wachsen gelassen. Die Bakterien wurden mit PBS verdünnt und direkt in den Versuch eingesetzt oder zum Inaktivieren 30 Minuten bei 95°C inkubiert. Um den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Genexpression zu untersuchen, wurden differenzierte pHBEs 30 Minuten mit und ohne H₂O₂ inkubiert und danach für 8 Stunden mit 10⁷CFU *P.aeruginosa* inkubiert. Zu einigen Kulturen wurde während und nach der Rauchexposition 6400 U/ml Katalase gegeben um den Einfluss von Antioxidantien auf die Genexpression zu untersuchen.

3.2.1.6 Antimikrobieller Assay mit Air-Liquid-Interface-Kulturen Um die Funktion von differenzierten Atemwegsepithelzellen im angeborenen Immunsystem und deren Beeinträchtigung durch Zigarettenrauch zu untersuchen, wurden ausdifferenzierte pHBEs im ALI-Kultursystem wie im Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben mit Zigarettenrauch behandelt und anschließend mit lebendigen *P.aeruginosa* (10⁴CFU in 15 µl PBS) stimuliert. Die infizierten Zellen wurden zusammen mit den entsprechenden Kontrollen für 6 h unter Standardbedingungen in einem Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurde die Apikale Seite der Zellen mit PBS gewaschen, dass in serieller Verdünnung auf Agar-Platten plattiert wurde. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Um die Antimikrobielle Wirkung von hBD-2 in diesem System zu untersuchen, wurde als Positivkontrolle 5 µg gereinigtes hBD-2 eingesetzt.

3.2.1.7 Bestimmung der Zellviabilität Die Diskriminierung zwischen toten und lebenden eukaryotischen Zellen erfolgt üblicherweise über den Zustand der Plasmamembran. Bei toten oder sterbenden Zellen ist die Plasmamembran geschädigt, was zu einer Störung der Ionen- und Stoffkonzentration innerhalb der Zelle und schließlich zu deren Tod führt. Es gibt verschiedene Methoden, diesen Zustand zu quantifizieren. Man kann die Aufnahme von Farbstoffen in tote Zellen messen oder die Abgabe von Stoffen aus sterbenden Zellen in das Medium bestimmen. In diesem Fall wurde Abgabe des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) gemessen. Im ersten Schritt dieser Nachweisreaktion wird durch eine LDH-katalysierte Umwandlung von Lactat zu Pyruvat NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten Schritt überträgt der dazugegebene Katalysator Dihydrophosphat H/H^+ von NADH/H^+ auf das Tetrazoliumsalz INT, dass dadurch zu Formazan reduziert wird. Formazan hat, im Gegensatz zu dem Tetrazoliumsalz INT bei 500 nm ein Absorptionsmaximum. Auf diese Weise kann das Maß der Zellschädigung über die Reduktion eines Formazansalzes quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „Cytotoxicity Kit (LDH)“ der Firma Roche Applied Science verwendet und nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

3.2.2 Gentechnische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolation Die Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit einem Kit von Macherey und Nagel (NucleoSpin RNA II, Macherey Nagel, Düren) nach den Angaben des Hersteller durchgeführt. Dabei wurde das Zelllysats durch Zentrifugation über eine Matrix geleitet, die Nukleinsäuren bindet. Die DNA wurde auf der Matrix durch einen DNase-Verdau zerstört. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution der konzentrierten RNA. Die Konzentration der RNA wurde mit einem Photometer bestimmt und die Proben danach entweder für eine cDNA-Synthese vorbereitet oder bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Abschätzung der Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen Die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über deren Konzentration und Reinheit. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA. Da jedoch aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge ebenfalls Licht absorbieren, wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt, bei der Proteine stärker als DNA Licht absorbieren.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit der Gleichung $c = \frac{E_{260} \cdot k}{d}$ (c - Konzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, E_{260} - Extinktion bei 260 nm, d - Küvettendicke in cm, k - Extinktionskoeffizient in $\mu\text{g}/\text{nm}$ mit $k = 50$ für doppelsträngige DNA und $k = 20$ für einzelsträngige DNA)

ermittelt. Der Quotient aus den Messwerten $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ (E_{260} - Extinktion bei 260 nm, E_{280} - Extinktion bei 280 nm) gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Werte von deutlich unter 1,8 deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

3.2.2.3 cDNA-Synthese Bei einer cDNA-Synthese wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase aus RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) erzeugt. Durch die Wahl eines geeigneten Primers lässt sich entweder die gesamte RNA in cDNA umwandeln (*random hexamer primer*), die mRNA in cDNA übersetzen (*oligo-dT primer*) oder aber eine bestimmte RNA durch spezifische Primer in eine cDNA transkribieren. Im Rahmen der Arbeit wurde mit einem cDNA-Synthese-Kit der Firma Fermentas (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Deutschland) und oligo(dT)₁₈ Primern nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Für die cDNA-Synthese wurde die RNA aus einem Versuch auf ein Volumen normalisiert, dass nicht mehr als 10 µl und 1 µg betrug. Die cDNA wurde nach dem Ende der Synthese mit aq.dest. um den Faktor 10 auf 200 µl verdünnt und davon 5 µl in eine Real-Time-quantitative-PCR eingesetzt.

3.2.2.4 Real-Time-quantitative-PCR (qRT-PCR) Die qRT-PCR wurde für die Quantifizierung der Expression verschiedener Gene benutzt. Das Verfahren beruht auf einer PCR-Reaktion (Saiki et al., 1988), bei der ein Farbstoff (SYBR-Green) während der DNA-Synthese in die neu gebildete DNA interkaliert und am Ende des Zyklus die Fluoreszenz bestimmt wird. Die qRT-PCR wurde mit einem Mastermix der Firma ABgene durchgeführt (ABsolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix, ABgene, Epsom, Surrey, UK). Dafür wurden 5µl der wie in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben gewonnenen cDNA in eine 25 µl Reaktion mit 20 pmol des sense- und antisense-Primers eingesetzt. Die relative Expression eines Zielgens wurde nach der $\Delta\Delta ct$ -Methode bestimmt und auf die Expression der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Haushaltsgen bezogen. Der ct-Wert (*threshold cycle*) beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem die exponentielle Amplifikation des PCR-Produktes beginnt und wurde von dem PCR-Gerät automatisch bestimmt. Um Messungenauigkeiten bei der initialen RNA-Konzentration und der damit verbundenen cDNA-Konzentration auszugleichen, wurden die ct-Werte der Zielgene (ct_{GOI}) auf den ct-Wert des Haushaltsgens GAPDH (ct_{GAPDH}) normalisiert.

$$\Delta ct = ct_{GOI} - ct_{GAPDH}$$

Die relative Induktion eines Gens bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen a und b erhält man durch Berechnung der Differenz der Δct -Werte bei den verschiedenen Versuchsbedingungen.

$$\Delta\Delta ct = \Delta ct_a - \Delta ct_b$$

$$\text{x-fache Induktion} = 2^{-\Delta\Delta ct}$$

Je nachdem, ob die Expression des Zielgens durch die Versuchsbedingungen hoch- oder runterreguliert wird, erhält man positive oder negative $\Delta\Delta ct$ -Werte. Die Grundlage für obige Berechnung ist, dass die PCR-Reaktionen von Zielgen und Haushaltsgen mit der gleichen Effizienz ablaufen. Am Ende der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve der PCR-Produkte generiert, die nochmals Aufschluss über die Qualität der PCR-Reaktion gibt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sek	35
Annealing	T_m	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek	
Finale Elongation	72 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sek	1
Start-Temperatur	60 °C	30 sek	1
Schmelztemperatur	60 °C(+0,5 °C/Zyklus)	10 sek	80
Hold	4 °C	∞	

Verwendete Primer:

Name	sense-Primer	antisense-Primer	T_m
hBD-1	5'-GCC TCA GGT GGT AAC TTT CTC A-3'	5'-GCG TCA TTT CTT CTG GTC ACT-3'	58°C
hBD-2	5'-TCA GCT CCT GGT GAA GCT C-3'	5'-GGG CAA AAG ACT GGA TGA CA-3'	58°C
hBD-3	5'-GCT TTG CTC TTC CTG TTT TTG GTG-3'	5'-GCA CTT GCC GAT CTG TTC CTC C-3'	61°C
MnSOD	5'-GCA CTA GCA GCA TGT TGA GC-3'	5'-GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG-3'	53°C
CuZnSOD	5'-CTG CAG CGT GGG TTT CC-3'	5'-GGA AAC CCC AGA CGC TGC AG-3'	58°C
Trx1	5'-CGA CAT AGG ATG CTC CAA CA-3'	5'-ATT GCC ACT GGT GAA AGA CC-3'	53°C
Katalase	5'-CGT GCT GAA TGA GGA ACA GA-3'	5'-TTG TCC AGA AGA GCC TGG AT-3'	53°C
Hsp70	5'-AGG TGC AGG TGA GCT ACA AGG-3'	5'-GGT CAG CAC CAT GGA CGA G-3'	61°C
Hsp90α	5'-TGG TCC TGT GCG GTC ACT-3'	5'-TGC AGC TCT TTC CCA GAG TCT-3'	58°C
Hsp90β	5'-GTC TGG GTA TCG GAA AGC AAG-3'	5'-CTG AGG GTT GGG GAT GAT GTC-3'	61°C
GAPDH	5'-GAT CAT CAG CAA TGC CTC CT-3'	5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3'	56°C

3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder zur Kontrolle von PCR-Produkten der Realtime-PCR eingesetzt. Die DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit proportional zu ihrer Länge, der Stärke des elektrischen Feldes und der Porengröße des verwendeten Agarose-Gels ist. Die Größe der DNA-Fragmente kann durch einen mitgeführten DNA-Längenstandard abgeschätzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1,5% Agarose-Gele in TBE verwendet. Vor dem Gießen der Gele wurde die flüssige Agarose mit 0,01% (v/v) Ethidiumbromid gemischt. Der Gellauf erfolgte in Biorad Minikammern in 1x TBE bei einer kontinuierlichen Spannung von 60-100 V. Die Gele wurden zur Analyse mit UV-Licht angeregt und fotografiert (GelDoc, BioRad).

3.2.3 Proteinbiochemisch Methoden

3.2.3.1 Antimikrobieller Assay Um die antimikrobielle Aktivität des verwendeten hBD-2 Peptids zu bestätigen, wurde ein antimikrobieller Assay durchgeführt. Dafür wurde *P.aeruginosa* aus einer Übernachtskultur mit LB-Medium auf eine $OD_{600} < 0,5$ verdünnt und anschließend bis zu einer $OD_{600} = 1$ wachsen gelassen. Die Bakterien wurden 1:10000 in PBS verdünnt und 3 h zusammen mit antimikrobiellen Peptiden bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agar Platten verstrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt.

3.2.3.2 Festphasen-Extraktion von Proteinen aus Sputum Festphasenextraktion ist eine Methode zur Anreicherung eines Analyten. In diesem Fall wurden Proteine mit einer Lösung aus 0,1% TFA (v/v) und 10% Acetonitril aus Sputum extrahiert und durch Festphasenextraktion an einer C18-Phase angereichert.

Die Proben wurden mit 10 µl Complete Protease-Inhibitor Lösung gemischt. Durch Zentrifugation (2 min bei 13000 rpm) wurde der schleimige und der wässrige Teil getrennt. Der schleimige, mucin-reiche Teil wurde zum verflüssigen mit 1µl/1mg einer 100mM DTT Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der schleimige Teil der Probe wurde auf Gewicht normiert, der wässrige Teil zu gleichen Volumenteilen eingesetzt. Danach wurden die Proteine mit einer 10%igen Acetonitril-Lösung in 0,1% TFA extrahiert und zusammen mit dem wässrigen Teil der Sputumprobe auf eine SepPack C18 Säule geladen.

Die C18 Säule wurde zuvor mit 10 Säulenvolumen 80% ACN / 0,1%TFA aktiviert und anschließend mit 10 Säulenvolumen 0,1% TFA equilibriert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 3 Säulenvolumen 10% ACN / 0,1 % TFA von der Säule gewaschen

und zu 1 ml aliquotiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 4 Säulenvolumen 80% ACN / 0,1% TFA eluiert und zu 2 ml aliquotiert.

Die Eluate wurden über Nacht in einer SpeedVac getrocknet, in 15 µl 0,1 M NaOH rekonstituiert, mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend gelelektrophoretisch auf einem 10-20% Tris-Tricine Gel aufgetrennt.

3.2.3.3 Gesamtzellextraktion eukaryotischer Zellen unter denaturierenden Bedingungen Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 2 mal mit kaltem PBS gewaschen, danach vom Boden des Zellkulturgefäßes abgeschabt und in ein kaltes Eppendorf-Gefäß überführt. Suspensionszellen wurden direkt aus dem Kulturgefäß in Falcon-Tubes oder Eppendorf-Gefäße überführt, nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS in RIPA-Puffer auf Eis inkubiert und intensiv durchmischt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues gekühltes Eppendorf-Gefäß gegeben und bei -80°C gelagert.

3.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Gesamtproteinkonzentration in Proben zu bestimmen. Alle beruhen im wesentlichen auf dem Prinzip, dass eine Substanz mit dem Protein interagiert, was zu einem Farbumschlag der Lösung führt, dessen Intensität proportional zu der enthaltenen Proteinkonzentration ist. Durch den Vergleich mit einer Standardkurve von Proben mit bekannter Konzentration kann die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde das Micro BCA[®] Kit von Pierce Thermo Scientific (Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA) verwendet. Die Methode ist besonders kompatibel mit interferierenden Substanzen, wie Detergentien, reduzierenden Substanzen und Chelatbildnern und weist gleichzeitig eine gute Linearität über den Detektionsbereich auf. Das Kit hat einen Detektionsbereich von 0,5-20 µg/ml an Gesamtprotein. Cu⁺²-Ionen werden dabei in alkalischem Milieu von Proteinen zu Cu⁺¹-Ionen reduziert und bilden mit zwei Molekülen Bicinchinonsäure einen wasserlöslichen Komplex, der eine starke Absorption bei 562 nm aufweist, die proportional mit der Proteinkonzentration steigt.

3.2.3.5 Subzelluläre Fraktionierung Die subzelluläre Fraktionierung eukaryotischer Zellen wurde angewendet, um die Zellkerne getrennt von zytoplasmatischen Bestandteilen analysieren zu können. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Anweisungen des Herstellers mit einem Kernextraktions-Kit von ActiveMotif (ActiveMotif, Rixensart, Belgien) auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zuerst mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt und danach mit einem hypotonen Puffer lysiert. Durch Zentrifugation wurden die Kerne von

zytoplasmatischen Bestandteilen getrennt. Die Zellkerne wurden durch einen Puffer mit Detergenz und Protease-Inhibitoren lysiert und anschließend durch Zentrifugation von der Kernmembran und Zellmembranfragmenten getrennt.

Die zytosolische Extrakte und die Zellkernextrakte wurden bei -80°C gelagert oder direkt in einen Western-Blot eingesetzt, nachdem mit einem BCA-Proteinnachweis auch gleiche Proteinkonzentrationen normalisiert wurde.

Gesamtzellextrakte wurden durch Verwendung eines Puffers mit Detergenz und Protease-Inhibitoren hergestellt und nach der Normalisierung mit einem BCA-Proteinnachweis (s. 3.2.3.4) direkt in einen Transkriptionsfaktor-ELISA eingesetzt oder bei -80° gelagert.

3.2.3.6 SDS-Gelelektrophorese Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese ist ein diskontinuierliches Trennverfahren, bei dem Proteine nach (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld in Richtung Anode getrennt werden (Laemmli, 1970). Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer denaturiert, so dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein). Durch β -Mercaptoethanol im Probenpuffer werden die Disulfidbrücken in den Polypeptidketten reduziert.

Eine Modifikation der ursprünglich durch Laemmli beschriebenen Gelelektrophorese besteht darin, dass statt Glycin Tricin im Gel verwendet wird, was für eine bessere Auftrennung von Proteinen $>30\text{kDa}$ bei geringerer Acrylamid-Konzentration sorgt (Schägger and von Jagow, 1987). Zur Auftrennung der Proteine aus den extrahierten Sputumproben (siehe 3.2.3.2) wurden 10-20% Tris-Tricin-Gele (Anamed, Darmstadt) verwendet, die zum Einwandern der Proteine in das Gel mit 80 V betrieben wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V. Kernextrakte und zytosolische Extrakte (siehe 3.2.3.5) wurden auf selbst hergestellten 10% Tris-Glycin-Gelen mit 5%-igem Sammelgel aufgetrennt.

3.2.3.7 Western-Blot-Analyse Die Western-Blot-Analyse umfasst den Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran in einem elektrischen Feld und die spezifische Detektion eines Proteins über eine Antikörper-gekoppelte Enzymreaktion mittels Autoradiographie. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine aus dem Gel in einer Tank-Blotting Apparatur (BioRad, München) auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Die Proteine wandern dabei innerhalb eines elektrischen Felds aus dem Gel auf die Membran. Als Puffersystem wird dabei meist der von (Towbin et al., 1979) beschriebene Tris-Glycin Puffer verwendet, der einen pH-Wert von $\text{pH}=8,3$ hat. Für den Transfer von basischen Proteinen wie hBD-2 eignet sich eher

der von (Dunn, 1986) beschriebene Puffer, der einen pH-Wert von pH=9,9 besitzt und auch im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurde.

Der Transfer wurde mit Dunn-Carbonat-Puffer in einer gekühlten Tankblotting Apparatur (BioRad, München) bei einer elektrischen Leistung von 20 Watt durchgeführt. Der Transfer dauerte 1 Stunde. Die in dieser Arbeit verwendeten Tris-Glycin-Gele wurden in dem von Towbin et al. (1979) beschriebenen System geblottet. Nach dem Transfer (Blot) wurde die Nitrozellulose-Membran für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in PBS blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in 5% Milch/PBS inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper folgten 3 Waschschrte für 15 Minuten in PBS und anschließend die Inkubation der Membran mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend folgten 3 Waschschrte mit PBS für jeweils 15 Minuten. Der Nachweis der Peroxidase-Aktivität des sekundären Antikörpers erfolgte mit dem ECL-System der Firma Pierce und autoradiographischem Nachweis auf Röntgenfilm der Firma Agfa.

3.2.3.8 hBD-2 ELISA hBD-2 Konzentrationen in Zellkulturüberständen wurden mit einem in unserem Labor entwickelten ELISA bestimmt. Die Empfindlichkeit des ELISAs liegt bei 0,15-12,5 ng/ml. Die Antikörper, Proben und Standards sind, wenn nicht anders angegeben, in Diluent verdünnt worden. 96-Well Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) wurden mit einem polyklonalen hBD-2 Antikörper aus Kaninchen (Bals et al., 1998a) in Beschichtungspuffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde 3 mal mit PBS-T gewaschen und 2 Stunden bei 37°C mit Blocking-Reagenz nachbeschichtet. Die Platte wurde gewaschen und mit 100 µl Probe oder Standard über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von rekombinantem hBD-2 (Bals et al., 1998a) verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde 3 mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 µl eines polyklonalen hBD-2 Antikörpers (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) beschichtet und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 mal Waschen mit PBS-T wurde die Platte mit einem HRP-gekoppelten Antikörper gegen Ziege (100 µl, 1:40000, Sigma-Aldrich, München) beschichtet und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde 3 mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 µl TMB+ -Substrat (Dako, Carpinteria, CA, USA) pro Probe 10-15 Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 N H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem Spektrophotometer gemessen.

3.2.3.9 Zytokin-ELISA Die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in Zellkulturüberständen wurden mit einem kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA nach den Angaben des

Herstellers durchgeführt (R&D Systems, Wiesbaden). Dazu wurde von berauchten und infizierten pHBEs im ALI-Kultursystem und den jeweiligen Kontrollen nach 6 Stunden aus dem basalen Kompartiment der Transwell-Kulturplatten 1ml Medium entnommen und durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten von nicht löslichen Bestandteilen getrennt und entweder direkt auf die vorbereiteten ELISA-Platten aufgetragen oder bei -80°C für eine spätere Messung gelagert. Für die Messung von IL-8 wurden 100 μl unverdünnte Probe eingesetzt, IL-6 musste mindestens 1:10 mit Diluent (5% BSA in PBS) verdünnt werden. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Spektrophotometer gemessen.

3.2.3.10 Transkriptionsfaktor-ELISA Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotor-Sequenzen auf eukaryotischer DNA kann mit einem „electro-mobility-shift-assay“ (EMSA) nachgewiesen werden. Zellextrakte werden dabei mit markierten DNA-Sonden inkubiert, die aus dem Konsensus-Motiven der DNA-Bindemotive von Transkriptionsfaktoren bestehen und anschließend auf einem nativen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Sonden verändert das Laufverhalten Sonden, die durch unterschiedliche Methoden detektiert und quantifiziert werden können. Dabei gibt es sowohl radioaktive als auch fluoreszenzbasierte Nachweismethoden, abhängig von der Markierung der Sonde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Nachweis der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren ein Mikrotiterplatten-basierter Test der Firma ActiveMotif (ActiveMotif, Rixensart, Belgien, TransAM p65 DNA-binding ELISA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Test hat gegenüber dem EMSA den Vorteil einer erhöhten Sensitivität, einem geringeren apparativen Aufwand und wird ohne Radioaktivität durchgeführt. Der Test verwendet Mikrotiterplatten, die mit DNA-Oligonukleotide mit Konsensus-Bindesequenzen eines Transkriptionsfaktors beschichtet sind. Bei der Durchführung wurde Gesamtzellextrakt gleicher Proteinkonzentration in die Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei binden die aktivierten (normalerweise kernständigen) Transkriptionsfaktoren an die immobilisierten DNA-Bindemotive und können in einem zweiten Schritt mit einem spezifischen, enzymgekoppelten Antikörper nachgewiesen und nach der Zugabe eines Substrates photometrisch ausgewertet werden. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Spektrophotometer gemessen.

3.2.3.11 Immunfluoreszenz Die Immunfluoreszenz wurde im Rahmen dieser Arbeit benutzt, um die Kerntranslokation verschiedener NF- κ B Untereinheiten nach dem Berauchen von differenzierten pHBEs im ALI-Kultursystem zu untersuchen. Differenzierte pHBEs wurden wie im Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben beraucht. Die Zellen wurden apikal mit Medium gewaschen und basal das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit $2 \cdot 10^7$

CFU/ml (in 50 ml PBS) lebenden *P.aeruginosa* PAOI infiziert und für 20 Minuten unter Standardbedingungen in einem Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen apikal und basal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten bei RT mit Formalin (3,7% Formaldehyd in PBS) fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C mit eiskaltem 100%igem Methanol permeabilisiert und danach 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Das Blockieren erfolgte mit 5% BSA-T für 60 Minuten bei RT. Die Zellen wurden mit dem primären Antikörper (120 µl von 1:50 in 5% BSA-T) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 mal Waschen mit PBS für jeweils 10 Minuten wurden die Zellen mit dem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper (120 µl von 1:500 in 5% BSA) in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Danach folgten wieder 3 Waschschrift für jeweils 10 Minuten mit PBS. Die Zellkerne wurden abschließend mit DAPI gefärbt und danach nochmals kurz mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem spitzen Skalpell mit der Membran aus der Halterung der ALLs getrennt und überschüssiges PBS mit Zellstoff entfernt. Die Membran wurde mit den Zellen nach oben plan auf einen Objektträger gelegt, mit Mounting-Medium eingedeckelt und dunkel gelagert. Damit die Membran möglichst plan auf dem Objektträger aufliegt, wurde das eingedeckelte Präparat während des Aushärtens des Mounting-Mediums (ProLong[®] Gold antifade reagent, Invitrogen, Eugene, USA) leicht beschwert. Die Präparate wurden nach dem vollständigen Aushärten bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Olympus IX-51 Mikroskop durchgeführt.

3.2.4 Statistische Analyse

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, vier mal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Box-Plots dargestellt, wobei die Box das unterste (25 % Quartil) und oberste Quartil (75%) umspannt, der Median wird als Linie durch die Box dargestellt. Die Fähnchen an der Box geben die Minima und Maxima wieder. Die statistische Auswertung wurde mit einem T-Test nach Mann-Whittney (nicht-parametrischer T-Test, zweiseitige P-Werte, keine Gaussche Normalverteilung der Daten) durchgeführt. Werte mit einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Aufarbeitung und der Rohdaten erfolgte mit Hilfe von Excel 2003, die statistische Auswertung und graphische Darstellung mit dem Programm Prism5 (GraphPad Software, Inc.).

4 Ergebnisse

4.1 Rauchen verringert die hBD-2 Konzentration im Sputum

Antimikrobielle Peptide sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und schützen das Epithel wirksam vor Infektionen durch Mikroorganismen. Rauchen ist ein Risikofaktor für die Entstehung einer COPD. Raucher leiden außerdem häufiger an Infektionen der Atemwege, was eine Schwächung des angeborenen Immunsystems vermuten lässt. Ein wichtiges induzierbares antimikrobielles Peptid des Atemwegsepithels ist hBD-2 (Bals et al., 1998a). Um herauszufinden, ob Raucher ein geschwächtes angeborenes Immunsystem im Sinne einer verringerten Konzentration antimikrobieller Peptide haben, wurde die Konzentration von hBD-2 in Sputum von Pneumoniepatienten im Western-Blot untersucht. Da Sputum von sehr zäher Konsistenz und der wässrige und schleimige Anteil sehr variabel ist, wurden die Proben im Western-Blot untersucht obwohl im ELISA eine genauere Quantifizierung möglich ist. Reduzierende Substanzen, die in der Probenvorbereitung verwendet wurden, hatten im Gegensatz zu einem ELISA bei einem Western-Blot keinen störenden Einfluss.

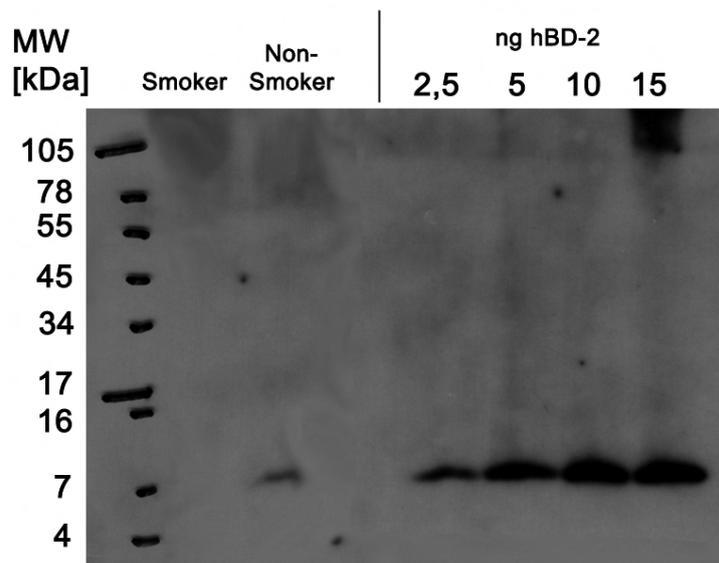


Abbildung 6: Western-Blot auf einem 10-20%igem Tris-Tricin Gel von Proteinextrakten aus Sputum von rauchenden (Smoker) und nicht-rauchenden (Non-Smoker) Pneumoniepatienten. Auf der Linken Seite sind die extrahierten Patientenproben aufgetragen, auf der rechten Seite eine hBD-2 Verdünnungsreihe.

Der Western-Blot in Abbildung 6 zeigt die Proteinextrakte, die aus dem Sputum von rauchenden und nicht-rauchenden Pneumoniepatienten hergestellt worden sind. Es wurden

gleiche Mengen Sputum von jeweils 5 Rauchern und 5 Nicht-Rauchern (auf gleiches Gewicht, bzw Volumen normiert, siehe 3.2.3.2) gepoolt, extrahiert und im Western-Blot zusammen mit einer hBD-2 Verdünnungsreihe aufgetrennt. In den Extrakten von Rauchern konnte deutlich weniger hBD-2 detektiert werden, als bei Nicht-Rauchern. Der in Abbildung 6 dargestellte Western-Blot zeigt nur bei Nicht-Rauchern eine Bande für hBD-2. Es ist wahrscheinlich, dass im Sputum von Rauchern ebenfalls hBD-2 enthalten ist, die Konzentration aber so gering war, dass eine Darstellung durch einen Westernblot nicht möglich ist. Die Menge des nachgewiesenen hBD-2 im Sputum von Nicht-Rauchern kann auf Grund eines Vergleichs mit der aufgetragenen Verdünnungsreihe auf $<2,5$ ng geschätzt werden.

4.2 Zigarettenrauch unterdrückt die Induktion von hBD-2 *in vitro*

Das Peptid hBD-2 ist ein wichtiger induzierbarer Effektor des angeborenen Immunsystems in den Epithelzellen des respiratorischen Traktes (Bals et al., 1998a; Platz et al., 2004; Wang et al., 2003). Um zu untersuchen, ob die verringerte hBD-2 Konzentration der untersuchten Patientenproben von rauchenden Pneumoniepatienten (siehe Abschnitt 4.1) auch mit einer geringeren Expression von hBD-2 korreliert, wurden ausdifferenzierte primäre humane Atemwegsepithelzellen mit Zigarettenrauch beraucht und anschließend mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI infiziert. Nach 6 Stunden wurde die RNA isoliert und 1 µg RNA in eine cDNA-Synthese mit darauf folgender Realtime-PCR eingesetzt.

Die Expression von hBD-1 wird weder durch Zigarettenrauch, noch durch die Infektion der ALLs mit *P.aeruginosa* beeinflusst. Die Infektion der Zellen mit lebendigen *P.aeruginosa* führt jedoch zu einer signifikanten Induktion der hBD-2 Expression nach 6 Stunden Inkubation. Zigarettenrauch unterdrückt die von *P.aeruginosa* induzierte hBD-2 Expression (siehe Abb. 7).

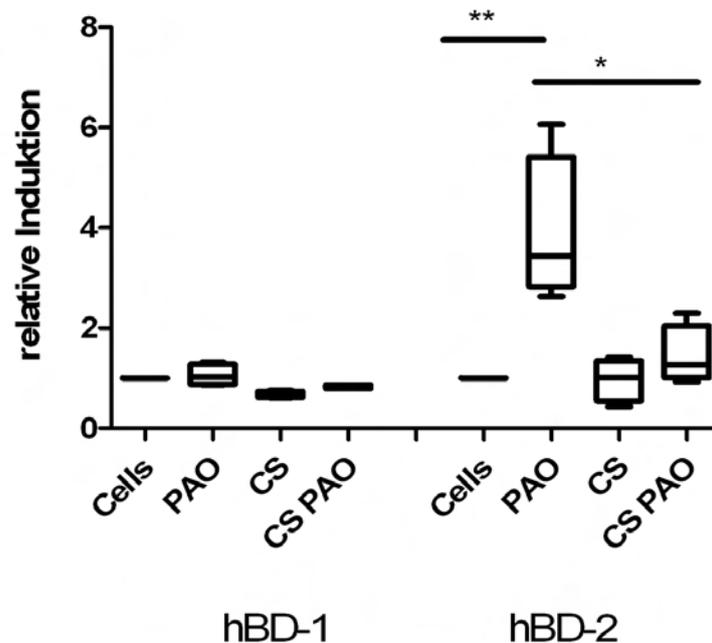


Abbildung 7: Nachweis der Expression von hBD-1 und hBD-2 durch quantitative RT-PCR von bereauchten und infizierten pHBEs im ALI-Kultursystem. Die Expression der Zielgene wurde nach 6 Stunden Inkubation auf die Expression von GAPDH normalisiert. Cells: Zellen ohne Stimulation; PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS: Zellen bereucht; CS PAO: Zellen zuerst bereucht und dann mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; n=8. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit * und $p < 0,01$ mit ** markiert.

Ein weiteres Defensin aus der Familie der β -Defensine, das von Atemwegsepithelzellen gebildet wird, ist hBD-3. Seine Expression kann durch Rhinoviren aber auch durch Gram-negative Bakterien induziert werden (Duits et al., 2003; Ji et al., 2007). Wie in Abbildung 8 gezeigt, wird die Expression von hBD-3 durch *P.aeruginosa* gegenüber den nicht infizierten Kontrollen nur leicht induziert, erreicht jedoch kein Signifikanzniveau.

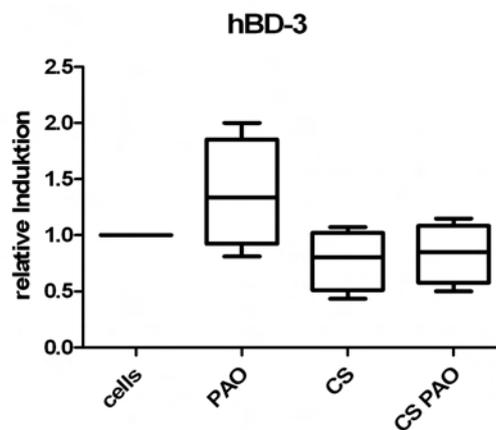


Abbildung 8: Die Expression von hBD-3 nach Berauchen und Infektion mit *P.aeruginosa* durch pHBEs im ALI-Kultursystem. Dargestellt ist relative Expression von hBD-3 nach 6 Stunden Inkubation, normalisiert auf die Expression von GAPDH. Cells: Zellen ohne Stimulation; PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS: Zellen beraucht; CS PAO: Zellen zuerst beraucht und dann mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; n=8.

Parallel zu der Expressionsanalyse aus dem in der Abbildung 7 und 8 gezeigten Experiment wurde die Konzentration von hBD-2 in der apikalen Spülflüssigkeit bestimmt und ein antimikrobieller Assay mit *P.aeruginosa* durchgeführt. Die ALLs wurden dazu, wie in Material und Methoden beschrieben, nach 6 stündiger Inkubation apikal mit 120 μ l PBS gespült. Damit wurden serielle Verdünnungen hergestellt, die auf LB-Agarplatten plattiert und ausgezählt wurden. Die hBD-2 Konzentration wurde in unverdünnter apikaler Spülflüssigkeit mit einem ELISA gemessen.

Die Abbildung 9 zeigt, dass Zigarettenrauch einen funktionellen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von Bronchialepithelzellen hat. Nach der Exposition mit Zigarettenrauch kommt es zu einer signifikant geringeren Sekretion von hBD-2 in die apikale Spülflüssigkeit, als bei nicht-berauchten Proben (Abbildung 9A). Dies führt zu einer erhöhten Überlebensrate von *P.aeruginosa* in den berauchten Proben (Abbildung 9B). Die in der Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse wurden parallel aus einem Versuch gewonnen.

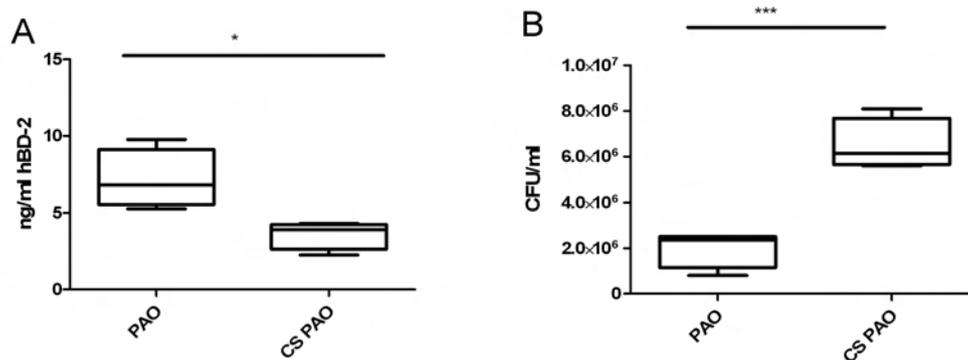


Abbildung 9: Die Konzentration von hBD-2 in apikaler Spülflüssigkeit und die antimikrobielle Aktivität der pHBEs in Abhängigkeit von Zigarettenrauch. **(A)** Die Konzentration von hBD-2 in der apikalen Spülflüssigkeit der ALLs wurde 6 Stunden nach dem Berauchen und Infizieren mit einem hBD-2 ELISA gemessen. **(B)** Die antimikrobielle Aktivität in der apikalen Spülflüssigkeit gegenüber *P.aeruginosa* wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS PAO: Zellen zuerst beraucht und dann mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; n=8; $p < 0,05$ * und $p < 0,001$ *** .

4.3 Zigarettenrauch beeinflusst nicht die antimikrobielle Aktivität von hBD-2

Zigarettenrauch enthält eine große Anzahl reaktiver Verbindungen, die sich z.B. durch die Oxidation von Disulfidbrücken auch auf die Integrität von Peptiden oder Proteinen auswirken könnten. Um zu beweisen, dass hBD-2 einen wesentlichen Beitrag in der angeborenen Immunantwort gegenüber *P.aeruginosa* spielt und trotz der Behandlung mit Zigarettenrauch antimikrobiell aktiv ist, sollte durch exogen appliziertes hBD-2 die Aktivität von hBD-2 nach dem Berauchen überprüft werden. Dazu musste zuerst die antimikrobielle Aktivität von hBD-2 überprüft werden. Das Peptid wurde uns freundlicherweise von Prof. Schröder aus Kiel zur Verfügung gestellt und wurde dort aus menschlichen Hautschuppen aufgereinigt (Harder et al., 1997). Als Positivkontrolle wurde LL-37 verwendet. In einem Vorversuch, dessen Resultate in der Abbildung 10A zu sehen sind, wurde 10 μ g hBD-2 und 2 μ g, 5 μ g und 10 μ g LL-37 verwendet und 3h zusammen mit *P.aeruginosa* bei 37°C in PBS verdünnt inkubiert.

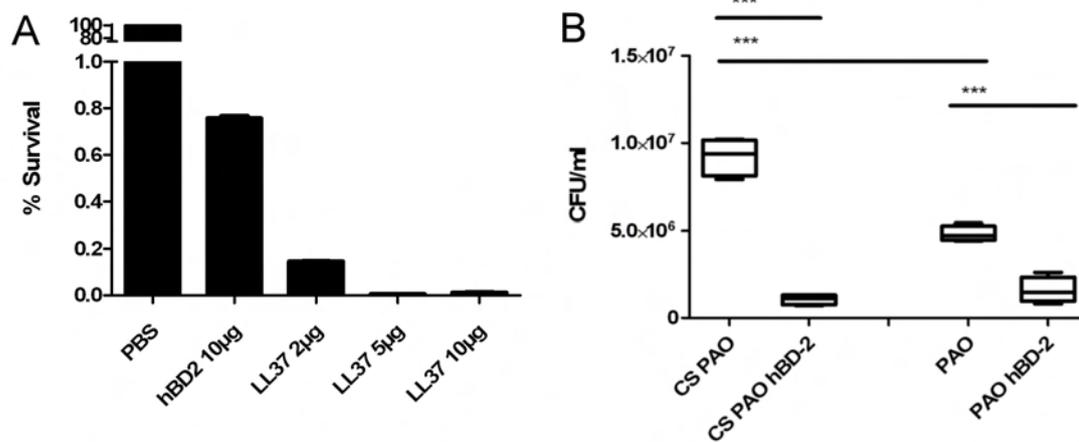


Abbildung 10: (A) Die antimikrobielle Aktivität von hBD-2 und LL-37 gegenüber 10^4 CFU *P.aeruginosa* nach 3 h Inkubation. **(B)** Antimikrobielle Aktivität gegenüber *P.aeruginosa* von bereauchten und infizierten ALIs mit exogen appliziertem hBD-2. PBS: *P.aeruginosa* für 3h in PBS und dann plattiert; PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS PAO: Zellen zuerst bereaucht und dann mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; n=4; $p < 0,001$ ***.

LL-37, das als synthetisiertes Peptid vorlag, zeigte in diesem Test eine höhere antimikrobielle Aktivität, als hBD-2. Bei der niedrigsten eingesetzten Menge von 2 µg LL-37 überlebten nur etwa 0,2 % der Bakterien im Vergleich zu einer PBS-Kontrolle. Die unterschiedliche antimikrobielle Aktivität von hBD-2 und LL-37 kann mit einer höheren Salzeempfindlichkeit von hBD-2 zusammenhängen (Bals et al., 1998a) (s. Abbildung 10A). Die Molarität beider Peptide liegt in der gleichen Größenordnung, da sie sich in ihrem Molekulargewicht nur geringfügig unterscheiden.

Im Anschluss wurde zu bereauchten pHBEs im ALI Kultursystem 5 µg hBD-2 gegeben und nach 6 Stunden Inkubation serielle Verdünnungen der apikalen Spülflüssigkeit auf LB-Agarplatten plattiert, um die überlebenden Bakterien zu quantifizieren. Die Konzentration von hBD-2 wurde hier nochmals verringert, um toxische Effekte von hBD-2 auf die pHBEs auszuschließen. Die Abbildung 10B zeigt wieder, dass auf bereauchten Zellen mehr *P.aeruginosa* überleben als auf nicht-bereauchten Zellen (vergleiche CS PAO mit PAO). Zusätzlich eingesetztes hBD-2 bewirkt eine weitere Verringerung der Bakterienzahl.

4.4 Rauchexposition führt zu keiner erhöhten LDH-Abgabe

Die Aktivität der LDH im Zellüberstand wird häufig als Maß für die Toxizität verwendet, da LDH nur von geschädigten Zellen abgegeben wird. Da Zigarettenrauch eine Vielzahl zytotoxischer Stoffe enthält und in dem verwendeten Berauchungsmodell direkt mit den Zellen in Kontakt kommt, wurde die LDH-Abgabe der Zellen nach dem Berauchen gemessen. Zusätzlich wurde die Toxizität von hBD-2 im Zusammenhang mit Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* überprüft, da bekannt ist, dass hBD-2 in höheren Konzentrationen toxisch wirkt (Sakamoto et al., 2005).

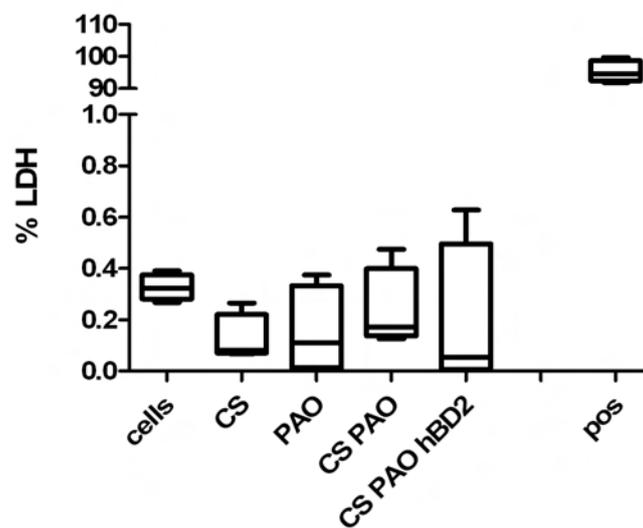


Abbildung 11: Messung der Toxizität von Zigarettenrauch, *P.aeruginosa* und hBD-2 auf pHBEs im ALI-Kultursystem an Hand der Freisetzung von LDH. Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die zuvor mit 2% Triton X-100 inkubiert wurden. Cells: Zellen ohne Stimulation; CS: Zellen beraucht; PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS PAO: Zellen zuerst beraucht und dann mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS PAO hBD2: berauchte und infizierte Zellen mit $5 \mu\text{g}$ hBD-2; pos: Zellen mit Triton X-100 inkubiert; n=8.

Die Abbildung 11 zeigt, dass im Vergleich mit der Positivkontrolle unter keinen Versuchsbedingungen die Abgabe von LDH über 1% steigt. Die Berauchung der Zellen und die Inkubation mit hBD-2 war, gemessen an der LDH-Konzentration, nicht toxisch. Die beobachteten Effekte bezüglich des Abtötens von Bakterien und der Induktion von hBD-2 sind daher nicht auf eine verminderte Lebensfähigkeit der Atemwegsepithelzellen durch Zigarettenrauch oder hBD-2 zurückzuführen.

4.5 Zigarettenrauch hat keine Auswirkungen auf die Adhärenz von *P.aeruginosa*

Die gerauchten und infizierten Zellen zeigten gegenüber den nicht-gerauchten und infizierten Zellen eine geringere antimikrobielle Aktivität gegenüber *P.aeruginosa* (s.Abb.9). Zigarettenrauch könnte neben direkten toxischen Effekten auch eine Auswirkung auf die Adhärenz von Bakterien an eukaryotischen Zellen haben (Ahmer et al., 1999; Piatti et al., 1997; Sadikot et al., 2005). Um dies auszuschließen, wurde die Adhärenz von *P.aeruginosa* an pHBEs im ALI-Kultursystem in Abhängigkeit von Zigarettenrauch überprüft.

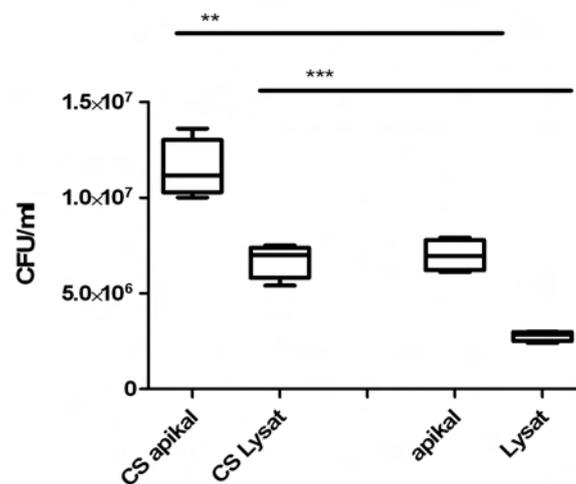


Abbildung 12: Der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Adhärenz von *P.aeruginosa* an pHBEs im ALI-Kulturmodell. Dazu wurde apikale Spülflüssigkeit und Lysat von gerauchten und nicht-gerauchten Zellen in serieller Verdünnung auf LB-Agarplatten vestrichen und die gewachsenen Kolonien gezählt. Die Zellen wurden mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI infiziert und für 6 h inkubiert. CS apikal: apikale Spülflüssigkeit gerauchter und infizierter Zellen; CS Lysat: Lysat gerauchter und infizierter Zellen; apikal: apikale Spülflüssigkeit infizierter Zellen; Lysat: Lysat infizierter Zellen; n=8; p<0,01 **; p<0,001 ***.

Die Abbildung 12 zeigt, dass keine der gewählten Versuchsbedingungen einen Einfluss auf die Adhärenz von *P.aeruginosa* an pHBEs im ALI-Kulturmodell hat. Der Vergleich von gerauchten und nicht-gerauchten Zellen zeigt nochmal deutlich die geringere antimikrobielle Aktivität der gerauchten Zellen. Bei gerauchten Zellen überleben sowohl im Lysat als auch in der apikalen Spülflüssigkeit signifikant mehr Bakterien als in den nicht-gerauchten Proben. Die beobachteten Effekte bezüglich des Abtötens von *P.aeruginosa* auf gerauchten und nicht gerauchten Zellen waren nicht auf eine erhöhte Adhärenz bei gerauchten

Zellen zurückzuführen, da der Unterschied zwischen Lysat und apikaler Spülflüssigkeit in der gerauchten und nicht-gerauchten Gruppe vergleichbar ist.

4.6 Die Abgabe von IL-6 und IL-8 wird durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst

Um herauszufinden, ob Zigarettenrauch neben der angeborenen Immunität auch die Entzündungsreaktion nach der Infektion mit lebenden *P.aeruginosa* beeinflusst, wurde die Abgabe von IL-6 und IL-8 in das basale Kompartiment von ausdifferenzierten pHBEs im ALI-System gemessen. Dazu wurden die Zellen zuerst geraucht und dann für 6 h mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI inkubiert.

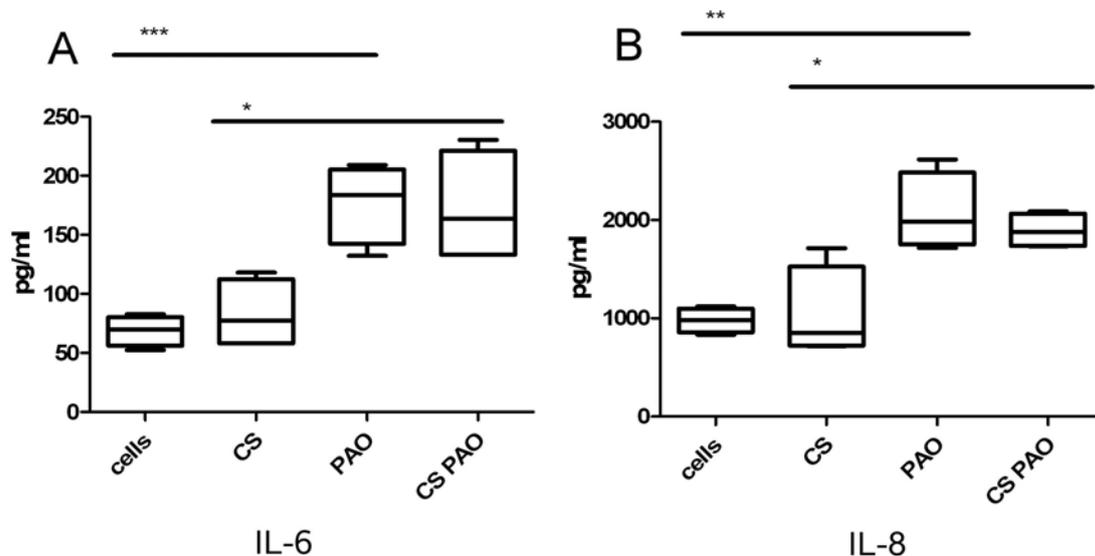


Abbildung 13: Die Messung proinflammatorischer Zytokine im basalen Kompartiment von pHBEs im ALI-Kulturmodell in Abhängigkeit von Zigarettenrauch und Infektion mit *P.aeruginosa*. Die Abgabe von (A) IL-6 und (B) IL-8 Konzentration nach dem Berauchen und Infizieren der Zellen mit *P.aeruginosa*. Cells: Zellen ohne Stimulation; CS: Zellen geraucht; PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; CS PAO: Zellen zuerst geraucht und dann mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; n=8; p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***.

Primäre HBEs im ALI-Kultursystem reagieren nach der Stimulation mit *P.aeruginosa* PAOI mit der Abgabe des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und Chemokins IL-8 in das basale Kompartiment (s.Abb.:13). Die Konzentration von IL-6 und IL-8 wurde durch

Zigarettenrauch leicht erhöht, erreichte aber keine Signifikanz. Eine signifikant erhöhte Sekretion erfolgte erst nach der Stimulation mit lebenden *P.aeruginosa*, die sich durch Zigarettenrauch nicht beeinflussen ließ.

4.7 Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* induzieren unterschiedliche antioxidative Proteine

Die Lunge ist hohen Konzentrationen an oxidativ wirksamen Substanzen ausgesetzt. Erkrankungen der Lunge, die mit einer anhaltenden Entzündung einhergehen (z.B. COPD), verursachen ein Ungleichgewicht zugunsten oxidativer Stoffe, die meist in der Form von reaktiven Sauerstoffverbindungen auftreten (Rahman and Adcock, 2006). Im Zigarettenrauch sind neben reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen auch toxische Substanzen enthalten, die zu einer Peroxidation von Lipiden und Proteinen (Lipidperoxidation, reaktive Aldehyde) führen und damit das Redox-Gleichgewicht der Lunge stören können (Church and Pryor, 1985; Thompson and Burcham, 2008). Die antioxidative Kapazität der Lunge wird über eine Reihe von Enzymen hergestellt, die in der Lage sind, mit reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffverbindungen zu reagieren (Kemp et al., 2008). Im Folgenden wurde untersucht, wie weit Zigarettenrauch oder die Stimulation mit *P.aeruginosa* die Induktion antioxidativ wirksamer Enzyme beeinflusst.

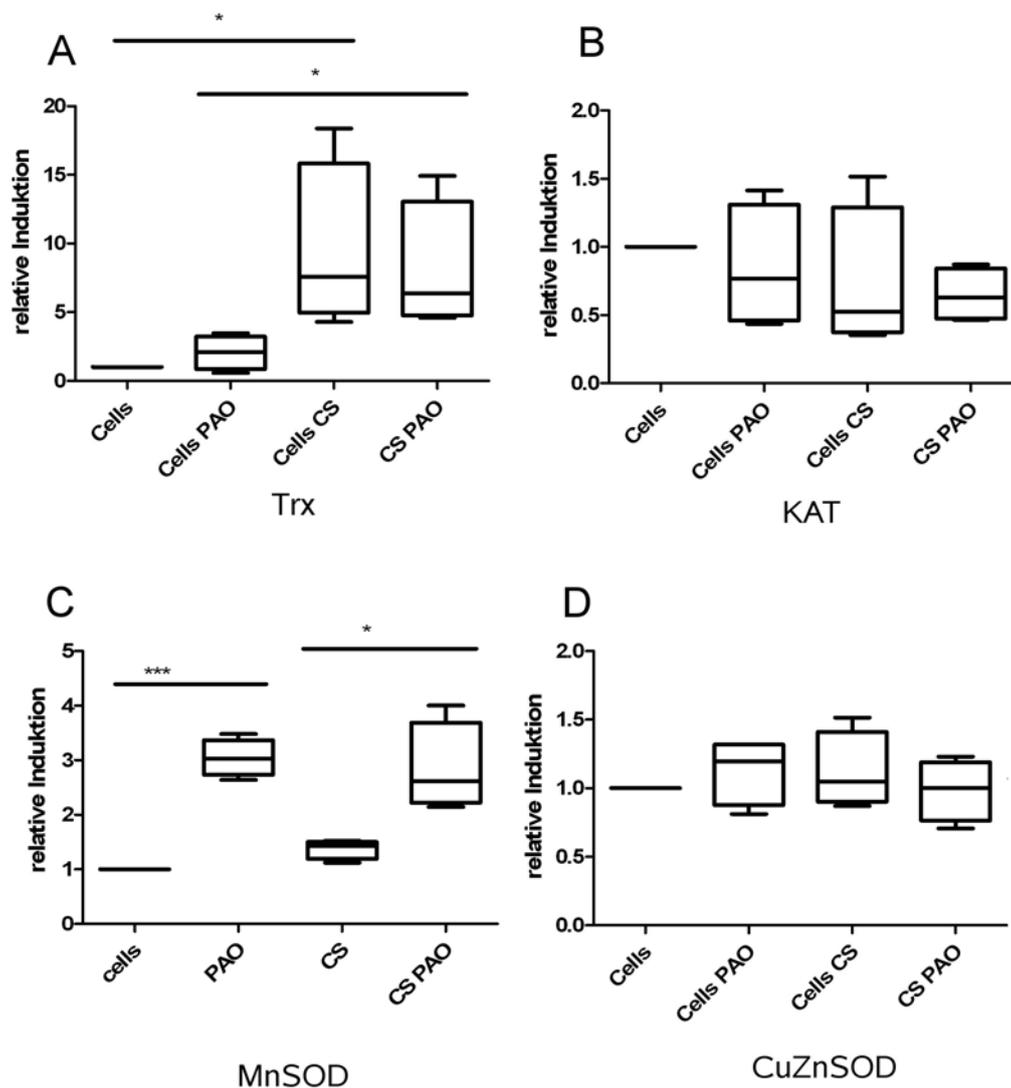


Abbildung 14: Die Induktion der Genexpression verschiedener antioxidativ aktiver Enzyme in Abhängigkeit von Zigarettenrauch, lebenden *P.aeruginosa* oder der Kombination aus beiden. Trx: Thioredoxin; KAT: Katalase; MnSOD: Mangan-Superoxiddismutase; CuZnSOD: Kupfer-Zink-Superoxiddismutase; Cells: Zellen ohne Stimulation; Cells PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; Cells CS: Zellen geraucht; CS PAO: Zellen geraucht und mit *P.aeruginosa* PAOI stimuliert; n=8; p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***.

Die differenzierten pHBEs reagierten auf Zigarettenrauch mit einer verstärkten Genexpression von Thioredoxin (Abb. 14A), zeigten aber keine signifikante Veränderung der Genexpression von Katalase (Abb. 14B) oder der CuZnSOD (Abb. 14D). Die Expression von MnSOD (Abb. 14C) wurde durch *P.aeruginosa* signifikant induziert und durch

Zigarettenrauch nicht beeinflusst.

4.8 Antioxidantien erhöhen die Expression von hBD-2

Antioxidantien wie N-Acetylcystein werden vereinzelt unterstützend bei der Therapie von COPD eingesetzt (Dekhuijzen, 2004; Negro et al., 2008). Zigarettenrauch enthält durch den Verbrennungsprozess viele reaktive Sauerstoffverbindungen. Wie schon im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, unterdrückt Zigarettenrauch die Antwort des angeborenen Immunsystems in Atemwegsepithelzellen. Daher wurde untersucht, ob reaktive Sauerstoffspezies aus dem Zigarettenrauch für die verringerte hBD-2 Expression verantwortlich sein können. Dies sollte durch den Einsatz von Antioxidantien gezeigt werden.

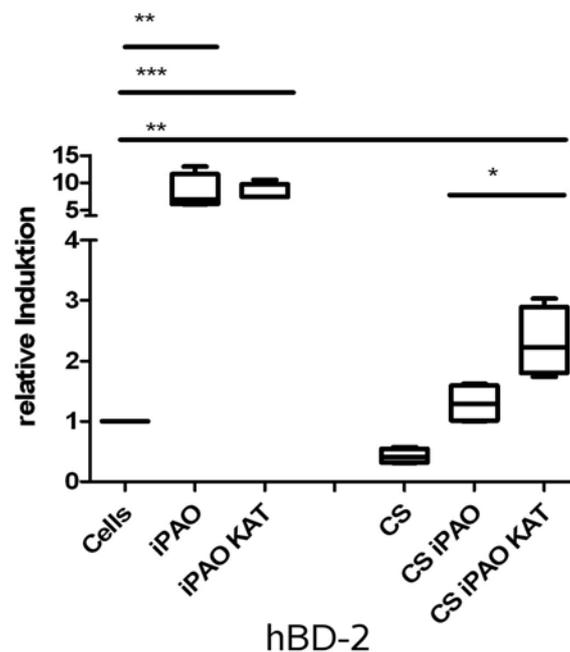


Abbildung 15: Die Induktion der Genexpression von hBD-2 in pHBEs im ALI-Kultursystem nach der Stimulation durch hitzegetötete *P.aeruginosa*, Zigarettenrauch und antioxidativ wirksamer Katalase. Cells: unstimulierte Zellen; iPAO: Zellen mit hitzeinaktivierten $15 \mu\text{l } 10^7 \text{CFU/ml } P.aeruginosa$ stimuliert; iPAO KAT: Zellen mit hitzeinaktivierten *P.aeruginosa* und 6400 U/ml Katalase stimuliert; CS: Zellen beraucht; CS iPAO: Zellen beraucht und mit hitzeinaktivierten *P.aeruginosa* stimuliert; CS iPAO KAT: Zellen während und nach dem Berauchen mit 6400 U/ml Katalase inkubiert und mit hitzeinaktivierten *P.aeruginosa* stimuliert; n=8; $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***.

Für diesen Versuch wurden hitzeinaktivierte *P.aeruginosa* verwendet, da ein Einfluss der Antioxidantien auf die Bakterien nicht ausgeschlossen werden kann. Wie in Abbildung 15 gezeigt wird, hatte die Verwendung von Katalase keinen Einfluss auf die Induktion von hBD-2 in unberauchten Zellen. Zigarettenrauch alleine und die Kombination von Zigarettenrauch mit nachfolgender Stimulation durch hitzegetötete *P.aeruginosa* führte ebenfalls zu keiner Induktion von hBD-2. Die Verwendung von 6400 U/ml Katalase während und nach dem Berauchen ermöglichte wieder eine Induktion von hBD-2 durch *P.aeruginosa*, die jedoch geringer war, als ohne Zigarettenrauch.

4.9 Zigarettenrauch erhöht die Expression von Chaperonen

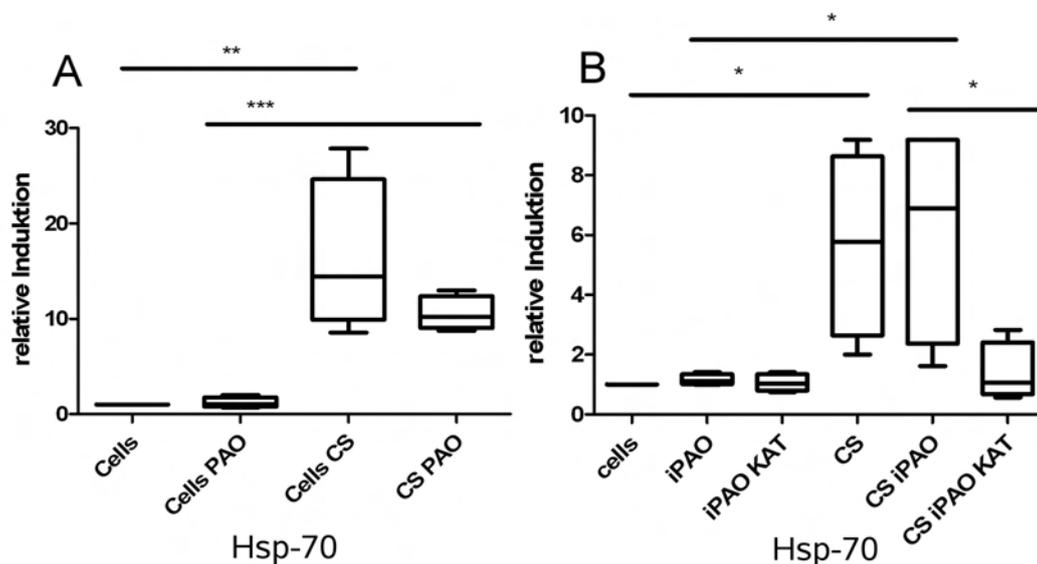


Abbildung 16: Die Induktion der Genexpression von Hsp-70 in pHBEs im ALI-Kulturmodell nach der Stimulation mit *P.aeruginosa*, Zigarettenrauch und Katalase. Cells: unstimulierte Zellen; iPAO: Zellen mit hitzeinaktivierten $15 \mu\text{l } 10^7 \text{CFU/ml } P.aeruginosa$ stimuliert; Cells PAO: Zellen mit 10^4CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* stimuliert; iPAO KAT: Zellen mit hitzeinaktivierten *P.aeruginosa* und 6400 U/ml Katalase stimuliert; (cells) CS: Zellen beraucht; CS (PAO) iPAO: Zellen beraucht und mit *P.aeruginosa* stimuliert; CS iPAO KAT: Zellen während und nach dem Berauchen mit 6400 U/ml Katalase inkubiert und mit hitzeinaktivierten *P.aeruginosa* stimuliert; n=8; $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***.

Bei Chaperonen handelt es sich um Proteine, die durch Interaktion mit anderen Proteinen deren Faltung und Stabilität beeinflussen können. Hitzeschock-Proteine (Hsp) sind an der Regulation vieler Signalwege von der Thermotoleranz, Proteinfaltung bis hin

zur Aktivierung des NF- κ B Signalwegs beteiligt. Da Zigarettenrauch viele Substanzen enthält, die eine Stressantwort der Zelle induzieren können, wurde die Genexpression der Chaperone Hsp-70 und Hsp-90 in Abhängigkeit von Zigarettenrauch und einer Infektion mit *P.aeruginosa* untersucht.

Die Abbildung 16 zeigt, dass die Genexpression von Hsp-70 durch Zigarettenrauch signifikant induziert wurde und in ihrer Art unabhängig von der Stimulation mit lebenden oder hitzeinaktivierten *P.aeruginosa* war. Der Anstieg der Genexpression von Hsp-70 war nicht auf einen Temperaturanstieg durch den Zigarettenrauch zurückzuführen, da der Rauch vor dem Kontakt mit den Zellen durch einen Schlauch von der Zigarette in die Rauchexpositions-kammer im Zellinkubator geleitet wurde und dabei abkühlen konnte. Katalase in Verbindung mit Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* führte zu einem Rückgang der Hsp-70 Proteinexpression.

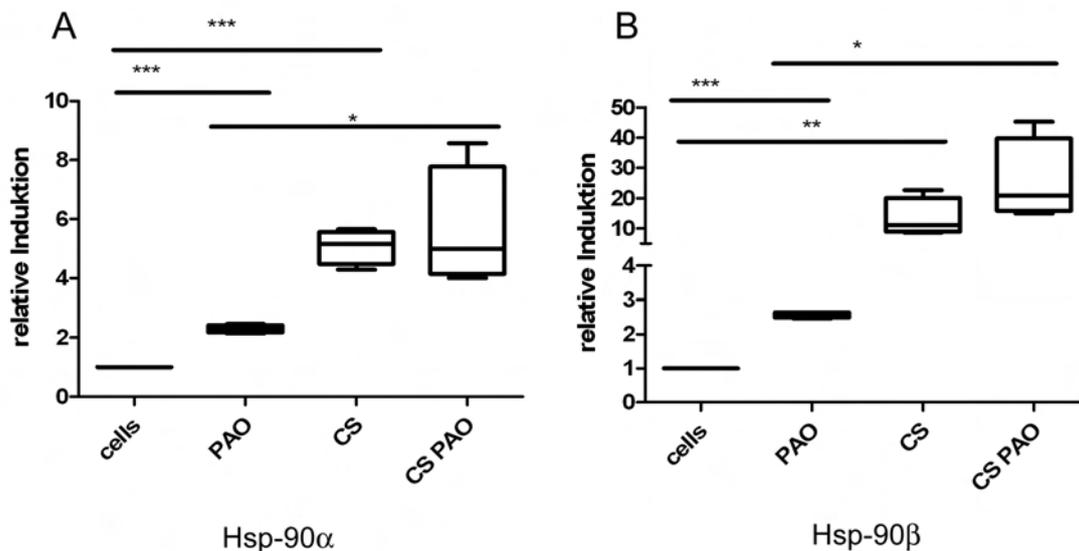


Abbildung 17: Die Hsp-90 Genexpression von pHBEs im ALI-Kultursystem nach der Stimulation mit lebenden *P.aeruginosa* und Zigarettenrauch. Cells: unstimulierte Zellen; PAO: Zellen mit 10^4 CFU/ml lebenden *P.aeruginosa* stimuliert; CS: Zellen geraucht; CS PAO: Zellen geraucht und mit *P.aeruginosa* stimuliert; n=8; p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***.

Die Genexpression der Chaperone Hsp-90 α und Hsp-90 β wird, wie in Abbildung 17 gezeigt, durch die Stimulation der pHBEs mit lebendigen *P.aeruginosa* signifikant induziert. Bei vorangehender Exposition der Zellen mit Zigarettenrauch kommt es zu einer noch größeren Stimulation der Hsp-90 Transkription, die durch die Stimulation mit *P.aeruginosa* nicht mehr signifikant gesteigert werden kann.

4.10 Zigarettenrauch inhibiert die Kernlokalisierung von p65

Es gibt drei unterschiedliche NF- κ B Wege, die sich durch die Verwendung unterschiedlicher Liganden, Rezeptoren und intrazellulärer Signalwege unterscheiden. Da das hBD-2 Gen zwei p65-responsive Elemente im Promoterbereich besitzt und zur effektiven Aktivierung der Transkription von hBD-2 beide Bindestellen besetzt sein müssen (Kao et al., 2008; Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2002), wurde der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Aktivierung und Kerntranslokation von p50 und p65 untersucht.

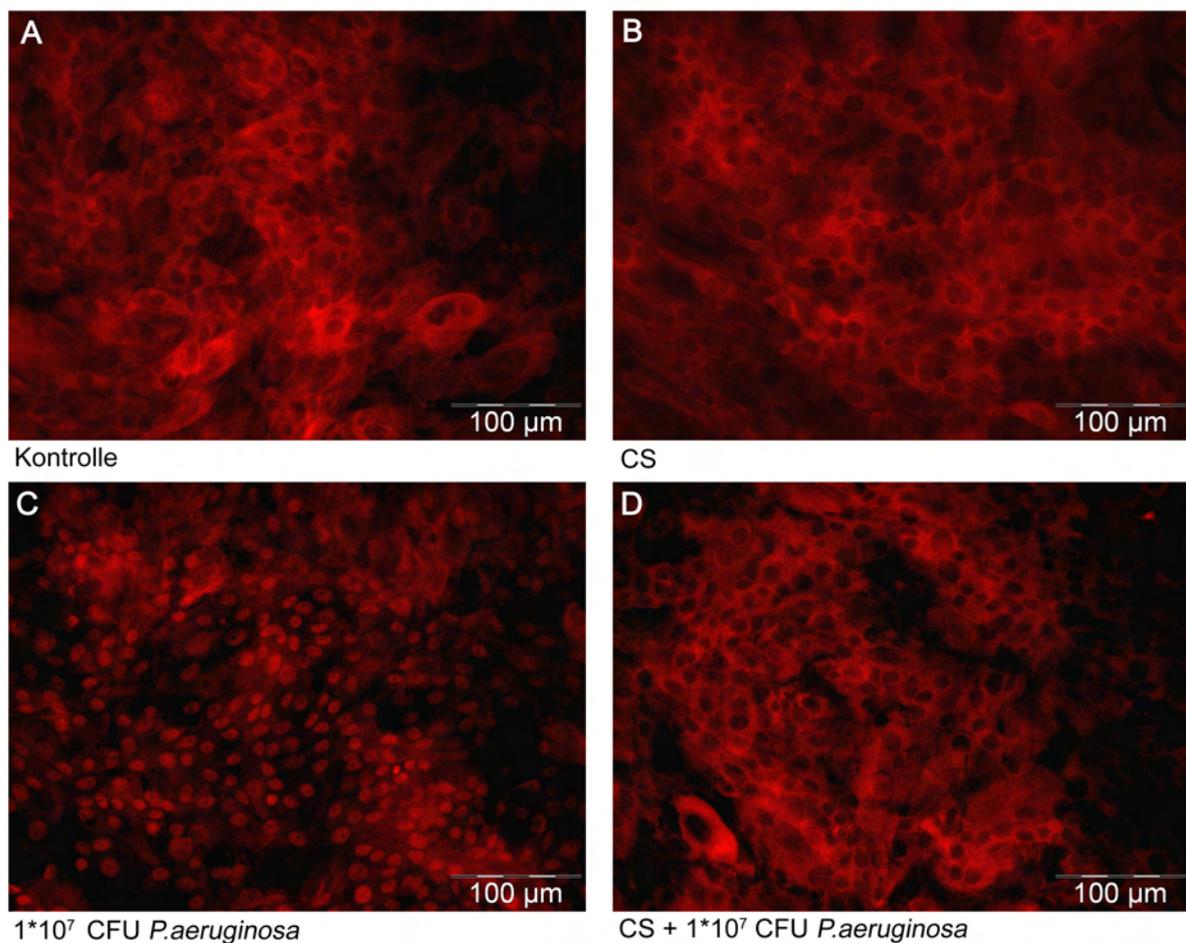


Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation von p65 (RelA) im ALI-Kultursystem in (A) unstimulierten pHBEs (Kontrolle), (B) mit Zigarettenrauch stimulierten pHBEs (CS), (C) *P.aeruginosa* infizierten Zellen ($1 \cdot 10^7$ CFU) und (D) der Kombination aus Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* (CS + $1 \cdot 10^7$ CFU *P.aeruginosa*). Die Zellen wurden 15 Minuten nach der Stimulation wie in Material und Methoden 3.2.3.11 beschrieben fixiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen p65 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem speziesspezifischen Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor© 647 markiert war.

Die Abbildung 18A zeigt, dass sich unter nicht-stimulierten Bedingungen p65 vermutlich als Heterodimer mit p50 überwiegend im Zytosol befindet. Der Nukleus ist nur schwach gefärbt, was wahrscheinlich mit dem dauernden Im- und Export in den Nukleus von inaktiven p65/p50 Heterodimeren zusammenhängt (Abb. 18 A) oder von einer basalen Aktivierung von p65 herrührt. Die Stimulation mit Zigarettenrauch führt zu keiner Aktivierung von p65 in pHBEs im ALI-Kultursystem, obwohl Zigarettenrauch Anteile von LPS und andere proinflammatorische Bestandteile enthält (Abb. 18 B). Durch eine Stimulation der Zellen mit lebenden *P.aeruginosa* kommt es zu einer deutlichen Kerntranslokation von p65, das Zytosol ist nur schwach positiv gefärbt (Abb. 18 C). Zigarettenrauch inhibiert die durch *P.aeruginosa* induzierte Kerntranslokation und Aktivierung von p65 (Abb. 18 D). Die Aktivierung von p65 durch die in Abbildung 18 A-D gezeigten Stimuli korreliert mit der Induktion von hBD-2 auf Transkriptions- und Translationsebene und der antimikrobiellen Aktivität von pHBEs *in vitro* (siehe Abschnitt 4.2).

Um den Einfluss von Zigarettenrauch auf die Aktivierung von NF- κ B genauer zu betrachten, wurde die Subzelluläre Lokalisation von p50 untersucht. Aktivierte NF- κ B Heterodimere des kanonischen Signalwegs bestehen aus p50 und p65 Untereinheiten. Im atypischen Signalweg, der IKK unabhängig aktiviert wird, spielen p50 und p65 ebenfalls eine Rolle. In unstimulierten Zellen können p50-Homodimere an die DNA binden und sind deshalb ebenfalls im Zellkern zu finden.

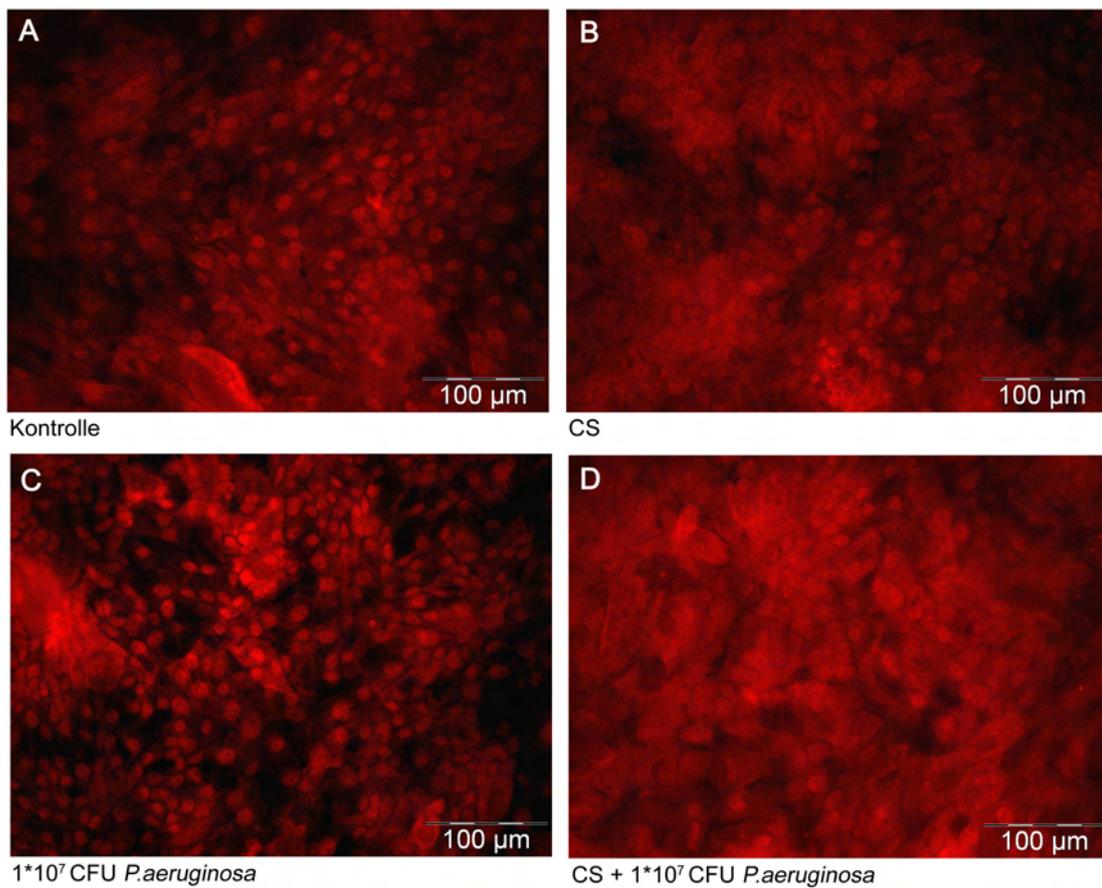


Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation von p50 im ALI-Kultursystem in **(A)** unstimulierten pHBEs (Kontrolle), **(B)** mit Zigarettenrauch stimulierten pHBEs (CS), **(C)** *P.aeruginosa* infizierten Zellen ($1 \cdot 10^7$ CFU) und **(D)** der Kombination aus Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* (CS + $1 \cdot 10^7$ CFU *P.aeruginosa*). Die Zellen wurden 15 Minuten nach der Stimulation wie in Material und Methoden 3.2.3.11 beschrieben fixiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen p50 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem speziesspezifischen Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor© 647 markiert war.

In pHBEs unter Kontrollbedingungen kann man p50 Untereinheiten sowohl im Zytosol als auch im Zellkern nachweisen, wobei der Zellkern stärker gefärbt ist, was für eine Kernlokalisierung von p50 spricht (Abb. 19 A). Die Behandlung der Zellen mit Zigarettenrauch hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von p50 (Abb. 19 B). Im Vergleich dazu bewirkt die Stimulation mit *P.aeruginosa* eine verstärkte Kerntranslokation der p50 Untereinheit, da durch die vermehrte Kernlokalisierung der p50/p65 Heterodimere aus Abbildung 18 C die zytosolisch befindlichen p50 Untereinheiten ebenfalls in den Kern gewandert sind. Die leichte Färbung des Zytosols ist bei der Stimulation der Zellen mit *P.aeruginosa* fast verschwunden (Abb. 19 C). Die Kombination aus Zigarettenrauch und bakterieller

Stimulation führt wieder zu der in Abbildung 19 A und B dargestellten Situation. p50 ist hier zwar im Kern zu finden, die zytosolische Färbung hat aber wieder im Vergleich zur Abbildung 19 C zugenommen, woraus man schließen kann, dass ein erheblicher Teil der p50 Untereinheiten zusammen mit p65 im Zytoplasma vorliegen (Abb. 19 D).

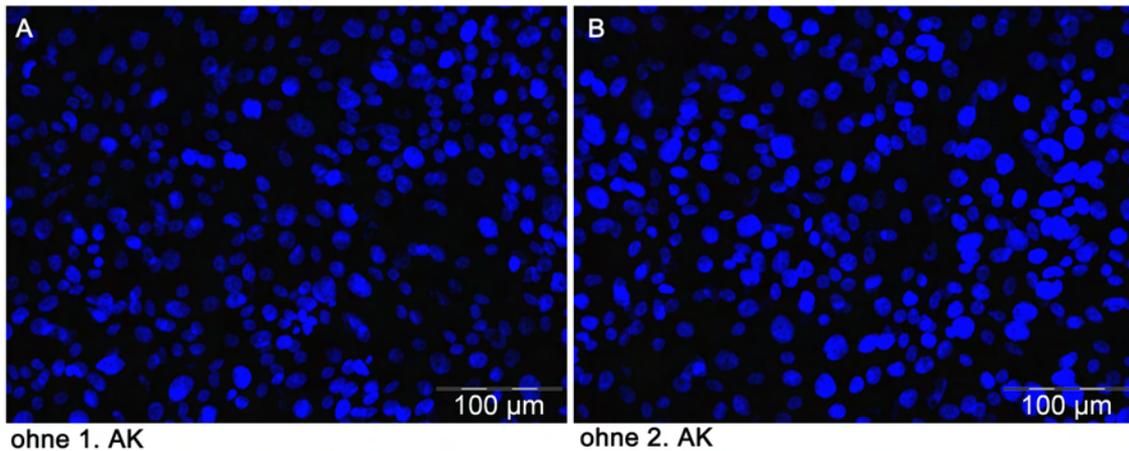


Abbildung 20: Kontrolle der Antikörperspezifität der in Abb. 18 und 19 verwendeten primären und sekundären Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Zum Nachweis der Spezifität der in Abbildung 18 und Abbildung 19 gezeigten Färbungen wurden Zellen jeweils nur mit dem speziesspezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörper (Abb. 20 A) oder dem polyklonalen Antikörper gegen p65 oder p50 inkubiert (Abb. 20 B, hier nur für p65 gezeigt). Anschließend wurden die Proben mit DAPI gefärbt, um die DNA der Kerne anzufärben. In allen Kombinationen konnte bei gleicher Belichtungsdauer und Empfindlichkeit der Kamera keine unspezifische Färbung nachgewiesen werden.

4.11 Zigarettenrauch inhibiert die Aktivierung von p65

Die Bindung der NF- κ B Transkriptionsfaktoren p50/p65 an die DNA im kanonischen Signalweg kann nur erfolgen, nachdem I κ B α von IKK β phosphoryliert wurde und sich dadurch von dem p50/p65 Heterodimer löst. Danach wird neben der NLS auch die TAD von p65 zugänglich, die eine Bindung des Heterodimers an die DNA und die damit verbundene Gentranskription erlaubt. Die in Abschnitt 4.10 gezeigten Daten zeigen nur die subzelluläre Lokalisation der Untereinheiten und lassen nur indirekt auf die Aktivierung schließen. Zum Nachweis der Aktivierung von p65 in Abhängigkeit von Zigarettenrauch oder der Stimulation mit *P.aeruginosa* wurde aus Gesamtzellextrakt die Menge von p65 bestimmt, die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen an die DNA binden kann.

Der verwendete ELISA hat den Vorteil, dass er sensitiver als das klassisch verwendete EMSA-Verfahren ist.

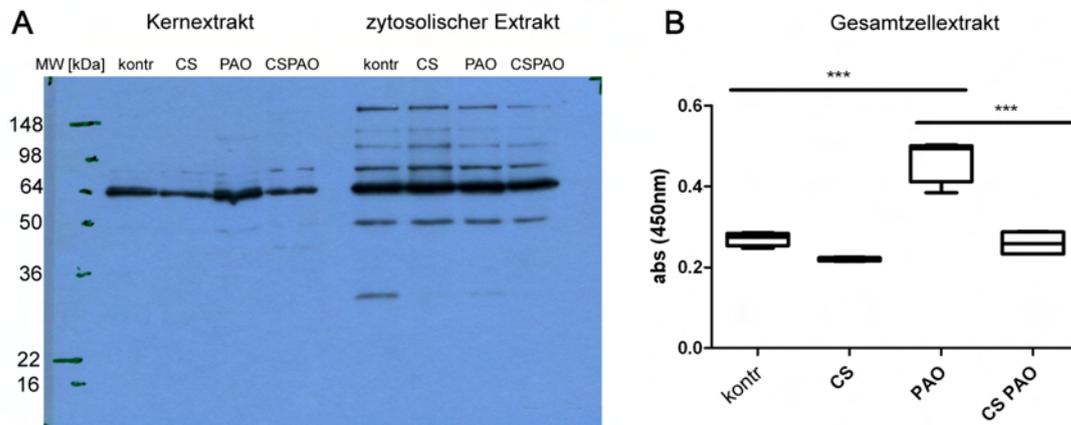


Abbildung 21: (A) Der Nachweis von p65 in Kernextrakten und zytosolischen Extrakten von pHBEs im ALI-Kulturmodell und (B) Messung der Aktivierung von p65 mittels p65-ELISA aus Gesamtzellextrakt nach unterschiedlichen Stimulationen. Die Zellen wurden 15 Minuten nach der Stimulation für die Subzelluläre Fraktionierung oder die Proteinextraktion verwendet. Der ELISA zeigt höhere Absorptionen bei aktiviertem p65. kontr - Kontrolle; CS - Zigarettenrauch; PAO - $1 \cdot 10^7$ CFU *P.aeruginosa*; CSPA0 - Zigarettenrauch und $1 \cdot 10^7$ CFU *P.aeruginosa*; abs(450nm) - Absorption bei 450 nm; n=8; $p < 0,001$ ***.

Der Western-Blot der Kernextrakte der stimulierten pHBEs im ALI-Modell in Abbildung 21 A zeigte nur bei den mit *P.aeruginosa* stimulierten Zellen ein stärkeres Signal für p65, was mit den Daten der Immunfluoreszenz für p65 aus Abbildung 18 übereinstimmt. Im zytosolischen Extrakt sind keine Unterschiede für p65 bei den verschiedenen Versuchsbedingungen zu erkennen. Die Daten des p65-ELISA in Abbildung 21 B zeigen eine Aktivierung von p65 nach der Stimulation der Zellen mit *P.aeruginosa*. Mit Zigarettenrauch und mit nachfolgender bakterieller Stimulation findet keine Aktivierung von p65 im Vergleich zu den Kontrollen statt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems der Lunge untersucht. Im Besonderen wurde der Beitrag von hBD-2 in der angeborenen Immunantwort der Lunge und der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Induktion dieses Peptids untersucht. Abhängig von dem Raucherstatus der Patienten hatten rauchende Pneumoniepatienten weniger hBD-2 in ihrem Sputum als nicht rauchende Pneumoniepatienten. Die *ex vivo* erhobenen Daten konnten *in vitro* mit differenzierten, primären humanen Atemwegsepithelzellen bestätigt werden. pHBEs reagierten nach der Stimulation mit hitzegetöteten oder lebenden *P.aeruginosa* mit der Abgabe proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und der Expression und Synthese des antimikrobiellen Peptids hBD-2, was in einer erhöhten antimikrobiellen Aktivität gegenüber lebenden *P.aeruginosa* resultierte. Die vorangehende Exposition mit Zigarettenrauch unterdrückte die antimikrobielle Aktivität der pHBEs auf Ebene der Transkription, Translation und Funktion. Durch den Einsatz von Antioxidantien konnte der Effekt von Zigarettenrauch rückgängig gemacht werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zu einer Inhibition der p65-Aktivierung durch Zigarettenrauch kommt, was in direktem Zusammenhang mit der erhöhten Expression von Chaperonen nach der Rauchexposition stehen könnte.

5.1 Zigarettenrauch verhindert die Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Die Atemwege sind durch ihre Funktion fortwährend der Exposition mit Keimen aus der Umwelt ausgesetzt. Als unmittelbare Reaktion auf eingedrungene Mikroorganismen steht dem Körper neben strukturellen Barrieren ein Repertoire aus Mustererkennenden Rezeptoren (z.B. TLRs) und Effektoren zur Verfügung, die entweder direkt antimikrobiell wirken oder die Reaktion des Organismus auf eine Immunantwort vorbereiten (z.B. Chemokine und Zytokine).

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist in Amerika mittlerweile für mehr als 110000 Todesfälle jährlich verantwortlich und etwa 10 % aller Männer über 40 Jahren weltweit erkranken an COPD (Mannino and Buist, 2007). Zigarettenrauch ist der wichtigste Risikofaktor, an einer COPD zu erkranken. Etwa 25 % der Raucher erkranken an einer COPD (Løkke et al., 2006). Da es sich bei einer COPD um eine entzündliche Erkrankung der Atemwege handelt, und Rauchen sowie COPD zu den Risikofaktoren für eine CAP gehören, sollte untersucht werden, ob und wie Rauchen die angeborene Immunantwort der Lunge beeinflusst.

Dazu wurden Proben von Pneumoniepatienten verwendet, die über das CAPNETZ (Welte et al., 2004) gesammelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Die Analyse der Sputumproben zeigte, dass rauchende Pneumoniepatienten deutlich weniger hBD-2 in der Lunge bilden als nicht rauchende Pneumoniepatienten. Der Raucherstatus steht damit in direktem Zusammenhang mit der Konzentration des antimikrobiellen Peptides hBD-2. Um den zu Grunde liegenden Mechanismus dieser Beeinflussung durch Zigarettenrauch genauer untersuchen zu können, wurden *in vitro* Experimente mit primären humanen Atemwegsepithelzellen im ALI-Kulturmodell durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch spezifisch die Expression von hBD-2 nach der Stimulation mit *P.aeruginosa* unterdrückt. Die Expression von hBD-1 und hBD-3 wurde durch Zigarettenrauch oder bakterielle Stimulation nicht beeinflusst. Da die berauchten Zellen außerdem eine signifikant niedrigere antimikrobielle Aktivität gegenüber *P.aeruginosa* zeigten als nicht berauchte Kontrollen, ist anzunehmen, dass hBD-2 eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen in der Lunge spielt. Dabei war der Effekt spezifisch für hBD-2, da die Expression der antimikrobiellen Peptide hBD-1 und hBD-3 durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst wurde, durch *P.aeruginosa* aber auch nicht induziert werden konnte. In einem Mausmodell mit deletiertem murinen β -Defensin-1 (mBD-1), dem Homolog zu hBD-2, konnte bereits gezeigt werden, dass β -Defensine eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort der Lunge spielen (Moser et al., 2002). Tiere ohne mBD-1 zeigten eine stärkere Besiedlung der Lunge mit *Haemophilus influenza* als vergleichbare Kontrollen. Die Überexpression von hBD-2 in einem anderen Mausmodell führte zu einer verbesserten antimikrobiellen Aktivität gegenüber *E.coli* (Huang et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass hBD-2 und das murine Homolog mBD-1 eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort der Lunge spielen.

Um auszuschließen, dass die verminderte hBD-2 Genexpression und antimikrobielle Aktivität berauchter Zellen auf einen zytotoxischen Einfluss von Zigarettenrauch zurückzuführen ist, wurde die LDH-Konzentration nach dem Berauchen der Zellen bestimmt. Alle bisher verwendeten Stimuli, auch Zigarettenrauch, führten zu keiner wesentlichen LDH-Abgabe der Zellen.

Verschiedene Arbeiten zeigten eine Beeinflussung der Adhärenz von Bakterien an Epithelzellen durch Zigarettenrauch (Ahmer et al., 1999; Piatti et al., 1997). Dies hätte auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell zu einer scheinbar niedrigeren antimikrobiellen Aktivität der Zellen nach dem Berauchen und einer erhöhten bakteriellen Überlebensrate führen können. Um dies auszuschließen, wurde parallel die Keimzahl in der apikalen Spülflüssigkeit und im Lysat berauchter und unberauchter, infizierter Zellen bestimmt. Zigarettenrauch hatte keinen Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien an pHBEs. Bisher veröffentlichte Arbeiten verwenden andere Modelle und kommen dabei zu gegensätzlichen

Ergebnissen. In der Arbeit von Ahmer et al. (1999) wurde für ähnliche Untersuchungen Zigarettenrauchextrakt verwendet, der abhängig von der Verdünnung die Adhärenz an Epithelzellen begünstigte oder verminderte. Die Autoren ziehen im Rahmen ihrer Arbeit den Schluss, dass Bestandteile des Zigarettenrauchs die Adhärenz der Bakterien beeinflusst. An Epithelzellen von Rauchern konnte im Rahmen einer anderen Publikation nur bei *Streptococcus pneumoniae* eine erhöhte Adhärenz gezeigt werden, während *P.aeruginosa* keine Unterschiede zeigte (Piatti et al., 1997).

Da Zigarettenrauch eine Vielzahl genotoxischer und zytotoxischer Substanzen enthält, wurde untersucht, ob hBD-2 zusammen mit Zigarettenrauch *P.aeruginosa* abtöten kann oder ob die Struktur des Peptids durch Substanzen aus dem Zigarettenrauch soweit gestört wird, dass es seine antimikrobielle Aktivität verliert. Exogen appliziertes hBD-2 wurde durch Zigarettenrauch in seiner antimikrobiellen Funktion nicht gestört. Da hBD-2 in höheren Konzentrationen zellschädigend sein kann (Sakamoto et al., 2005), wurde die LDH-Aktivität nach der Inkubation der Zellen mit hBD-2 im Überstand gemessen. Die eingesetzte Konzentration von hBD-2 führte zu keiner erhöhten Abgabe von LDH.

Daraus lässt sich folgern, dass Zigarettenrauch die Funktion der pHBEs im angeborenen Immunsystem stört, indem es die Expression von hBD-2 nach bakterieller Stimulation unterdrückt.

5.2 Die Stimulation mit *P.aeruginosa* führt zu einer pro-inflammatorischen Zytokinantwort von pHBEs

Zytokine und Chemokine sind wichtige Mediatoren der angeborenen Immunantwort. Sie können proinflammatorisch wirken und einen chemotaktischen Einfluss auf Neutrophile, Makrophagen oder andere Bestandteile des angeborenen Immunsystems haben. Sie tragen aber auch dazu bei, dass eine inflammatorische Reaktion der Zellen nicht auf ein pathologisches Niveau gelangt und haben in diesem Zusammenhang antiinflammatorische Eigenschaften.

IL-6 und IL-8 (CXCL-8) sind wichtige proinflammatorische Mediatoren des angeborenen Immunsystems. Sie werden von pHBEs nach der Stimulation mit *P.aeruginosa* gebildet. Dabei sind Atemwegsepithelzellen auf Grund der Rezeptordichte wesentlich unempfindlicher gegenüber der TLR-abhängigen Stimulationen als etwa Makrophagen (Greene and McElvaney, 2005).

Die Stimulation mit Zigarettenrauch führte bei Atemwegsepithelzellen zu keiner höheren Abgabe von IL-6 und IL-8 als unter Kontrollbedingungen, obwohl im Zigarettenrauch LPS und bakterielle Endotoxine enthalten sind (Hasday et al., 1999). Andere Veröffentlichungen

zeigen, dass die Rauchexposition von Mäusen zu einer geringeren Expression von IL-6 und TNF- α in Alveolarmakrophagen nach der Stimulation mit TLR- und NOD-Liganden führte (Gaschler et al., 2008) als in nicht-berauchten Kontrollen. Alveolarmakrophagen, die von Rauchern isoliert wurden, zeigten ebenfalls eine geringere IL-6 und IL-8 Produktion nach der Stimulation mit TLR-Liganden, als die Alveolarmakrophagen der nicht rauchenden Kontrollgruppe. Dabei war die Expression der PRR in beiden Gruppen nicht verändert (Chen et al., 2007). Da im Rahmen dieser Arbeit keine distinkten PRR-Liganden sondern lebende oder hitzeinaktivierte Bakterien verwendet wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die hier beobachtete Stimulation der IL-6 und IL-8 Abgabe mit vorangehender Rauchexposition durch die Kombination verschiedener PRR-Liganden verursacht wurde.

Die Stimulation der Zellen mit *P.aeruginosa* nach der Exposition mit Zigarettenrauch führte im Gegensatz zu hBD-2 zu keiner Unterdrückung der Zytokinantwort. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Expression von IL-6 und IL-8 über andere Signalwege reguliert wird, als die Induktion von hBD-2. Da die Expression von hBD-2 in Atemwegsepithelzellen durch NF- κ B induziert wird (Kao et al., 2008; Wang et al., 2003), könnte Zigarettenrauch die Aktivierung der NF- κ B abhängigen Signaltransduktion inhibieren. In CF (cystische Fibrose) Bronchialepithelzellen führte die Infektion mit *P.aeruginosa* zu einer erhöhten Expression von IL-6 und IL-8, die abhängig vom Transkriptionsfaktor Sp-1 war. Die Inhibition von Sp-1 führte zu einer Inhibition der IL-6 Transkription (Borgatti et al., 2007).

Der Promoter des IL-8 Gens enthält neben NF- κ B Bindestellen auch Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren NF-IL-6, AP-1. In der Alveolarepithelzelllinie A549 und der Bronchialepithelzelllinie Beas-2B ist gezeigt worden, dass die Expression von IL-8 stimullenspezifisch entweder über AP-1 oder NF- κ B erfolgt (Roebuck et al., 1999). Die Aktivierung der Transkription durch AP-1 erfolgte dabei durch H₂O₂, während TNF- α und RSV die IL-8 Transkription durch NF- κ B und NF-IL-6 regulieren. H₂O₂ ist an der Aktivierung von ASK-1 („*apoptosis signal-regulating kinase-1*“) beteiligt, das im inaktiven Zustand mit reduziertem Thioredoxin verbunden ist. Eine Oxidation von Thioredoxin führt zu der Aktivierung der Kinase, die daraufhin weitere Kinasen im MAPK-Weg aktiviert, was zu einer Kerntranslokation von AP-1 führt (Takeda et al., 2008).

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass es durch Flagellin von *P.aeruginosa* in Bronchialepithelzelllinien zu einer Expression von IL-8 über TLR-2 und TLR-5 Rezeptoren und der Aktivierung von NF- κ B kommt (Adamo et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *P.aeruginosa* und Zigarettenrauch in pHBEs unterschiedliche Signalwege aktivieren, die zwar zu einer proinflammatorischen Antwort führen, die aber nur zum Teil von der kanonischen NF- κ B Aktivierung abhängig ist.

5.3 Antioxidantien beeinflussen die Expression von hBD-2

Zigarettenrauch enthält und erzeugt eine Vielzahl reaktiver Verbindungen, die oxidativen Stress auslösen können (Church and Pryor, 1985). Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass H_2O_2 den Effekt von Zigarettenrauch bei der Unterdrückung der angeborenen Immunantwort in pHBEs ersetzen kann (Beisswenger, 2005). Daraus lässt sich schließen, dass die hBD-2 Expression durch reaktive Sauerstoffspezies beeinflusst wird. Die Stimulation von pHBEs mit *P.aeruginosa* nach dem Berauchen und der Behandlung mit Katalase konnte die Expression von hBD-2 wieder signifikant induzieren. Die Stärke der Expression, gemessen an der Expression von GAPDH, war allerdings geringer als bei der bakteriellen Stimulation ohne Zigarettenrauch. Es ist daher wahrscheinlich, dass neben reaktiven Sauerstoffspezies noch andere Stoffe im Rauch der Zigarette die Induktion von hBD-2 durch *P.aeruginosa* negativ beeinflussen.

Acrolein, ein reaktives Aldehyd, das durch die Verbrennung organischer Stoffe entsteht, ist ein Bestandteil von Zigarettenrauch. Es konnte gezeigt werden, dass Acrolein die Dimerisierung von TLR-4 durch die Reaktion mit Cystein-Gruppen verhindert (Lee et al., 2008). Dadurch kommt es zu einer abgeschwächten TLR-4 abhängigen Aktivierung von NF- κ B und IRF3. Da die Expression von hBD-2 durch NF- κ B p65 induziert wird und die Aktivierung von NF- κ B durch *P.aeruginosa* durch TLR-4 vermittelt wird, kann eine Modifikation von TLR-4 durch Acrolein zu der schwächeren hBD-2 Expression nach bakterieller Stimulation geführt haben.

5.4 pHBEs reagieren auf Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* mit der Expression unterschiedlicher antioxidativer Proteine

Molekularer Sauerstoff ist neben Stickstoff eines der Hauptelemente unserer Atemluft und relativ reaktionsträge. Reaktionsprodukte von Sauerstoff können sich in ihrer Reaktivität stark unterscheiden. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen Reaktionen des Körpers, sind aber in höheren Konzentrationen toxisch. Organe wie die Lunge, die dauerhaft hohen Konzentrationen von ROS und RNS ausgesetzt sind, haben deswegen ein großes Repertoire an antioxidativen Enzymen entwickelt. ROS und RNS werden sowohl endogen unter physiologischen Bedingungen durch Stoffwechselprozesse oder das angeborene Immunsystem erzeugt oder durch die Inhalation von Zigarettenrauch, Abgasen oder Stickoxiden aufgenommen. Eine physiologische Bedeutung haben dabei unter anderem das Superoxid anion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal ($\bullet OH$), Stickoxid (NO) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Unter physiologischen Bedingungen werden hauptsächlich $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 erzeugt.

$O_2^{\bullet-}$ wird hauptsächlich von Superoxid-Dismutasen (CuZnSOD, MnSOD) zu H_2O_2 dismutiert. H_2O_2 ist eine relativ reaktive Verbindung, die leicht Methionine und Cysteine reduzieren kann und damit reaktive Zentren von Enzymen inaktiviert, dadurch aber auch ein wichtiges Signalmolekül darstellt (Lou et al., 2008). H_2O_2 wird entweder durch Katalase zu Sauerstoff und Wasser reduziert oder durch Glutathion-Peroxidasen durch eine Oxidation von Glutathion oder Thioredoxin zu Wasser und Sauerstoff reduziert. Oxidiertes Glutathion und Thioredoxin werden durch die Reduktion von NAD^+ oder $NADP^+$ zu $NADH$ / $NADPH$ reduziert und stellen einen wichtigen Faktor in der antioxidativen Kapazität der Zellen dar.

Während einer Reaktion des angeborenen Immunsystems auf pathogene Mikroorganismen entsteht ROS bei der Degranulation von Neutrophilen und der Phagozytose durch Makrophagen, dass in diesem Fall ein Signalmolekül und ein Bestandteil der antimikrobiellen Aktivität ist (Hancock et al., 2001). Zigarettenrauch enthält ebenfalls reaktive Verbindungen, die entweder während der Verbrennung erzeugt werden oder die nach dem Kontakt mit Lipiden und Proteinen ihrerseits wieder reaktive Verbindungen erzeugen können (Chow, 1993; Yanbaeva et al., 2007). Da pHBEs in dem verwendeten Berauchungsmodell direkt dem Zigarettenrauch ausgesetzt sind, wurde die Expression einiger antioxidativer Enzyme untersucht.

pHBEs im ALI-Kultursystem reagieren nach der Exposition mit Zigarettenrauch mit einer erhöhten Expression von Thioredoxin, was darauf hindeutet, dass im Zigarettenrauch H_2O_2 oder andere Peroxide enthalten sind. Da oxidiertes Thioredoxin auch an der Reduktion von Disulfiden beteiligt ist, könnten durch hohe Konzentrationen von oxidiertem Thioredoxin auch Disulfidbindungen in Proteinen reduziert werden.

Es ist gezeigt worden, dass Acrolein zu einer enzymatischen Inaktivierung von Thioredoxin und von Thioredoxinreduktase führen kann (Go et al., 2007; Myers and Myers, 2009). Dadurch würde es in den Zellen zu einer Akkumulation von H_2O_2 oder anderen Peroxiden kommen, was zu DNA-Schäden oder einer vermehrten Oxidation von Aminosäuren, Proteinen und Lipiden führt. Eine Inaktivierung einzelner Enzyme des antioxidativen Systems durch Zigaretterrauch und der damit verstärkte oxidative Stress würden auch die höheren Konzentrationen von Lipidperoxidations-Produkten im Serum von Rauchern erklären (Yanbaeva et al., 2007).

Die Expression von Katalase, die ebenfalls bei der Umwandlung von ROS in H_2O beteiligt ist, wird durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst. Die Stimulation von pHBEs mit *P.aeruginosa* führte zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von MnSOD, die durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst wurde. Das lässt darauf schließen, dass Pathogenitätsfaktoren von *P.aeruginosa* reaktive Sauerstoffverbindungen erzeugen.

Es ist bereits bekannt, dass ein Pathogenitätsfaktor von *P.aeruginosa*, der Farbstoff Pyocyanin, zur Freisetzung von ROS führt und die enzymatische Aktivität der Katalase stören kann (O'Malley et al., 2003). Pyocyanin inaktiviert ein enzymatisches antimikrobielles System der Atemwegsepithelzellen, das aus Thiocyanat und H_2O_2 mit Hilfe von Oxidasen und Lactoperoxidasen die antimikrobielle Verbindung Hypothiocyanid erzeugt (Duox, Oxidase-thiocyanat-lactoperoxidase System). Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von H_2O_2 , das als antimikrobielle Strategie erzeugt, aber nicht umgesetzt wird, da das Duox-System inaktiviert wurde (Rada et al., 2008). Dies würde die Induktion von MnSOD nach der Stimulation der pHBEs mit *P.aeruginosa* erklären.

5.5 Die Stimulation von pHBEs mit Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* führt zu einer Expression von Chaperonen

Die Stimulation der pHBEs mit Zigarettenrauch und *P.aeruginosa* könnte durch die Hemmung mehrerer Komponenten des antioxidativen Systems zu einer Akkumulation von ROS in den Zellen geführt haben. Durch oxidativen Stress kann es zu einer Oxidation von Proteinen kommen, wodurch es zu der Expression von Chaperonen als Teil der zellulären Stressantwort kommt (Go et al., 2007; Szabó et al., 1996; Wang et al., 1996).

Die Stimulation von pHBEs mit Zigarettenrauch bewirkte eine signifikante Induktion der Genexpression von Hsp-70, die wahrscheinlich durch die erhöhte Belastung der Zellen mit reaktiven Verbindungen aus dem Zigarettenrauch und einer Inaktivierung der antioxidativen Systeme zusammenhängt. Durch die Behandlung der Zellen mit Katalase kommt es zu einer reduzierten Expression von Hsp-70, die mit der erhöhten hBD-2 Expression korreliert. Da die Expression von hBD-2 abhängig von einer Aktivierung durch NF- κ B ist (Hertz et al., 2003; Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2002; Voss et al., 2006; Wang et al., 2003) und Hsp-70 die Dissoziation des NEMO-Komplexes inhibieren kann (Agou et al., 2002; Ran et al., 2004; Weiss et al., 2007), könnten hohe Hsp-70 Konzentrationen, hervorgerufen durch oxidativen Zellstress, für die unterdrückte Expression von hBD-2 verantwortlich sein. Ein weiterer Interventionspunkt für die Aktivierung von hBD-2 durch den TLR-Signalweg ist die Inaktivierung von TRAF6 im MyD88 abhängigen TLR-Signalweg durch Hsp-70 (Chen et al., 2006). In einem murinen Berauchungsmodell ist bereits gezeigt worden, dass die Konzentrationen von Hsp-70 in der BAL berauchter Mäuse im Vergleich zu nicht berauchten Kontrollen erhöht sind (Doz et al., 2008).

Auf der anderen Seite können hohe Expressionsraten von Hsp-70 die Zelle auch vor der Apoptose schützen, da Hsp-70 die Signaltransduktion im Signalweg des FAS-Rezeptors inhibiert (Arya et al., 2007).

Die Genexpression der beiden Chaperonmonomere Hsp-90 α und Hsp-90 β wurde durch die Stimulation mit *P.aeruginosa* signifikant induziert, konnte aber noch wesentlich durch die Exposition der Zellen mit Zigarettenrauch gesteigert werden. Die bakteriell induzierte Hsp-90 Genexpression hängt sehr wahrscheinlich mit der Aktivierung von NF- κ B und der damit verbundenen erhöhten Biosynthese von IKK-Proteinen zusammen. Hsp90 ist für die Synthese der IKK-Proteine essentiell, wird aber auch zusammen mit dem Cofaktor Cdc39 für die Reifung und Aktivierung der IKK-Proteine benötigt (Broemer et al., 2004; Chen et al., 2002; Hinz et al., 2007). Da die Expression von Hsp-90 α und Hsp-90 β durch Zigarettenrauch signifikant gesteigert wurde, könnte Hsp-90 auch in seiner Funktion als Chaperon die Proteinfaltung stabilisieren, da sich Hsp-70 mit Hsp-90 oft in Multichaperonkomplexen befindet.

Da ein Einfluss der Chaperone auf die Aktivierung von NF- κ B nicht ausgeschlossen werden kann, wurde untersucht, ob die gesteigerte Expression von Hsp-70 und Hsp-90 die Aktivierung von NF- κ B im kanonischen Signalweg beeinflusst, da Hsp-70 auf der einen Seite die Dissoziation des NEMO-Komplexes und damit die Aktivierung von NF- κ B verhindert, auf der anderen Seite Hsp-90 für die Biosynthese von IKK essentiell ist.

5.6 Zigarettenrauch inhibiert die Aktivierung von NF- κ B

Der kanonische NF- κ B Signalweg ist ein wichtiger Mediator inflammatorischer Reaktionen der Zelle und hat daher auch große Bedeutung in der Antwort des angeborenen Immunsystems auf bakterielle Stimulationen. Arbeiten unterschiedlicher Gruppen haben einen Einfluss von Zigarettenrauch auf die Aktivierung von NF- κ B und die Expression proinflammatorischer Zytokine gezeigt, die abhängig von dem untersuchten Zelltyp (*in vitro*, *ex vivo*) und der Stimulation (TLR-Ligand, CSE *versus* Zigarettenrauch) war.

In Typ II Alveolarepithelzelllinien konnte eine Inhibition der Kerntranslokation von p65 durch Zigarettenrauchextrakt (CSE) gezeigt werden. CSE bewirkte dabei keine Induktion von IL-6 und IL-8 (Moodie et al., 2004). In der Makrophagenzelllinie MonoMac6 bewirkte CSE jedoch eine Aktivierung von NF- κ B und eine dosisabhängige Induktion von IL-8 (Yang et al., 2006). In Mäusen konnte an isolierten Makrophagen ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung von IL-6 und KC mit CSE gezeigt werden (Doz et al., 2008). Andererseits zeigten von Rauchern isolierte Alveolarmakrophagen eine reduzierte Expression von IL-6 und IL-8 nach der Stimulation mit TLR2 und TLR4 Agonisten. Die Aktivierung von NF- κ B, p38 und IRAK-1 in Alveolarmakrophagen von Rauchern war nach der Stimulation mit TLR2 und TLR4 Agonisten im Vergleich zu Nichtraucherern inhibiert (Chen et al., 2007). Dabei war die Unterdrückung der NF- κ B Aktivierung mit einer Inhibition der Degradation von I κ B α verbunden (Chen et al., 2007).

Die bisher veröffentlichten Arbeiten zeigen unterschiedliche Reaktionen der Zellen auf Zigarettenrauch, wobei die Mehrheit der Publikationen mit wässrigem CSE durchgeführt wurde und auch die Stimuli mit der vorliegenden Arbeit nicht vergleichbar sind. Die bisher publizierten Arbeiten verwenden TLR-Agonisten, was für die Untersuchung einzelner TLR-abhängiger Stimulationen angebracht ist. Bei einer Infektion mit *P.aeruginosa* ist der Respirationstrakt aber einer Mischung aus TLR-Liganden ausgesetzt. Zusätzlich werden von den Mikroorganismen Pathogenitätsfaktoren abgegeben, die die Zellen schädigen oder stimulieren können.

Bei der Herstellung von CSE wird der Zigarettenrauch durch Zellkulturmedium geleitet, dass anschließend steril filtriert wird. Dieses Vorgehen ist sehr wahrscheinlich toxischer, als die direkte Exposition der Zellen mit Zigarettenrauch, was von einigen Studien indirekt durch LDH-Messungen gezeigt wird (Moodie et al., 2004). Es ist bereits gezeigt worden, dass die oxidativen Bestandteile im Zigarettenrauch mit Lipiden, Aminosäuren und anderen organischen Verbindungen reagieren und dadurch wieder reaktive Verbindungen erzeugen können (Church and Pryor, 1985; Winston et al., 1993). Da bei der Herstellung von CSE die antioxidativen Systeme der Zellen fehlen, die beispielsweise der Lipidperoxidation entgegenwirken, können große Mengen reaktiver Verbindungen zellfrei durch das Durchleiten von Zigarettenrauch durch Medium mit organischen Bestandteilen erzeugt werden.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Berauchungsmodell trifft der Zigarettenrauch wie *in vivo* direkt auf die Zellen und kann dort von den endogenen antioxidativen Systemen reduziert werden. Auf der anderen Seite fehlen im CSE wasserunlösliche Verbindungen aus dem Zigarettenrauch, die in dem in dieser Arbeit verwendeten Berauchungsmodell vorhanden sind.

Die Stimulation von pHBEs im ALI-Kultursystem mit *P.aeruginosa* bewirkte eine Kerntranslokation und Aktivierung von p65, die durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Zigarettenrauch unterdrückt werden konnte. Die Aktivierung von NF- κ B kann durch chemische Modifikationen beeinflusst werden. So ist gezeigt worden, dass die Alkylierung oder Oxidation von NF- κ B die DNA-Bindung der DNA-bindenden Untereinheiten inhibiert, während reduzierende Stoffe die Bindung von NF- κ B an die DNA erhöhen (Toledano and Leonard, 1991). Ein Vergleich mit der Hsp-70 Expression legt aber auch eine Inhibition der NF- κ B Aktivierung durch Hsp-70 nahe, da Hsp-70 an IKK- γ (NEMO) binden kann und damit dessen Degradation und die Aktivierung von NF- κ B im kanonischen Signalweg verhindert (Weiss et al., 2007). Es wäre aber auch ein Inhibition des MyD88 abhängigen TLR-Signalwegs durch die fehlende Aktivierung von TRAF6 denkbar, da Hsp-70 dessen Ubiquitinierung und Aktivierung verhindern kann (Chen et al., 2006). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass eine adenovirale Überexpression von Hsp-70 in einem Modell

von akutem progressivem Lungenversagen (ARDS, „acute respiratory distress syndrome“) zu einer verminderten Neutrophilen Infiltration und NF- κ B Aktivierung führt (Weiss et al., 2002). Eine Inhibition der NF- κ B Aktivierung in Epithelzellen durch eine verstärkte Expression von Hsp-70 würde die Epithelzellen vor der Apoptose schützen (Arya et al., 2007) und damit die Integrität der epithelialen Barriere bewahren aber auch die Expression NF- κ B abhängiger Gene des angeborenen Immunsystems in Epithelzellen unterdrücken.

5.7 Schlussbemerkung

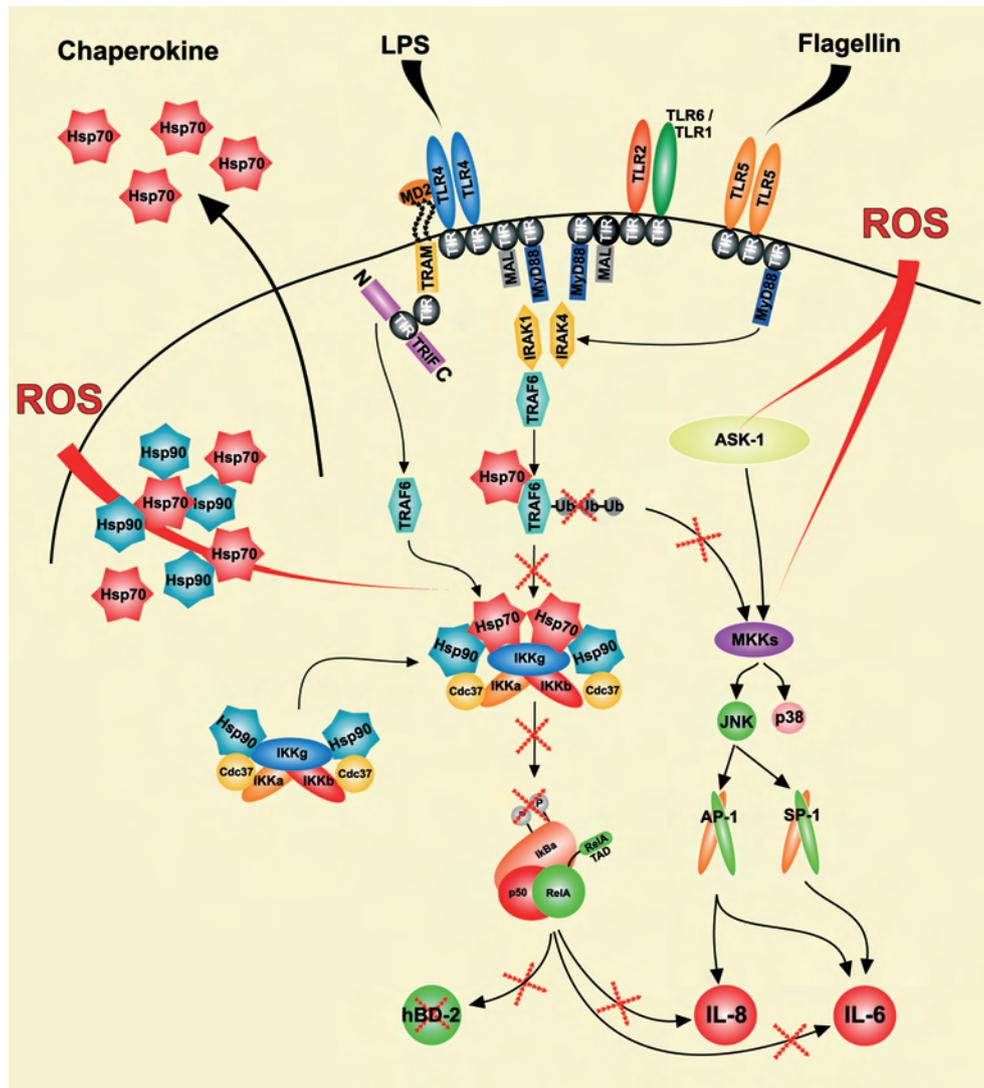


Abbildung 22: Hypothetischer Mechanismus der inhibierten Abwehrreaktion von Atemwegsepithelzellen nach der Exposition mit Zigarettenrauch und der Stimulation durch *P.aeruginosa*. Ein massiver Anstieg von ROS durch die Exposition der Zellen mit Zigarettenrauch und die zusätzliche Infektion mit *P.aeruginosa* führen zu einer verstärkten Expression der Chaperone Hsp-70 und Hsp-90. Die verstärkte Expression der Chaperone wirkt sich positiv auf die Stabilität der Proteine aus, interferiert aber mit Signalwegen, wie dem TLR-Signalweg und der Aktivierung von NF-κB im kanonischen Signalweg. Dadurch kommt es zu einer verringerten Expression von hBD-2. Auf der anderen Seite könnte die Expression von Hsp-70 zu einem Export dieses Chaperons führen. Dann würde es zu einer Stimulation von Makrophagen und dendritischen Zellen durch die chaperokinen Eigenschaften von Hsp-70 kommen. Die Expression von IL-6 und IL-8 erfolgt dann alleine durch AP-1 und SP-1.

Die zellulären Mechanismen über die Pathogenität des Zigarettenrauchs sind nur teilweise bekannt. Diese Arbeit zeigt einen Zusammenhang des Tabakkonsums mit der Funktion des angeborenen Immunsystems nach einer bakteriellen Infektion. Es konnte gezeigt werden, dass ein wesentlicher Grund für die höhere Infektionsrate des Respirationstraktes bei Rauchern eine Inhibition des angeborenen Immunsystems ist. Infektionen mit *P.aeruginosa* sind für etwa 5-10% der Exazerbationen bei COPD verantwortlich. Rauchen ist ein Hauptrisikofaktor zur Entwicklung einer COPD. Da Rauchen die Expression des antimikrobiellen Peptides hBD-2 nach einer Infektion mit *P.aeruginosa* inhibiert, könnte dieser Mechanismus einen wesentlichen Faktor im Krankheitsverlauf darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion von hBD-2 durch Zigarettenrauch nicht beeinträchtigt wird. Vielmehr beeinflussen bestimmte Bestandteile aus dem Zigarettenrauch die zellulären Signalwege, die zu einer Aktivierung der Genexpression von hBD-2 nach der Stimulation mit *P.aeruginosa* führen würden. Einen wesentlichen Beitrag zu diesem Mechanismus liefern reaktive Sauerstoffverbindungen, da der Einsatz von Katalase als Antioxidanz die Expression von hBD-2 teilweise wieder herstellen konnte. Einen nicht zu unterschätzenden Anteil an der Inhibition des angeborenen Immunsystems durch Zigarettenrauch hat der durch das Berauchen hervorgerufene chemische Stress, der auf Modifikationen von Proteinen durch reaktive Bestandteile des Zigarettenrauchs beruht, die dadurch in ihrer Funktion und Stabilität beeinflusst werden können. Die stark erhöhte Expression der Chaperone Hsp-70 und Hsp-90 nach der Exposition durch Zigarettenrauch dient wahrscheinlich primär dem Schutz der Proteine vor der Denaturierung und damit der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität. Da Hsp-70 und Hsp-90 aber auch Funktionen bei der Transkriptionsaktivierung durch NF- κ B im TLR-Signalweg haben, beeinflusst die hohe Expression von Hsp-70 und Hsp-90 die Abwehrreaktion der Zellen. Hsp-90 ist zwar für die Aktivierung von NF- κ B nötig, die Anwesenheit von Hsp-70 und die damit verbundene Hemmung von IKK- γ oder TRAF6 führt zu einer Inhibition der NF- κ B Aktivierung und damit der Transkription NF- κ B abhängiger Gene wie das Gen für hBD-2. Die Expression von IL-6 und IL-8 wird durch Zigarettenrauch nicht inhibiert, da die Gene beider Proteine über NF- κ B unabhängige Promotoren exprimiert werden können, deren Transkriptionsfaktoren zum Teil direkt durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert werden. Ein Beispiel dafür ist ASK-1 („*apoptosis signal-regulating kinase-1*“), das im inaktiven Zustand mit reduziertem Thioredoxin verbunden ist. Eine Oxidation von Thioredoxin führt zu der Aktivierung der Kinase, die daraufhin weitere Kinasen im MAPK-Weg aktiviert, was zu einer Kerntranslokation von AP-1 führt (Takeda et al., 2008).

Eine erhöhte Expression von Hsp-70 könnte zu dessen Export führen und danach einen positiven Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen haben.

Hsp-70 kann dadurch über den extrazellulären Weg indirekt die Aktivierung von NF- κ B über Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen bewirken. Als intrazelluläres Stressprotein kann es jedoch eine Hemmung der Aktivierung von NF- κ B im kanonischen Signalweg verursachen.

Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Mechanismus würde nach der Exposition des Epithels mit Zigarettenrauch und der Infektion mit *P.aeruginosa* die epitheliale Barriere durch die erhöhte Expression von Chaperonen schützen. Gleichzeitig werden proinflammatorische Zytokine und Chaperokine abgegeben, die chemotaktisch oder aktivierend auf andere Zellen des Immunsystems wirken.

Literatur

- Aarbiou, J., Tjabringa, G. S., Verhoosel, R. M., Ninaber, D. K., White, S. R., Peltenburg, L. T. C., Rabe, K. F., and Hiemstra, P. S. (2006). Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. *Inflamm Res*, 55(3):119–127.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., and Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30(5):627–634.
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96(9):3086–3093.
- Agerberth, B., Grunewald, J., Castañón-Velez, E., Olsson, B., Jörnvall, H., Wigzell, H., Eklund, A., and Gudmundsson, G. H. (1999). Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(1):283–290.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., and Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(1):195–199.
- Agou, F., Ye, F., Goffinont, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israël, A., and Véron, M. (2002). NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem*, 277(20):17464–17475.
- Ahmer, O. R. E., Essery, S. D., Saadi, A. T., Raza, M. W., Ogilvie, M. M., Weir, D. M., and Blackwell, C. C. (1999). The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 23(1):27–36.
- Akira, S. and Sato, S. (2003). Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis*, 35(9):555–562.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4(7):499–511.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783–801.
- Aldred, P. M. R., Hollox, E. J., and Armour, J. A. L. (2005). Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum Mol Genet*, 14(14):2045–2052.

- Armogida, S. A., Yannaras, N. M., Melton, A. L., and Srivastava, M. D. (2004). Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc*, 25(5):297–304.
- Arya, R., Mallik, M., and Lakhotia, S. C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci*, 32(3):595–610.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., and Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6(4):435–442.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., and Calderwood, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*, 277(17):15028–15034.
- Ashitani, J., Mukae, H., Nakazato, M., Ihi, T., Mashimoto, H., Kadota, J., Kohno, S., and Matsukura, S. (1998). Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis. *Eur Respir J*, 11(1):104–111.
- Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B., and Chavanieu, A. (1996). Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem*, 237(3):575–583.
- Baldwin, A. S. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14:649–683.
- Bals, R., Beisswenger, C., Blouquit, S., and Chinet, T. (2004). Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *J Cyst Fibros*, 3 Suppl 2:49–51.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1998a). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*, 102(5):874–880.
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1998b). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16):9541–9546.
- Bals, R. and Wilson, J. M. (2003). Cathelicidins—a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci*, 60(4):711–720.
- Barnes, P. J. (2008). Role of HDAC2 in the Pathophysiology of COPD. *Annu Rev Physiol*.

- Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002). Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*, 270:81–92.
- Basu, S. and Fenton, M. J. (2004). Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(5):L887–L892.
- Becker, M. N., Diamond, G., Verghese, M. W., and Randell, S. H. (2000). CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem*, 275(38):29731–29736.
- Beckmann, R. P., Mizzen, L. E., and Welch, W. J. (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248(4957):850–854.
- Behrendt, C. E. (2005). Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles. *Chest*, 128(3):1239–1244.
- Beisswenger, C. (2005). *Modulation der angeborenen Immunität der Lunge durch Umwelteinflüsse und allergische Entzündung*. Text.thesis.doctoral, Medizin, Universität Marburg.
- Beisswenger, C., Kandler, K., Hess, C., Garn, H., Felgentreff, K., Wegmann, M., Renz, H., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2006). Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J Immunol*, 177(3):1833–1837.
- Beisswenger, C., Platz, J., Seifart, C., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2004). Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro. *Respiration*, 71(4):402–409.
- Benedito, A. B., Lehtinen, M., Massol, R., Lopes, U. G., Kirchhausen, T., Rao, A., and Bonni, A. (2005). The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *J Biol Chem*, 280(4):2818–2825.
- Bensch, K. W., Raida, M., Mägert, H. J., Schulz-Knappe, P., and Forssmann, W. G. (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*, 368(2):331–335.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430(6996):257–263.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25(6):280–288.
- Borgatti, M., Bezzerri, V., Mancini, I., Nicolis, E., Dehecchi, M. C., Lampronti, I., Rizzotti, P., Cabrini, G., and Gambari, R. (2007). Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 357(4):977–983.

- Bowie, A. and O'Neill, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*, 67(4):508–514.
- Brackett, D. J., Lerner, M. R., Lacquement, M. A., He, R., and Pereira, H. A. (1997). A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on the neutrophil-derived protein CAP37 prevents endotoxin-induced responses in conscious rats. *Infect Immun*, 65(7):2803–2811.
- Broemer, M., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2004). Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation. *Oncogene*, 23(31):5378–5386.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3):238–250.
- Brown, G. D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6(1):33–43.
- Brown, G. D. and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 413(6851):36–37.
- Carmody, R. J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B., and Chen, Y. H. (2007). Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF- κ B p50 ubiquitination blockade. *Science*, 317(5838):675–678.
- Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., and Bowie, A. G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, 7(10):1074–1081.
- Celli, B. R., Halbert, R. J., Nordyke, R. J., and Schau, B. (2005). Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med*, 118(12):1364–1372.
- Chang, C.-I., Pleguezuelos, O., Zhang, Y.-A., Zou, J., and Secombes, C. J. (2005). Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect Immun*, 73(8):5053–5064.
- Chang, C.-I., Zhang, Y.-A., Zou, J., Nie, P., and Secombes, C. J. (2006). Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob Agents Chemother*, 50(1):185–195.
- Chen, G., Cao, P., and Goeddel, D. V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*, 9(2):401–410.
- Chen, H., Cowan, M. J., Hasday, J. D., Vogel, S. N., and Medvedev, A. E. (2007). Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of

- IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. *J Immunol*, 179(9):6097–6106.
- Chen, H., Wu, Y., Zhang, Y., Jin, L., Luo, L., Xue, B., Lu, C., Zhang, X., and Yin, Z. (2006). Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination. *FEBS Lett*, 580(13):3145–3152.
- Chen, I. S., Wilhelmsen, K. C., and Temin, H. M. (1983). Structure and expression of c-rel, the cellular homolog to the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T. *J Virol*, 45(1):104–113.
- Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D., and Oppenheim, J. J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, 271(6):2935–2940.
- Chilvers, M. A. and O'Callaghan, C. (2000). Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev*, 1(1):27–34.
- Chow, C. K. (1993). Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann N Y Acad Sci*, 686:289–298.
- Church, D. F. and Pryor, W. A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 64:111–126.
- Cowland, J. B., Johnsen, A. H., and Borregaard, N. (1995). hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett*, 368(1):173–176.
- Daubenberger, C. A. (2007). TLR9 agonists as adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccines. *Curr Opin Mol Ther*, 9(1):45–52.
- de Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L. J. M., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P. G., Blokx, W., Dogan, A., Hiemstra, P. S., van de Kerkhof, P. C., and Schalkwijk, J. (2005). High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 125(6):1163–1173.
- Dekhuijzen, P. N. R. (2004). Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 23(4):629–636.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and e Sousa, C. R. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663):1529–1531.
- Donnarumma, G., Paoletti, I., Buommino, E., Orlando, M., Tufano, M. A., and Baroni, A. (2004). *Malassezia furfur* induces the expression of beta-defensin-2 in human

- keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Arch Dermatol Res*, 295(11):474–481.
- Dorschner, R. A., Pestonjamas, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., Agerberth, B., Gudmundsson, G. H., and Gallo, R. L. (2001). Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol*, 117(1):91–97.
- Doz, E., Noulin, N., Boichot, E., Guénon, I., Fick, L., Bert, M. L., Lagente, V., Ryffel, B., Schnyder, B., Quesniaux, V. F. J., and Couillin, I. (2008). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol*, 180(2):1169–1178.
- Duits, L. A., Nibbering, P. H., van Strijen, E., Vos, J. B., Manesse-Lazeroms, S. P. G., van Sterkenburg, M. A. J. A., and Hiemstra, P. S. (2003). Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38(1):59–64.
- Dunn, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem*, 157(1):144–153.
- Eckmann, L. (2003). Mucosal defences against Giardia. *Parasite Immunol*, 25(5):259–270.
- Elloumi, H. Z. and Holland, S. M. (2008). Complex regulation of human cathelicidin gene expression: novel splice variants and 5'UTR negative regulatory element. *Mol Immunol*, 45(1):204–217.
- Felgentreff, K., Beisswenger, C., Griese, M., Gulder, T., Bringmann, G., and Bals, R. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus. *Peptides*, 27(12):3100–3106.
- Fellermann, K., Stange, D. E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C. L., Reinisch, W., Teml, A., Schwab, M., Lichter, P., Radlwimmer, B., and Stange, E. F. (2006). A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet*, 79(3):439–448.
- Fiete, D. J., Beranek, M. C., and Baenziger, J. U. (1998). A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO₄ binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(5):2089–2093.
- Figueiredo, C., Wittmann, M., Wang, D., Dressel, R., Seltsam, A., Blasczyk, R., and Eiz-Vesper, B. (2008). Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells. *Blood*.

- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stähle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem*, 272(24):15258–15263.
- Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F. U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, 370(6485):111–117.
- Fuhrman, C. A., Warren, A. D., Waring, A. J., Dutz, S. M., Sharma, S., Lehrer, R. I., Cole, A. L., and Cole, A. M. (2007). Retrocyclin RC-101 overcomes cationic mutations on the heptad repeat 2 region of HIV-1 gp41. *FEBS J*, 274(24):6477–6487.
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Othlinghaus, N., Brockmeyer, N. H., Altmeyer, P., and Kreuter, A. (2008). Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol*, 147(1):17–24.
- Ganz, T. and Lehrer, R. I. (1995). Defensins. *Pharmacol Ther*, 66(2):191–205.
- Ganz, T. and Lehrer, R. I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol*, 10(1):41–44.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 76(4):1427–1435.
- Garcia, A. E., Osapay, G., Tran, P. A., Yuan, J., and Selsted, M. E. (2008). Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes. *Infect Immun*, 76(12):5883–5891.
- García, J. R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodríguez-Jiménez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W. G., and Bals, R. (2001a). Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 306(2):257–264.
- García, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F. J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., and Forssmann, W. G. (2001b). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, 15(10):1819–1821.
- Gaschler, G. J., Zavitz, C. C. J., Bauer, C. M. T., Skrtic, M., Lindahl, M., Robbins, C. S.,

- Chen, B., and Stämpfli, M. R. (2008). Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38(2):218–226.
- Gauthier, M. and Degnan, B. M. (2008). The transcription factor NF-kappaB in the demosponge *Amphimedon queenslandica*: insights on the evolutionary origin of the Rel homology domain. *Dev Genes Evol*, 218(1):23–32.
- Go, Y.-M., Halvey, P. J., Hansen, J. M., Reed, M., Pohl, J., and Jones, D. P. (2007). Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. *Am J Pathol*, 171(5):1670–1681.
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88(4):553–560.
- Gombart, A. F., Borregaard, N., and Koeffler, H. P. (2005). Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J*, 19(9):1067–1077.
- Graef, I. A., Gastier, J. M., Francke, U., and Crabtree, G. R. (2001). Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(10):5740–5745.
- Greene, C. M. and McElvaney, N. G. (2005). Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53(5):418–427.
- Griffin, S., Taggart, C. C., Greene, C. M., O'Neill, S., and McElvaney, N. G. (2003). Neutrophil elastase up-regulates human beta-defensin-2 expression in human bronchial epithelial cells. *FEBS Lett*, 546(2-3):233–236.
- Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., and Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*, 238(2):325–332.
- Guillot, L., Medjane, S., Le-Barillec, K., Balloy, V., Danel, C., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (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(4):2712–2718.
- Hancock, J. T., Desikan, R., and Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2):345–350.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276(8):5707–5713.

- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636):861.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., and Schröder, J. M. (2000). Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22(6):714–721.
- Hasday, J. D., Bascom, R., Costa, J. J., Fitzgerald, T., and Dubin, W. (1999). Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest*, 115(3):829–835.
- Hatada, E. N., Nieters, A., Wulczyn, F. G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T. W., and Scheidereit, C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF- κ B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF- κ B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(6):2489–2493.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832):1099–1103.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*, 18(18):2195–2224.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663):1526–1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, 3(2):196–200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813):740–745.
- Henson, P. M., Vandivier, R. W., and Douglas, I. S. (2006). Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc*, 3(8):713–717.
- Hertz, C. J., Wu, Q., Porter, E. M., Zhang, Y. J., Weismüller, K.-H., Godowski, P. J., Ganz, T., Randell, S. H., and Modlin, R. L. (2003). Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol*, 171(12):6820–6826.
- Hill, C. P., Yee, J., Selsted, M. E., and Eisenberg, D. (1991). Crystal structure of defensin

- HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, 251(5000):1481–1485.
- Hinz, M., Broemer, M., Arslan, S. C., Otto, A., Mueller, E.-C., Dettmer, R., and Scheidereit, C. (2007). Signal responsiveness of I κ B kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *J Biol Chem*, 282(44):32311–32319.
- Hirata, M., Shimomura, Y., Yoshida, M., Morgan, J. G., Palings, I., Wilson, D., Yen, M. H., Wright, S. C., and Larrick, J. W. (1994a). Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect Immun*, 62(4):1421–1426.
- Hirata, M., Shimomura, Y., Yoshida, M., Wright, S. C., and Larrick, J. W. (1994b). Endotoxin-binding synthetic peptides with endotoxin-neutralizing, antibacterial and anticoagulant activities. *Prog Clin Biol Res*, 388:147–159.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426(6962):33–38.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17(18):2205–2232.
- Hogg, J. C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 364(9435):709–721.
- Hollox, E. J., Armour, J. A. L., and Barber, J. C. K. (2003). Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet*, 73(3):591–600.
- Hollox, E. J., Huffmeier, U., Zeeuwen, P. L. J. M., Palla, R., Lascorz, J., Rodijk-Olthuis, D., van de Kerkhof, P. C. M., Traupe, H., de Jongh, G., den Heijer, M., Reis, A., Armour, J. A. L., and Schalkwijk, J. (2008). Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet*, 40(1):23–25.
- Huang, G. T.-J., Zhang, H.-B., Kim, D., Liu, L., and Ganz, T. (2002). A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo. *Hum Gene Ther*, 13(17):2017–2025.
- Hunter-Lavin, C., Davies, E. L., Bacelar, M. M. F. V. G., Marshall, M. J., Andrew, S. M., and Williams, J. H. H. (2004). Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(2):511–517.
- Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S., and Ghosh, G. (1998). The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell*, 95(6):759–770.
- Isaacs, J. S., Xu, W., and Neckers, L. (2003). Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 3(3):213–217.

- Ishimoto, H., Mukae, H., Date, Y., Shimbara, T., Mondal, M. S., Ashitani, J., Hiratsuka, T., Kubo, S., Kohno, S., and Nakazato, M. (2006). Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J*, 27(2):253–260.
- Janeway, C. A. and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197–216.
- Ji, S., Kim, Y., Min, B.-M., Han, S. H., and Choi, Y. (2007). Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*, 42(6):503–510.
- Jia, H. P., Schutte, B. C., Schudy, A., Linzmeier, R., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., Tack, B. F., Mitros, J. P., Rosenthal, A., Ganz, T., and McCray, P. B. (2001). Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 263(1-2):211–218.
- Jones, D. E. and Bevins, C. L. (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem*, 267(32):23216–23225.
- Jones, D. E. and Bevins, C. L. (1993). Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett*, 315(2):187–192.
- Jurk, M., Kritzler, A., Schulte, B., Tluk, S., Schetter, C., Krieg, A. M., and Vollmer, J. (2006). Modulating responsiveness of human TLR7 and 8 to small molecule ligands with T-rich phosphorothiate oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol*, 36(7):1815–1826.
- Kao, C.-Y., Kim, C., Huang, F., and Wu, R. (2008). Requirements for two proximal NF-kappaB binding sites and IkappaB-zeta in IL-17A-induced human beta-defensin 2 expression by conducting airway epithelium. *J Biol Chem*, 283(22):15309–15318.
- Kemp, M., Go, Y.-M., and Jones, D. P. (2008). Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med*, 44(6):921–937.
- Kirschning, C. J. and Schumann, R. R. (2002). TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol*, 270:121–144.
- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C., Gallo, R. L., Clauss, M., and Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*, 111(11):1665–1672.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 92(5):2177–2186.

- Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R., and Dale, B. A. (2002). Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol*, 168(1):316–324.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lang, S. A., Klein, D., Moser, C., Gaumann, A., Glockzin, G., Dahlke, M. H., Dietmaier, W., Bolder, U., Schlitt, H. J., Geissler, E. K., and Stoeltzing, O. (2007). Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo. *Mol Cancer Ther*, 6(3):1123–1132.
- Lang, S. A., Moser, C., Fichnter-Feigl, S., Schachtschneider, P., Hellerbrand, C., Schmitz, V., Schlitt, H. J., Geissler, E. K., and Stoeltzing, O. (2008). Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*.
- Lee, J.-S., Lee, J. Y., Lee, M. Y., Hwang, D. H., and Youn, H. S. (2008). Acrolein with an alpha, beta-unsaturated carbonyl group inhibits LPS-induced homodimerization of toll-like receptor 4. *Mol Cells*, 25(2):253–257.
- Lehrer, R. I. (2007). Multispecific myeloid defensins. *Curr Opin Hematol*, 14(1):16–21.
- Lehrer, R. I., Barton, A., Daher, K. A., Harwig, S. S., Ganz, T., and Selsted, M. E. (1989). Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*, 84(2):553–561.
- Lehrer, R. I. and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*, 11(1):23–27.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6):973–983.
- Lenardo, M. J. and Baltimore, D. (1989). NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, 58(2):227–229.
- Linzmeier, R. M. and Ganz, T. (2005). Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics*, 86(4):423–430.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D. L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R. L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B. W., Adams, J. S.,

- Bloom, B. R., and Modlin, R. L. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311(5768):1770–1773.
- Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. (1990). Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5(7):1095–1097.
- Lou, Y.-W., Chen, Y.-Y., Hsu, S.-F., Chen, R.-K., Lee, C.-L., Khoo, K.-H., Tonks, N. K., and Meng, T.-C. (2008). Redox regulation of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in cancer cells. *FEBS J*, 275(1):69–88.
- Lu, Z., Kim, K.-A., Suico, M. A., Shuto, T., Li, J.-D., and Kai, H. (2004). MEF up-regulates human beta-defensin 2 expression in epithelial cells. *FEBS Lett*, 561(1-3):117–121.
- Luo, X., Zuo, X., Zhang, B., Song, L., Wei, X., Zhou, Y., and Xiao, X. (2008). Release of heat shock protein 70 and the effects of extracellular heat shock protein 70 on the production of IL-10 in fibroblast-like synoviocytes. *Cell Stress Chaperones*, 13(3):365–373.
- Lynn, D. J., Higgs, R., Gaines, S., Tierney, J., James, T., Lloyd, A. T., Fares, M. A., Mulcahy, G., and O'Farrelly, C. (2004). Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. *Immunogenetics*, 56(3):170–177.
- Løkke, A., Lange, P., Scharling, H., Fabricius, P., and Vestbo, J. (2006). Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax*, 61(11):935–939.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5(6):472–484.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., and Ghosh, G. (2001). I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*, 276(48):45225–45235.
- Malek, S., Huang, D.-B., Huxford, T., Ghosh, S., and Ghosh, G. (2003). X-ray crystal structure of an I κ B β x NF- κ B p65 homodimer complex. *J Biol Chem*, 278(25):23094–23100.
- Mallbris, L., Edström, D. W., Sundblad, L., Granath, F., and Stahle, M. (2005). UVB upregulates the antimicrobial protein hCAP18 mRNA in human skin. *J Invest Dermatol*, 125(5):1072–1074.
- Mannino, D. M. and Buist, A. S. (2007). Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*, 370(9589):765–773.

- Mars, W. M., Patmasiriwat, P., Maity, T., Huff, V., Weil, M. M., and Saunders, G. F. (1995). Inheritance of unequal numbers of the genes encoding the human neutrophil defensins HP-1 and HP-3. *J Biol Chem*, 270(51):30371–30376.
- Martin, R. J., Kraft, M., Chu, H. W., Berns, E. A., and Cassell, G. H. (2001). A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol*, 107(4):595–601.
- McCray, P. B. and Bentley, L. (1997). Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16(3):343–349.
- McGreal, E. P., Miller, J. L., and Gordon, S. (2005). Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*, 17(1):18–24.
- Mezayen, R. E., Gazzar, M. E., Seeds, M. C., McCall, C. E., Dreskin, S. C., and Nicolls, M. R. (2007). Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett*, 111(1):36–44.
- Moodie, F. M., Marwick, J. A., Anderson, C. S., Szulakowski, P., Biswas, S. K., Bauter, M. R., Kilty, I., and Rahman, I. (2004). Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J*, 18(15):1897–1899.
- Moser, C., Weiner, D. J., Lysenko, E., Bals, R., Weiser, J. N., and Wilson, J. M. (2002). beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun*, 70(6):3068–3072.
- Murakami, M., Lopez-Garcia, B., Braff, M., Dorschner, R. A., and Gallo, R. L. (2004). Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol*, 172(5):3070–3077.
- Murphy, T. F. (2006). The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*, 19(3):225–230.
- Myers, C. R. and Myers, J. M. (2009). The effects of acrolein on peroxiredoxins, thioredoxins, and thioredoxin reductase in human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 257(1-2):95–104.
- Münk, C., Wei, G., Yang, O. O., Waring, A. J., Wang, W., Hong, T., Lehrer, R. I., Landau, N. R., and Cole, A. M. (2003). The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 19(10):875–881.
- Nagaoka, I., Tamura, H., and Hirata, M. (2006). An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J Immunol*, 176(5):3044–3052.

- Nardo, A. D., Vitiello, A., and Gallo, R. L. (2003). Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol*, 170(5):2274–2278.
- Negro, R. D., Visconti, M., Trevisan, F., Bertacco, S., Micheletto, C., and Tognella, S. (2008). Erdosteine enhances airway response to salbutamol in patients with mild-to-moderate COPD. *Thorax*, 2(5):271–277.
- Nguyen, T. X., Cole, A. M., and Lehrer, R. I. (2003). Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides*, 24(11):1647–1654.
- Nilsson, M. F., Sandstedt, B., Sørensen, O., Weber, G., Borregaard, N., and Ståhle-Bäckdahl, M. (1999). The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun*, 67(5):2561–2566.
- Nomura, I., Goleva, E., Howell, M. D., Hamid, Q. A., Ong, P. Y., Hall, C. F., Darst, M. A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J. B., and Leung, D. Y. M. (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*, 171(6):3262–3269.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M., and Britigan, B. E. (2003). The Pseudomonas secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285(5):L1077–L1086.
- O'Neill, L. A. J. (2002). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol*, 270:47–61.
- O'Neill, L. A. J. and Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5):353–364.
- Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., and Hartl, F. U. (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, 341(6238):125–130.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25):13766–13771.
- Panyutich, A. V., Hiemstra, P. S., van Wetering, S., and Ganz, T. (1995). Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 12(3):351–357.

- Pasparakis, M., Luedde, T., and Schmidt-Supprian, M. (2006). Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ*, 13(5):861–872.
- Patil, A. A., Cai, Y., Sang, Y., Blecha, F., and Zhang, G. (2005). Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol Genomics*, 23(1):5–17.
- Pelham, H. R. (1984). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J*, 3(13):3095–3100.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1):49–62.
- Piatti, G., Gazzola, T., and Allegra, L. (1997). Bacterial adherence in smokers and non-smokers. *Pharmacol Res*, 36(6):481–484.
- Pittet, J.-F., Lee, H., Pespeni, M., O'Mahony, A., Roux, J., and Welch, W. J. (2005). Stress-induced inhibition of the NF-kappaB signaling pathway results from the insolubilization of the IkappaB kinase complex following its dissociation from heat shock protein 90. *J Immunol*, 174(1):384–394.
- Platz, J., Beisswenger, C., Dalpke, A., Koczulla, R., Pinkenburg, O., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2004). Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol*, 173(2):1219–1223.
- Pryor, W. A., Dooley, M. M., and Church, D. F. (1985). Mechanisms of cigarette smoke toxicity: the inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by nitric oxide/isoprene mixtures in air. *Chem Biol Interact*, 54(2):171–183.
- Rabe, K. F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P. J., Buist, S. A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C., Zielinski, J., and for Chronic Obstructive Lung Disease, G. I. (2007). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 176(6):532–555.
- Rada, B., Lekstrom, K., Damian, S., Dupuy, C., and Leto, T. L. (2008). The Pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J Immunol*, 181(7):4883–4893.
- Rahman, I. and Adcock, I. M. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*, 28(1):219–242.
- Rallabhandi, P., Bell, J., Boukhvalova, M. S., Medvedev, A., Lorenz, E., Arditi, M., Hemming, V. G., Blanco, J. C. G., Segal, D. M., and Vogel, S. N. (2006). Analysis

- of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol*, 177(1):322–332.
- Ran, R., Lu, A., Zhang, L., Tang, Y., Zhu, H., Xu, H., Feng, Y., Han, C., Zhou, G., Rigby, A. C., and Sharp, F. R. (2004). Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev*, 18(12):1466–1481.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18:571–573.
- Roebuck, K. A., Carpenter, L. R., Lakshminarayanan, V., Page, S. M., Moy, J. N., and Thomas, L. L. (1999). Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol*, 65(3):291–298.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., and Prince, A. S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(11):1209–1223.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491.
- Sakamoto, N., Mukae, H., Fujii, T., Ishii, H., Yoshioka, S., Kakugawa, T., Sugiyama, K., Mizuta, Y., Ichi Kadota, J., Nakazato, M., and Kohno, S. (2005). Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288(3):L508–L513.
- Sandor, F. and Buc, M. (2005). Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)*, 51(5):148–157.
- Schauber, J., Dorschner, R. A., Coda, A. B., Büchau, A. S., Liu, P. T., Kiken, D., Helfrich, Y. R., Kang, S., Elalieh, H. Z., Steinmeyer, A., Zügel, U., Bikle, D. D., Modlin, R. L., and Gallo, R. L. (2007). Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 117(3):803–811.
- Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lührs, H., and Gudmundsson, G. H. (2003). Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut*, 52(5):735–741.
- Schmidtchen, A., Frick, I.-M., Andersson, E., Tapper, H., and Björck, L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol*, 46(1):157–168.

- Schröder, M. and Bowie, A. G. (2005). TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol*, 26(9):462–468.
- Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L., and McCray, P. B. (2002). Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):2129–2133.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2):368–379.
- Selsted, M. E. (2004). Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr Protein Pept Sci*, 5(5):365–371.
- Selsted, M. E. and Harwig, S. S. (1989). Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem*, 264(7):4003–4007.
- Selsted, M. E. and Ouellette, A. J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, 6(6):551–557.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5):705–716.
- Sethi, S. and Murphy, T. F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 359(22):2355–2365.
- Shaykhiev, R., Beisswenger, C., Kändler, K., Senske, J., Püchner, A., Damm, T., Behr, J., and Bals, R. (2005). Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(5):L842–L848.
- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, 85(2):229–236.
- Soong, L. B., Ganz, T., Ellison, A., and Caughey, G. H. (1997). Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res*, 46(3):98–102.
- Steiner, T. S. (2007). How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infect Immun*, 75(2):545–552.
- Stoller, J. K. and Aboussouan, L. S. (2005). Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 365(9478):2225–2236.
- Sullivan, J. C., Kalaitzidis, D., Gilmore, T. D., and Finnerty, J. R. (2007). Rel homology

- domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol*, 217(1):63–72.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., Ohashi, P. S., Mak, T. W., and Yeh, W.-C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, 416(6882):750–756.
- Szabó, C., Wong, H. R., and Salzman, A. L. (1996). Pre-exposure to heat shock inhibits peroxynitrite-induced activation of poly(ADP) ribosyltransferase and protects against peroxynitrite cytotoxicity in J774 macrophages. *Eur J Pharmacol*, 315(2):221–226.
- Sørensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97(12):3951–3959.
- Sørensen, O. E., Gram, L., Johnsen, A. H., Andersson, E., Bangsbøll, S., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., Malm, J., Egesten, A., and Borregaard, N. (2003). Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J Biol Chem*, 278(31):28540–28546.
- Takeda, K. and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16(1):3–9.
- Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., and Ichijo, H. (2008). Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48:199–225.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2002). MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 270:155–167.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J., and Selsted, M. E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*, 286(5439):498–502.
- Thompson, C. and Burcham, P. (2008). Genome-Wide Transcriptional Responses to Acrolein. *Chem Res Toxicol*.
- Toledano, M. B. and Leonard, W. J. (1991). Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(10):4328–4332.
- Tomasinsig, L. and Zanetti, M. (2005). The cathelicidins—structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*, 6(1):23–34.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4354.

- Tran, D., Tran, P. A., Tang, Y.-Q., Yuan, J., Cole, T., and Selsted, M. E. (2002). Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides. *J Biol Chem*, 277(5):3079–3084.
- Trivedi, N. R., Gilliland, K. L., Zhao, W., Liu, W., and Thiboutot, D. M. (2006). Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. *J Invest Dermatol*, 126(5):1071–1079.
- Tsutsumi, S. and Neckers, L. (2007). Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci*, 98(10):1536–1539.
- Tsutsumi-Ishii, Y. and Nagaoka, I. (2002). NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol*, 71(1):154–162.
- Tsutsumi-Ishii, Y. and Nagaoka, I. (2003). Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J Immunol*, 170(8):4226–4236.
- Uzzell, T., Stolzenberg, E. D., Shinnar, A. E., and Zasloff, M. (2003). Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides*, 24(11):1655–1667.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D., and Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*, 277(17):15107–15112.
- Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B., and Ganz, T. (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 101(8):1633–1642.
- van Wetering, S., Mannesse-Lazeroms, S. P. G., van Sterkenburg, M. A. J. A., and Hiemstra, P. S. (2002). Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone. *Inflamm Res*, 51(1):8–15.
- Vega, V. L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., and Maio, A. D. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol*, 180(6):4299–4307.
- Vogelmeier, C., Buhl, R., Criée, C. P., Gillissen, A., Kardos, P., Köhler, D., Magnussen, H., Morr, H., Nowak, D., Pfeiffer-Kascha, D., Petro, W., Rabe, K., Schultz, K., Sitter, H., Teschler, H., Welte, T., Wettengel, R., Worth, H., Atemwegsliga, D., and für Pneumologie und Beatmungsmedizin, D. G. (2007). [Guidelines for the diagnosis and

- therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie*, 61(5):e1–40.
- von Haussen, J., Koczulla, R., Shaykhiev, R., Herr, C., Pinkenburg, O., Reimer, D., Wiewrodt, R., Biesterfeld, S., Aigner, A., Czubayko, F., and Bals, R. (2008). The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer*, 59(1):12–23.
- Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schröder, J. M., and Harder, J. (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*, 281(4):2005–2011.
- Wang, J., Shao, Y., Bennett, T. A., Shankar, R. A., Wightman, P. D., and Reddy, L. G. (2006a). The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem*, 281(49):37427–37434.
- Wang, Q., Wang, W., Zheng, J., Tabibian, S., Xie, Y., Song, J., Waring, A. J., Chiu, R., Yang, O. O., Chen, I. S. Y., Lehrer, R. I., and Pang, S. (2007). Paradoxical effects of two theta-defensins on HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 23(4):508–514.
- Wang, R., Kovalchin, J. T., Muhlenkamp, P., and Chandawarkar, R. Y. (2006b). Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood*, 107(4):1636–1642.
- Wang, T.-T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J. W., Mader, S., White, J. H., and Hanrahan, J. H. (2004a). Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*, 173(5):2909–2912.
- Wang, W., Mulakala, C., Ward, S. C., Jung, G., Luong, H., Pham, D., Waring, A. J., Kaznessis, Y., Lu, W., Bradley, K. A., and Lehrer, R. I. (2006c). Retrocyclins kill bacilli and germinating spores of *Bacillus anthracis* and inactivate anthrax lethal toxin. *J Biol Chem*, 281(43):32755–32764.
- Wang, W., Owen, S. M., Rudolph, D. L., Cole, A. M., Hong, T., Waring, A. J., Lal, R. B., and Lehrer, R. I. (2004b). Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol*, 173(1):515–520.
- Wang, X., Zhang, Z., Louboutin, J.-P., Moser, C., Weiner, D. J., and Wilson, J. M. (2003). Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J*, 17(12):1727–1729.

- Wang, Y. R., Xiao, X. Z., Huang, S. N., Luo, F. J., You, J. L., Luo, H., and Luo, Z. Y. (1996). Heat shock pretreatment prevents hydrogen peroxide injury of pulmonary endothelial cells and macrophages in culture. *Shock*, 6(2):134–141.
- Wasserman, S. A. (1993). A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell*, 4(8):767–771.
- Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J.-M. M., and Harder, J. (2006). Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol*, 126(1):121–127.
- Weiss, Y. G., Bromberg, Z., Raj, N., Raphael, J., Goloubinoff, P., Ben-Neriah, Y., and Deutschman, C. S. (2007). Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of IkkappaB kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 35(9):2128–2138.
- Weiss, Y. G., Maloyan, A., Tazelaar, J., Raj, N., and Deutschman, C. S. (2002). Adenoviral transfer of HSP-70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 110(6):801–806.
- Welte, T., Suttorp, N., and Marre, R. (2004). CAPNETZ-community-acquired pneumonia competence network. *Infection*, 32(4):234–238.
- Wetering, S. V., Manesse-Lazeroms, S. P., Dijkman, J. H., and Hiemstra, P. S. (1997a). Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J Leukoc Biol*, 62(2):217–226.
- Wetering, S. V., Manesse-Lazeroms, S. P., Sterkenburg, M. A. V., Daha, M. R., Dijkman, J. H., and Hiemstra, P. S. (1997b). Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Physiol*, 272(5 Pt 1):L888–L896.
- Whitsett, J. A. (2002). Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Invest*, 109(5):565–569.
- Wilde, C. G., Griffith, J. E., Marra, M. N., Snable, J. L., and Scott, R. W. (1989). Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem*, 264(19):11200–11203.
- Winston, G. W., Church, D. F., Cueto, R., and Pryor, W. A. (1993). Oxygen consumption and oxyradical production from microsomal reduction of aqueous extracts of cigarette tar. *Arch Biochem Biophys*, 304(2):371–378.
- Wong, H. R., Mannix, R. J., Rusnak, J. M., Boota, A., Zar, H., Watkins, S. C., Lazo, J. S., and Pitt, B. R. (1996). The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15(6):745–751.

- Wu, H., Zhang, G., Minton, J. E., Ross, C. R., and Blecha, F. (2000). Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun*, 68(10):5552–5558.
- Yamasaki, K., Schaubert, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R. A., Schechter, N. M., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A., and Gallo, R. L. (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J*, 20(12):2068–2080.
- Yanagi, S., Ichi Ashitani, J., Ishimoto, H., Date, Y., Mukae, H., Chino, N., and Nakazato, M. (2005). Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir Res*, 6:130.
- Yanbaeva, D. G., Dentener, M. A., Creutzberg, E. C., Wesseling, G., and Wouters, E. F. M. (2007). Systemic effects of smoking. *Chest*, 131(5):1557–1566.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., and Oppenheim, J. J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 22:181–215.
- Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., and Oppenheim, J. J. (2000a). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 68(1):9–14.
- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., and Chertov, O. (2000b). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*, 192(7):1069–1074.
- Yang, S.-R., Chida, A. S., Bauter, M. R., Shafiq, N., Seweryniak, K., Maggirwar, S. B., Kilty, I., and Rahman, I. (2006). Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291(1):L46–L57.
- Yim, S., Dhawan, P., Rangunath, C., Christakos, S., and Diamond, G. (2007). Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Cyst Fibros*, 6(6):403–410.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10):781–791.
- Young, J. C., Barral, J. M., and Hartl, F. U. (2003). More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci*, 28(10):541–547.

- Zaiou, M., Nizet, V., and Gallo, R. L. (2003). Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol*, 120(5):810–816.
- Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, 374(1):1–5.
- Zhao, C., Ganz, T., and Lehrer, R. I. (1995a). Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett*, 376(3):130–134.
- Zhao, C., Ganz, T., and Lehrer, R. I. (1995b). The structure of porcine protegrin genes. *FEBS Lett*, 368(2):197–202.
- Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R. I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*, 396(2-3):319–322.
- Zheng, X., Rosenberg, L. E., Kalousek, F., and Fenton, W. A. (1993). GroEL, GroES, and ATP-dependent folding and spontaneous assembly of ornithine transcarbamylase. *J Biol Chem*, 268(10):7489–7493.
- Zitzler, S., Hellwig, A., Hartl, F.-U., Wieland, F., and Diestelkötter-Bachert, P. (2008). Distinct binding sites for the ATPase and substrate-binding domain of human Hsp70 on the cell surface of antigen presenting cells. *Mol Immunol*, 45(15):3974–3983.

6 Anhang

6.1 Veröffentlichungen

Herr, C., & Bals, R. (2007). *Angeborene Immunität - Speziesvergleich und Ontogenese*. Pneumologie, 61(7), 483-5.

Herr, C., Shaykhiev, R., & Bals, R. (2007). *The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases*. Expert Opinion on Biological Therapy, 7(9), 1449-61.

von Haussen, J., Koczulla, R., Shaykhiev, R., **Herr, C.**, Pinkenburg, O., Reimer, D., Wiewrodt, R., Biesterfeld, S., Aigner, A., Czubayko, F., and Bals, R. (2008). *The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells*. Lung Cancer, 59(1), 12-23.

C. Herr, P.S. Hiemstra and R. Bals (2008). *Cathelicidins in Pulmonary innate immunity*. Chapter in: Mechanisms of Pulmonary Innate Immunity, 171-187 ISBN : 978-81-308-0315-9. Editor : Clifford C. Taggart. Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India.

Ch. Herr, Ch. Beisswenger, Ch. Hess, K. Kändler, N. Suttorp, T. Welte, C. Vogelmeier, R. Bals (2008): *Rauchen supprimiert das angeborene Immunsystem*. Dtsch Med Wochenschr. Jul;133(27):1466.

Herr, C., Beisswenger, C., Hess, C., Kandler, K., Suttorp, N., Welte, T., Schroeder, J.M., Vogelmeier, C., and Bals, R. for the CAPNETZ Study Group (2009). *Suppression of pulmonary innate host defence in smokers*. Thorax, 64(2), 144-9.

Pignatti, P., Balestrino, A., **Herr, C.**, Bals, R., Moretto, D., Corradi, M., Alinovi, R., Delmastro, M., Vogelmeier, C., Nava, S., Moscato, G., and Balbi, B. (2009). *Tracheostomy and related host-pathogen interaction are associated with airway inflammation as characterized by tracheal aspirate analysis*. Respiratory Medicine, 103(2), 201-8.

Hess, C., Beisswenger, C., **Herr, C.**, Schmid, R. M., and Bals, R. (2009). *Myeloid RelA regulates pulmonary host defense networks*. Eur. Respir. J., submitted.

6.2 Kongressbeiträge

6.2.1 Vorträge

C. Herr, R. Bals: *Angeborene Immunität - Speziesvergleich und Ontogenese*. Symposium, 10. Workshop des Arbeitskreises „Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des

respiratorischen Systems“ der DVG Sektion Pathophysiologie und Aerosolmedizin, 48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 14.-17.03.2007, Mannheim.

C. Herr, C. Beisswenger, C. Hess, K. Kandler, N. Suttrop, T. Welte, C. Vogelmeier, R. Bals: *Suppression of pulmonary innate host defense in smokers*. European respiratory society annual congress, 15.-19.09.2007, Stockholm, Sweden.

Herr C., Beisswenger C., Suttrop N., Vogelmeier C., Bals R. et al: *Suppression of pulmonary innate host defense in smokers*. Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Herbsttagung der Sektion Zellbiologie, 12./13. Oktober 2007, München.

Gäbel F., Hess C., **Herr C.**, Bauer S., Yu P., Bals R.: *Funktion epithelialer Toll-like Rezeptoren*. Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Herbsttagung der Sektion Zellbiologie, 12./13. Oktober 2007, München.

Chr. Herr, Chr. Beisswenger, Chr. Hess, K. Kändler, N. Suttrop, T. Welte, C. Vogelmeier und R. Bals: *Rauchen supprimiert das angeborene Immunsystem*. 114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 29. März – 2. April 2008, Wiesbaden.

C. Herr, F. Gäbel, C. Hess, P. Yu, S. Bauer, R. Bals: *Funktion epithelialer Toll-like Rezeptoren*. 49. Kongress Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 9. - 12. April 2008, Lübeck.

C. Herr, C. Beisswenger, C. Hess, K. Kändler, N. Suttrop, T. Welte, C. Vogelmeier, R. Bals: *Suppression des angeborenen Immunsystems der Lunge durch Rauchen*. Posterdiskussion. 49. Kongress Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 9. - 12. April 2008, Lübeck.

S. Noeske, R. Bals, **C. Herr**, C. Vogelmeier, A.R. Koczulla: *Alpha-1-antitrypsin is detectable and can be quantified in exhaled breath condensate*. European respiratory society annual congress, 04.-08.10.2008, Berlin.

C. Hess, **C. Herr**, C. Beisswenger, R.M. Schmid, R. Bals: *Macrophages regulate epithelial defence of the respiratory tract. E-Communication*. European respiratory society annual congress, 04.-08.10.2008, Berlin.

AR Koczulla, S Noeske, **C Herr**, C Vogelmeier, R Bals: *Alpha 1-Antitrypsin als Biomarker der COPD Exazerbation*. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 7./8. November 2008, Freiburg.

T Zakharkina, **C Herr**, A.Ö. Yildirim, M Friedrich, R Bals: *T-RFLP – a representative tool to study pulmonary microbial communities*. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der

Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 7./8. November 2008, Freiburg.

M Branscheidt, **C Herr**, S Al-Alwani, C Vogelmeier, R Bals: *Vitamin D moduliert die angeborene Immunreaktion von Monozyten/Makrophagen*. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 7./8. November 2008, Freiburg.

Herr C, Beisswenger C, Vogelmeier C, Bals R: *Zigarettenrauch inhibiert die Aktivierung humaner Atemwegsepithelzellen durch Gram-negative Bakterien*. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 7./8. November 2008, Freiburg.

T. Zakharkina, **C. Herr**, A. Yildirim, M. Friedrich, R. Bals: T-RFLP – a representative tool to study pulmonary microbial communities. 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 18. - 21. März 2009, Mannheim. Abstrakt als freier Vortrag angenommen.

C. Herr, V. Kotke, A. R. Koczulla, C. Vogelmeier, R. Bals: *Identifikation und Analyse unbekannter und seltener Mutationen des Alpha-1-Antitrypsin Gens*. 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 18. - 21. März 2009, Mannheim. Abstrakt als freier Vortrag angenommen.

C Herr, V Kotke, R Koczulla, C Vogelmeier, and R Bals: *Inhibition of $Nf-\kappa B$ in Airway Epithelial Cells by Cigarette Smoke in an in vitro infection model*. American Thoracic Society International Conference, May 15-20, 2009, San Diego, USA. Abstrakt als „Oral Presentation“ angenommen.

6.2.2 Posterbeiträge

J. von Haussen, R. Koczulla, R. Shaykhiev, **C. Herr**, A. Aigner, F. Czubayko, R. Bals: *The human endogenous antibiotic LL-37 promotes growth of lung cancer cells*. 48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 14.-17.03.2007, Mannheim.

A.-R. Koczulla, S. Noeske, **Chr. Herr**, R. Jörres, C. Vogelmeier, R. Bals: *Raucher haben niedrigere pH-Werte im exhalierten Atemwegskondensat im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern*. 114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 29. März – 2. April 2008, Wiesbaden.

Chr. Hess, Chr. Beisswenger, **Chr. Herr**, R. M. Schmid, R. Bals: *Makrophagen regulieren die epitheliale Abwehr der Lunge*. 114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 29. März – 2. April 2008, Wiesbaden.

R. Bals, C. Hess, **C. Herr**, C. Beisswenger, C. Vogelmeier: *A Macrophage - Epithelial Network Regulates Pulmonary Host Defense*. American Thoracic Society International Conference, May 16-21, 2008, Toronto CA.

C. Herr, C. Beisswenger, C. Hess, K. Kaendler, N. Suttrop, T. Welte, C. Vogelmeier, R. Bals: *Suppression of Pulmonary Innate Host Defense in Smokers*. American Thoracic Society International Conference, May 16-21, 2008, Toronto CA.

A.R. Koczulla, S. Noeske, **C. Herr**, C. Vogelmeier, R. Bals: *Alpha 1-Antitrypsin als Biomarker der COPD Exazerbation*. 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 18. - 21. März 2009, Mannheim. Abstrakt zur Posterdiskussion angenommen.

C. Herr, C. Beisswenger, C. Vogelmeier, R. Bals: *Zigarettenrauch inhibiert die Aktivierung humaner Atemwegsepithelzellen durch Gram-positive Bakterien*. 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V., 18. - 21. März 2009, Mannheim. Abstrakt zur Posterbegehung angenommen.

C Herr, C Beisswenger, C Vogelmeier, and R Bals: *Identification and Analysis of Rare and Novel Mutations of the Alpha-1-Antitrypsin Gene*. American Thoracic Society International Conference, May 15-20, 2009, San Diego, USA. Abstrakt als Poster angenommen.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Robert Bals für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, seine Hilfe bei allen praktischen und theoretischen Fragen, sowie die Unterstützung meiner beruflichen Laufbahn.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit danken. Besonders Annette Püchner und Thomas Damm, die mit ihrem Einsatz wesentlich zu einem reibungslosen Ablauf des Laboralltags beitragen.

Ein großes Dankeschön an meine Eltern und meine Schwester, die mich während meiner Ausbildung immer in großem Maße unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Nicole und unsere Kinder. Vielen Dank für euer Verständnis, da ich doch manchmal meine familiären Pflichten zu Gunsten meiner Arbeit vernachlässigt habe. Die Familie ist ein wohltuender Gegensatz zum Alltag des Arbeitslebens. Danke, dass ihr mich während meiner Ausbildung unterstützt habt.

Lebenslauf

<u>Zur Person:</u>	Christian Herr
geb.am:	28.12.1974
	in Bad Soden-Salmünster
Adresse:	Zum Lahnberg 52 35043 Marburg
<u>Schule:</u>	
	Sept. 1981 - Juli 1985 Grundschule
	Sept. 1985 - Juni 1994 Gymnasium - Abschluß Juni 1994 mit Abitur
<u>Wehrdienst:</u>	
	Okt. 1994 - Sept. 1995
<u>Studium:</u>	
	März 1996 - Sept. 1998 FH Giessen-Friedberg, Studiengang Technisches Gesundheitswesen.
	Okt. 1998 - Okt. 2003 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main.
	Jan. 2003 - Okt. 2003 Diplomarbeit im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main.
	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe.
<u>Praktika:</u>	
	Nov. 1995 - Jan. 1996 Industriepraktikum Metallbearbeitung, Vorrichtungsbau, Qualitätsmanagement.
	Febr. - April 2001 Lion Bioscience, Heidelberg. Industriepraktikum in der Abteilung "Proteins & Assays".
	Sommersemester 2002 J. W. Goethe Universität, Frankfurt. Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum Pflanzenphysiologie für Biologen.
	Sommersemester 2003 J. W. Goethe Universität, Frankfurt. Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum „Biologie für Mediziner II“
<u>Promotion:</u>	
	ab April 2004 Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „Rauchen supprimiert das angeborene Immunsystem“ am Fachbereich Medizin im Ergänzungstudiengang Humanbiologie, durchgeführt im Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. R. Bals.

Verzeichnis meiner Akademischen Lehrer:

Meine Akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

in Marburg:

Bals, Vogelmeier.

in Frankfurt/Main (J.W.Goethe Universität):

Bereiter-Hahn, Engels, Gnatzy, Groner, Kahl, Kröger, Nover, Osiewacz, Soppa,
Starzinsky-Powitz, Wittig, Volkmand, Zimmermann.

in Gießen:

Alter, Dammann, Jitschin, Kempf, Kirschbaum, Kitzrow, Kleinöder, Krisch, Metz, Nietert,
Pallauf, Stadlbauer.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Rauchen supprimiert das angeborene Immunsystem“ im Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. R. Bals mit Unterstützung durch die unten genannten Personen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Organen veröffentlicht:

Herr, C., & Bals, R. (2007). *Angeborene Immunität - Speziesvergleich und Ontogenese*. *Pneumologie*, 61(7), 483-5.

Herr, C., Shaykhiev, R., & Bals, R. (2007). *The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(9), 1449-61.

C. Herr, P.S. Hiemstra and R. Bals (2008). *Cathelicidins in Pulmonary innate immunity*. Chapter in: *Mechanisms of Pulmonary Innate Immunity*, 171-187 ISBN : 978-81-308-0315-9. Editor : Clifford C. Taggart. *Research Signpost* 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India.

Ch. Herr, Ch. Beisswenger, Ch. Hess, K. Kändler, N. Suttorp, T. Welte, C. Vogelmeier, R. Bals (2008): *Rauchen supprimiert das angeborene Immunsystem*. *Dtsch Med Wochenschr.* Jul;133(27):1466.

Herr, C., Beisswenger, C., Hess, C., Kandler, K., Suttorp, N., Welte, T., Schroeder, J.M., Vogelmeier, C., and Bals, R. for the CAPNETZ Study Group (2009). *Suppression of pulmonary innate host defence in smokers*. *Thorax*, 64(2), 144-9.

Die Durchführung der Arbeit wurde durch folgende Personen unterstützt:

Prof. Dr. Dr. Robert Bals	Bereitstellung des Themas und fortwährende Betreuung
Dr. C. Beisswenger	Etablierung des ALI-Kulturmodells
Dr. C. Hess	Kultivierung der pHBEs und Pflege der ALIs
Annette Püchner	technische Unterstützung
Thomas Damm	technische Unterstützung, Zellkultur

Marburg, 16.03.2009