

Aus dem Forschungszentrum Borstel

Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Gruppe Angeborene Immunität (Laborgruppenleiter: PD Dr. Holger Heine)

Abteilung Immunologie und Zellbiologie (Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

DIE ROLLE ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE IN DER COPD:

Expressionsmuster und mögliche Regulationsmechanismen in der Lunge von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

ELLEN ANDRESEN

Kiel

2009

Referent/in:	...PD Dr. rer. nat. Holger Heine.....
Korreferent/in:	...Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder.....
Tag der mündlichen Prüfung:	...15. Juli 2009.....
Zum Druck genehmigt:	...15. Juli 2009.....

*"Ideale sind wie Sterne; man kann sie nicht erreichen,
aber man kann sich nach ihnen orientieren."*

CARL SCHURZ

Meinem lieben Frank gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Definition der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung	1
1.2	Das Abwehrsystem der Lunge	2
1.3	Endogene Peptidantibiotika der Lunge	4
1.4	Funktionen der Defensine in der Lunge	6
1.5	Weitere potenzielle Peptidantibiotika der Lunge	7
1.6	Epigenetik und Genregulation.....	8
1.6.1	DNA-Methylierung.....	10
1.6.2	Kovalente Histon-Modifikationen	11
1.6.3	Humane Histon-Deacetylasen	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Ausgewählte Geräte und Zubehör	15
2.2	Kits	15
2.3	Chemikalien und Reagenzien	16
2.4	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	17
2.4.1	Zellkultur	17
2.4.2	Bakterienanzucht	17
2.4.3	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	17
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	18
2.5	Stimulantien und weitere Substanzen.....	18
2.6	Enzyme	19
2.7	Antikörper.....	19
2.8	Oligonucleotide (Primer)	19
2.9	Studiendesign und Patientenmaterial	21
2.9.1	Verarbeitung der BAL-Flüssigkeiten	22
2.9.2	Verarbeitung der Bronchialschleimhautbiopsien.....	22
2.9.3	Hemacolor-Schnellfärbung	23
2.10	Zellkultur	23
2.10.1	Behandlung von A549 und NCI-H727-Zellen.....	23
2.11	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	24
2.12	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.12.1	Isolierung von genomischer DNA.....	24
2.12.2	Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.12.3	Isolierung von Gesamt-RNA	24

2.12.4	Reverse Transkription	24
2.12.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.12.6	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR	25
2.12.7	Bisulfit-Sequenzierung	27
2.12.8	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	27
2.12.9	Klonierung mittels <i>TOPO Cloning</i> -System	28
2.12.10	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.13	Statistik.....	29
3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	Patienten-Kollektiv.....	31
3.1.1	Analyse der Zellverteilung in der BAL-Flüssigkeit in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege.....	32
3.1.2	Identifikation von Mikroorganismen im Patientenmaterial	33
3.2	Expression von α - und β -Defensinen im Zusammenhang mit einer COPD	35
3.2.1	Analyse der mRNA-Expression von α - und β -Defensinen in Abhängigkeit von der COPD	35
3.2.2	Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege.....	37
3.2.3	Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von der AECOPD	38
3.2.4	Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i>	40
3.2.5	Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von weiteren diagnostischen Parametern	42
3.3	Expression von <i>RNASE7</i> und <i>S100A7</i> im Zusammenhang mit einer COPD.....	45
3.3.1	Analyse der mRNA-Expression von <i>RNASE7</i> und <i>S100A7</i> in Abhängigkeit von der COPD und diagnostischen Parametern	45
3.3.2	Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression von <i>RNASE7</i> und <i>S100A7</i>	47
3.4	Molekulare Mechanismen transkriptioneller Aktivierung von <i>DEFB1</i>	48
3.4.1	Methylierungsanalyse von <i>DEFB1</i>	49
3.4.1.1	Analyse von CpG-Inseln im <i>DEFB1</i>	49
3.4.1.2	Analyse der CpG-Methylierung im <i>DEFB1</i> nach Bisulfit-Behandlung im Biopsiematerial	50
3.4.2	Effekte von 5-Aza-2'-desoxycytidin auf <i>DEFB1</i>	52
3.4.2.1	Effekte von ZdCyt auf die mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> im Zellkulturmodell.....	52
3.4.2.2	Effekte von ZdCyt auf die CpG-Methylierung im <i>DEFB1</i> im Zellkulturmodell.....	54
3.4.3	Effekte von Trichostatin A auf <i>DEFB1</i>	57
3.4.3.1	Effekte von TSA auf die mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> im Zellkulturmodell.....	57
3.4.3.2	Effekte von TSA auf die CpG-Methylierung im <i>DEFB1</i> im Zellkulturmodell.....	58

3.4.4	Analyse der kovalenten Histon-Modifikationen im <i>DEFB1</i>	60
3.4.4.1	Analyse der Histon-Acetylierung von <i>DEFB1</i> nach Behandlungen mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen	60
3.4.4.2	Korrelation zwischen Histon-Acetylierung und der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> in Zellen der BAL-Flüssigkeit	62
3.4.4.3	Analyse der Histon-Methylierung von <i>DEFB1</i> nach Behandlungen mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen	65
3.4.4.4	Korrelation zwischen Histon-Methylierung und der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> in Zellen der BAL-Flüssigkeit	66
3.4.5	Analyse der Rolle von <i>HDACs</i> in der Regulation von <i>DEFB1</i>	71
3.4.5.1	Analyse der mRNA-Expression von <i>HDACs</i> in Abhängigkeit von der COPD und Parametern der Lungenfunktion	71
3.4.5.2	Korrelation zwischen mRNA-Expression von <i>HDACs</i> und <i>DEFB1</i> im Biopsiematerial	72
3.4.5.3	Effekte von TSA auf die mRNA-Expression von <i>HDACs</i> im Zellkulturmodell	73
4	DISKUSSION.....	77
4.1	COPD ist mit einer veränderten Expression von <i>DEFB1</i> assoziiert.....	78
4.2	<i>S. aureus</i> , nicht <i>E. coli</i> , ist in der Lage, <i>S100A7</i> zu induzieren.....	82
4.3	Epigenetische Mechanismen sind an der Aktivierung von <i>DEFB1</i> beteiligt.....	85
4.4	Fazit	93
	REFERENZEN	95
	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
	ABSTRACT.....	111
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	113
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	117
	TABELLENVERZEICHNIS	119
	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	121
	CURRICULUM VITAE	123
	DANKSAGUNG	125
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	127

1 EINLEITUNG

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) ist mit weltweit bereits über 210 Millionen betroffenen Menschen eine Volkskrankheit. Gegenwärtig ist sie die vierthäufigste Todesursache. Die Weltgesundheitsorganisation geht davon aus, dass die COPD in den kommenden Jahren stark zunehmen wird und bis zum Jahr 2030 den dritten Platz unter den häufigsten Todesursachen einnimmt. Die Prognose der COPD ist insgesamt als schlecht zu bewerten, wozu entscheidend beiträgt, dass die Erkrankung aufgrund der häufigen, aber sehr wenig spezifischen Symptome erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird. Dabei besteht durch die sehr hohen gesundheitsökonomischen Kosten ein großes Interesse an der Entwicklung neuer Therapieansätze. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist ein grundlegend besseres Verständnis der komplexen und vielfältigen Pathomechanismen der COPD.

1.1 Definition der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung

Die Bezeichnung *chronic obstructive (broncho)pulmonary disease* ist Anfang der 1960er Jahre aus dem Bestreben entstanden, chronische Bronchitis und Emphysem vom Asthma bronchiale abzugrenzen¹. Erst über 20 Jahre später, im Jahr 1987, wurde der Begriff COPD von der *American Thoracic Society* eingeführt². Laut Definition der neuen Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP)³ ist die COPD durch eine Atemwegsobstruktion charakterisiert, die nicht vollständig reversibel und typischerweise progredient ist. Sie wird von einer abnormen Entzündungsreaktion begleitet, welche durch Partikel und Gase, in erster Linie durch Zigarettenrauch, ausgelöst wird. Klinisch ist die COPD durch eine Kombination aus chronischem Husten, Auswurf und anfänglich nur unter Belastung auftretender Atemnot charakterisiert. Sie umfasst sowohl die chronisch-obstruktive Bronchiolitis als auch das obstruktive Lungenemphysem und die chronische Bronchitis und verbindet somit gleichzeitig mehrere Erkrankungen zu einem komplexen Krankheitsbild⁴. Gemäß der Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der DGP wird die COPD anhand der Messung der 1-Sekunden-Kapazität (FEV₁, syn. Forciertes Einsekundenvolumen^a), der inspiratorischen Vitalkapazität^b (VC) sowie der Bestimmung des Quotienten FEV₁/VC^c in vier Schweregrade eingeteilt³. Diese Leitlinie verwendet VC für die Definition der Obstruktion, welche durch FEV₁/VC < 70 % des Sollwerts festgestellt wird:

^a Volumen, das innerhalb der ersten Sekunde einer forcierten Expiration ausgeatmet wird

^b Volumen zwischen maximaler Ausatmung und maximaler Einatmung

^c Volumen, das innerhalb der ersten Sekunde einer forcierten Expiration ausgeatmet wird, bezogen auf die inspiratorische Vitalkapazität (sog. Tiffeneau-Wert)

Schweregrad I (leichtgradige COPD) ist durch eine Atemwegsobstruktion ohne eine signifikante FEV₁-Verminderung charakterisiert (FEV₁ ≥ 80 % und FEV₁/VC < 70 %, jeweils im Prozent des Sollwerts).

Schweregrad II (mittelgradige COPD) ist durch eine Atemwegsobstruktion bei gleichzeitig moderater FEV₁-Verminderung charakterisiert (50 % ≤ FEV₁ < 80 % und FEV₁/VC < 70 %).

Schweregrad III (schwere COPD) ist durch eine höhergradige FEV₁-Verminderung gekennzeichnet (30 % < FEV₁ < 50 % und FEV₁/VC < 70 %).

Schweregrad IV (sehr schwere COPD) liegt vor, wenn FEV₁ ≤ 30 % des Sollwerts beträgt (FEV₁/VC < 70 %).

Ebenfalls zu Beginn der 1960er-Jahre wurde eine Assoziation zwischen wiederholten bronchialen Infekten und der COPD diskutiert (Britische Hypothese)⁵. Bislang liegen allerdings für einen direkten Einfluss bakterieller und viraler Atemwegsinfektionen auf die Ausbildung einer COPD keine eindeutigen Befunde vor. Mit bis zu 50 % stellen diese Infektionen jedoch die häufigste Ursache der akuten Exazerbationen der COPD dar, welche als AECOPD bezeichnet werden^{6,7}. Eine AECOPD ist durch eine akute Verschlechterung der Symptome wie Husten und Auswurf, schwere Atemnot und Abnahme der Lungenfunktion (insbesondere Abfall des FEV₁) charakterisiert^{8,9}. Inzwischen deutet vieles darauf hin, dass ein Zusammenspiel mehrerer verschiedener Faktoren und Mechanismen das komplexe Erscheinungsbild einer COPD determiniert^{10,11}. Dazu zählen insbesondere (i) Komponenten der Immunabwehr, die aktiv am Entzündungsgeschehen mit irreversibler Schädigung des Lungengewebes beteiligt sind, (ii) reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die eine Dysfunktion der Zellen und schließlich den Zelltod bewirken sowie (iii) proteolytische Enzyme, welche für den Abbau der extrazellulären Matrix, die Auslösung der Apoptose und die Entwicklung eines Lungenemphysems verantwortlich gemacht werden. Auf molekularer Ebene geht die COPD mit einer veränderten Expression und Aktivität von Genen einher, welche an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt sind. Einige dieser Gene erfüllen nach neuen Erkenntnissen durch eine Modulation des epigenetischen Codes eine Schalterfunktion in der transkriptionellen Regulation¹²⁻¹⁴. In ihrer Gesamtheit lösen sie eine Kaskade von Reaktionen aus, die strukturelle und funktionelle Veränderungen in der Lunge bewirken und mit einer Beeinträchtigung der angeborenen (antimikrobiellen) Abwehrmechanismen wie beispielsweise Mucus-Produktion und mukoziliäre Clearance einhergehen.

1.2 Das Abwehrsystem der Lunge

Der Respirationstrakt ist ständig Mikroorganismen ausgesetzt, die mit der Atemluft in die tieferen Atemwege gelangen können. Dennoch kommt es in der gesunden Lunge nur selten zu einer Kolonisierung oder Infektion. Das intakte Atemwegsepithel stellt die erste, "physikalische Barriere" gegen potenzielle Krankheitserreger dar¹⁵. Undurchlässige Verbindungen zwischen benachbarten Epithelzellen (sog. *tight junctions*) verhindern, dass

potenzielle Pathogene leicht eindringen können. Durch den ständigen Fluss des Mucus, das hauptsächlich aus sezerniertem Mucin und anderen Glykoproteinen besteht, halten Epithelien die Krankheitserreger ab. Sie verhindern die Adhäsion von Mikroorganismen und erleichtern durch den trachealwärts gerichteten Zilienschlag ihre Beseitigung aus der Lunge¹⁶. Neben dieser rein physikalischen Entfernung von Partikeln und Pathogenen aus der inhalierten Atemluft sind Epithelien aktiv mit Hilfe einer "chemischen Barriere" an der Bekämpfung von Infektionen beteiligt¹⁷. Diese Barriere besteht aus Enzymen, Protease-Inhibitoren und weiteren Proteinen, die antimikrobiell wirken und vom sekretorischen Apparat der Atemwege produziert werden¹⁸. Klassische antimikrobielle Moleküle wie beispielsweise Lysozym, Laktoferrin, sekretorische Phospholipase-A₂ sowie *secretory leukoprotease inhibitor* (SLPI) können Pathogene direkt abtöten oder ihr Wachstum hemmen¹⁹⁻²¹. Als wesentlicher Bestandteil der basalen chemischen Abwehr tragen sie zur Erhaltung der natürlichen Integrität der Epithelien bei.

Um einen noch effektiveren Schutz gegen eine Infektion zu gewährleisten, hat das Abwehrsystem der Lunge eine Vielzahl weiterer Abwehrmechanismen entwickelt. Dabei bilden Epithelzellen, Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten die wichtigsten zellulären Bestandteile dieser Abwehr^{22,23}. Sie gehören zu den ersten Zellen, die auf eingedrungene Mikroorganismen stoßen, und besitzen vielfältige Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, potenzielle Krankheitserreger direkt zu erkennen. Auf molekularer Ebene vermitteln die keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) die erste Interaktion mit Mikroorganismen. Sie erkennen konservierte Merkmale von Pathogenen (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*) wie verschiedene Oberflächenmoleküle von Bakterien, Moleküle in den Zellwänden von Pilzen oder doppelsträngige RNA mancher Viren. Zu diesen PRRs zählen lösliche Rezeptoren wie Komponenten des Komplementsystems, Surfactant-Protein (SP)-A und SP-D aus der Kollektin-Familie^{24,25} sowie *long pentraxin 3* (PTX3) und C-reaktives Protein aus der Familie der Pentraxine²⁶. Die Aktivierung dieser Rezeptoren löst die Komplementkaskade aus, leitet die Phagozytose des Pathogens ein und verhindert die Ausbreitung der Infektion. Durch direkte Interaktion mit Zelloberflächen-PRRs wie dem Toll-like-Rezeptor (TLR, *toll-like receptor*)-2 und TLR-4 unterstützen Surfactant-Proteine ebenfalls die Wirtsabwehr bei ihrer Verteidigung gegen Infektionen²⁷. TLRs wurden auf Basis von Sequenzhomologien zum Toll-Protein der Fruchtfliege *Drosophila* identifiziert, welches neben der Polarisierung der dorso-ventralen Achse während der Embryogenese auch an der Abwehr von Pathogenen beteiligt ist^{28,29}. Bis heute sind im humanen System zehn TLRs (TLR-1-10) beschrieben, die unterschiedliche bakterielle, virale, fungale und parasitäre PAMPs erkennen³⁰⁻³². So ist beispielsweise TLR-4 der Rezeptor für das Lipopolysaccharid (LPS) der Gram-negativen Bakterien^{33,34}, während TLR-2 als Heterodimer mit TLR-1 bzw. TLR-6 Lipoteichonsäure

Gram-positiver Bakterien und bakterielle Lipoproteine erkennt³⁵. Ein weiteres Alarmsystem bilden die intrazellulären *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like* Rezeptoren mit über 20 Mitgliedern³⁶. Für die bekanntesten Vertreter dieser Familie, NOD-1 und NOD-2, konnten unterschiedliche bakterielle Peptidoglykanstrukturen als Agonisten identifiziert werden^{37,38}. Jeder dieser Rezeptoren trägt zur spezifischen Erkennung von Pathogenen bei und ist an der unmittelbaren Auslösung einer Entzündungs- und Immunreaktion beteiligt. Die durch PRRs aktivierten Signaltransduktionswege führen zur Induktion einer Reihe von Genen, darunter auch Gene für Chemokine, Cytokine und costimulierende Moleküle³⁹⁻⁴². Diese sind bei der Steuerung von angeborener und – in späteren Phasen einer Infektion – erworbener Immunität von entscheidender Bedeutung. In den letzten Jahren haben PRRs vermehrt an Bedeutung gewonnen, als erkannt wurde, dass sie auch in der Auslösung und Kontrolle einer akuten antimikrobiellen Abwehrreaktion eine Schlüsselstellung besitzen⁴³⁻⁴⁶.

1.3 Endogene Peptidantibiotika der Lunge

Die Existenz epithelialer Peptidantibiotika tauchte in der Literatur erstmals 1922 auf⁴⁷. Sir Alexander Flemming (1881–1955) gelang es, das körpereigene Abwehrenzym Lysozym aus eigenen Nasalsekreten zu isolieren, welches bakteriolytische Eigenschaften aufwies. Seinen Befund interpretierte er damals als einen in allen Körperteilen wirksamen Abwehrmechanismus⁴⁷. Seitdem ist die Anzahl der entdeckten antimikrobiellen Peptide (AMPs) auch in der humanen Lunge stark angestiegen. Sie sind typischerweise relativ klein (12 bis 60 Aminosäuren) und werden sowohl konstitutiv als auch erst auf eine Infektion hin gebildet^{48,49}. Sie bilden eine große Gruppe evolutionär alter Moleküle und ihre Gene sind in vielen Organismen hoch konserviert⁵⁰. In der humanen Lunge werden hauptsächlich zwei Familien der AMPs, die Defensine und die Cathelicidine, exprimiert⁵¹. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe, Aminosäuresequenz und in der dreidimensionalen Struktur. Aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden auf die Familie der Defensine näher eingegangen.

Der Begriff "Defensin" wurde erstmals im Jahr 1985 von Tomas Ganz⁵² und Michael E. Selsted⁵³ geprägt. Dieser kommt aus dem lateinischen "*defendo*" und bedeutet soviel wie abwehren oder verteidigen⁵⁴. Defensine stellen endogene Antibiotika dar, die durch Entzündungszellen und insbesondere Epithelzellen gebildet werden⁵⁵. Dabei handelt es sich um kleine kationische Peptide mit einer Molekularmasse von 3 bis 5 kDa. Das charakteristische Merkmal bilden sechs konservierte Cysteine, die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind^{56,57}. Die relative Position und Verknüpfung dieser Cysteine stellt die Grundlage für die weitere Klassifizierung der Defensine dar⁵⁴. In der

humanen Lunge sind zwei Subgruppen der Defensine, α - und β -Defensine, von großer Bedeutung.

Bis heute konnten vier α -Defensine in der humanen Lunge charakterisiert werden: *defensin, alpha 1*, 2 und 3 (DEFA1-3, bekannt auch als *human neutrophil peptides* HNP-1-3) sowie *defensin, alpha 5* (DEFA5, syn. HD-5). Die ersten drei wurden im Jahr 1985 erstmals aus neutrophilen Granulozyten isoliert und identifiziert^{52,53}. Nach ihrer relativen elektrophoretischen Mobilität im Urea-Polyacrylamid-Gel wurden diese HNP-1 (Peptid mit der höchsten Mobilität), HNP-2 (Peptid mit intermediärer Mobilität) und HNP-3 (Peptid mit niedrigster Mobilität) genannt⁵². Sie werden in der azurophilen Granula von Neutrophilen gespeichert, wo sie den Hauptteil des Granulaproteininhalt und bis zu 18 % der gesamten zellulären Proteinmasse ausmachen⁵⁸. Hohe Konzentrationen der α -Defensine in der Lunge können demnach durch verstärkte Infiltration von Neutrophilen und Freisetzung des Granulainhaltes bei Entzündungen und Infektionen erreicht werden⁵⁹⁻⁶¹. Das letzte Mitglied dieser Subgruppe, DEFA5, konnte sowohl im Nasal- als auch im Bronchialepithel, allerdings nur auf der mRNA-Ebene, detektiert werden⁶². Das Protein konnte dort bis heute nicht nachgewiesen werden.

Aus der Subgruppe der β -Defensine konnten bis heute in der humanen Lunge ebenfalls vier Mitglieder charakterisiert werden: *defensin, beta 1* (DEFB1, syn. HBD1), 4 (DEFB4, syn. HBD-2), 103A (DEFB103A, syn. HBD-3) und 104A (DEFB104A, syn. hBD-4). Das erste native humane β -Defensin DEFB1 wurde 1995 aus Hämofiltrat isoliert und charakterisiert⁶³. DEFB1 wird konstitutiv von Zellen des respiratorischen Epithels gebildet⁶⁴. Zwei Jahre später, 1997, wurde aus Schuppenextrakten das erste humane, induzierbare Peptid DEFB4⁶⁵ und im Jahr 2001 DEFB103A⁶⁶ isoliert und charakterisiert. Im Respirationstrakt stellen Epithelzellen sowie Typ II-Pneumozyten die bedeutendste Quelle für DEFB4 dar⁶⁷⁻⁶⁹. DEFB103A wird dagegen im Wesentlichen nur durch Epithelzellen gebildet⁷⁰. Dort werden sie als Antwort auf eine entzündliche Reaktion bzw. Kontakt mit bestimmten Bakterien oder deren PAMPs in großen Mengen gebildet und in die Atemwegssekrete abgegeben. Dabei sind neben den klassischen Atemwegspathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)^{66,71} und bakteriellen PAMPs wie LPS⁷² oder bakterielles Lipopeptid⁷³ auch eine Vielzahl proinflammatorischer Cytokine wie *tumor necrosis factor* (TNF)- α ^{66,71}, Interleukin (IL)-1 β ⁷¹, IL-17⁷⁴ und Interferon (IFN)- γ ⁷⁵ von besonderer Bedeutung. Das vierte Mitglied dieser Subgruppe, DEFB104A, wurde durch eine gezielte Suche in der Genomdatenbank entdeckt⁷⁶. Wie DEFB4 und DEFB103A stellt auch dieses ein induzierbares Peptid der humanen Lunge dar. So führt der Kontakt mit *P. aeruginosa* oder *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) zu einer Induktion des Peptids. Entzündungsmediatoren wie IL-1 α , IL-6, TNF- α oder IFN- γ haben dagegen keinen Einfluss auf dessen Genexpression⁷⁶.

1.4 Funktionen der Defensine in der Lunge

Als endogene Antibiotika bilden α - und β -Defensine gemeinsam eine starke Abwehrfront gegen Atemwegsinfektionen mit Bakterien, Pilzen und Viren⁷⁷⁻⁸⁰. Sie sind antimikrobiell aktiv gegen ein breites Spektrum Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Die direkte Interaktion mit der Bakterienmembran stellt dabei das wesentliche Wirkprinzip der Defensine dar⁸¹. Deren starke positive Ladung und amphiphile Natur erlauben eine direkte Interaktion mit den negativ geladenen Bestandteilen der mikrobiellen Membran wie beispielsweise Phosphatgruppen vom LPS Gram-negativer Bakterien oder Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien. Durch Ausbildung von ungleichförmigen Kanälen (*aggregate model*), transmembranen Poren (*toroidal pore model* sowie *barrel-stave model*) oder konzentrierten Peptidaggregaten (*carpet model*) auf der Oberfläche von Bakterien sind Defensine für die Störung der Integrität und Funktion dieser Membranen verantwortlich⁸². Die daraus resultierende Permeabilisierung der Membranen, der Zusammenbruch des Membranpotentials, der Membran-Umbau oder die direkte Zellyse führen schließlich zum Abtöten der Bakterienzelle⁸³⁻⁸⁶. Des Weiteren können Peptide nach der Passage durch die mikrobielle Membran im Cytosol der Bakterienzelle akkumulieren und von dort aus überlebenswichtige zelluläre Prozesse wie die Nucleinsäure- und Proteinsynthese sowie die Aktivität essenzieller Enzyme beeinträchtigen^{83,87}. Nach aktuellen Vorstellungen werden von Defensinen gleichzeitig mehrere Mechanismen benutzt, um eine effiziente Pathogenbeseitigung zu gewährleisten (*multitarget mechanism*)⁸⁸.

Die fungizide Wirkung der α - und β -Defensine ist besonders gut gegen das orale Pathogen *Candida albicans* sowie weitere *Candida*-Spezies charakterisiert⁷⁹. Über die Wirkmechanismen dieser Peptide ist man sich in der Literatur allerdings nicht einig: während einerseits die Membranpermeabilisierung als tödlicher Schritt angesehen wird⁸⁹, liefern andererseits neuere Untersuchungen keine Hinweise auf eine Membranschädigung⁹⁰. Stattdessen wird ein weiterer Wirkmechanismus postuliert, der auf einer induzierten nicht-lytischen ATP-Freisetzung aus lebenden *Candida*-Zellen ohne Zerstörung der Membranintegrität basiert^{90,91}.

Der erste Bericht über die antivirale Wirkung der humanen Defensine tauchte in der Literatur bereits Mitte der achtziger Jahre auf⁹². Die Entzifferung der molekularen Grundlagen dieser Wirkung hat aber erst kürzlich begonnen. Untersuchungen an DEFB4 zeigen, dass die direkte Interaktion des Peptids mit dem Lipidanteil der Virushülle zu einer Destabilisierung und Zerstörung der Hülle führt. Die gleichzeitige Anlagerung des Peptids an die Plasmamembran der Wirtszelle resultiert in der Beeinträchtigung der Adsorption und Penetration des Viruspartikels und verhindert so eine Infektion⁹³.

Neben ihrer essenziellen Rolle bei der Bekämpfung von Atemwegsinfektionen weisen humane Defensine noch eine Vielzahl weiterer biologischer Funktionen auf. Sie wirken als

"Alarmsystem" (auch Alarmine genannt), das sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr vor aufkommenden Infektionen warnt. Als chemische Lockstoffe, auch "Mikrochemokine" genannt, mobilisieren sie durch die Bindung an den CC-Chemokin-Rezeptor-6 (CCR6) Neutrophile in großer Zahl und leiten sie an die Stelle einer Infektion⁹⁴. Andere locken Monocyten⁷⁵, unreife dendritische Zellen (DC) und T-Gedächtniszellen^{95,96} an und setzen so die Abwehrmaßnahmen des adaptiven Immunsystems in Gang. Darüber hinaus sind sie an der Aktivierung von Mastzellen und dadurch an der Freisetzung verschiedener Mediatoren, u.a. Histamin und Prostaglandin D₂, beteiligt^{97,98}. Diese Mediatoren vermitteln ihrerseits eine erhöhte Mucus-Sekretion, eine Kontraktion der glatten Muskulatur und eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit. In ihrer Gesamtheit lösen sie eine akute lokale Entzündungsreaktion aus und verstärken die Abwehrfront gegen Pathogene.

Derzeitige Hinweise lassen vermuten, dass humane Defensine neben der Abwehrfunktion auch in der Regulation der epithelialen Wundheilung eine entscheidende Rolle übernehmen. Die Eigenschaften der α -Defensine, die Zellmigration und Proliferation des Atemwegsepithels zu aktivieren sowie die Mucus-Produktion zu induzieren, bilden eine wichtige Grundlage dieser Funktion^{99,100}.

Durch die Vielzahl der beschriebenen Funktionen, angefangen mit der Rolle bei der initialen Auseinandersetzung mit Pathogenen über die Veränderung einer lokalen Entzündungsreaktion bis hin zur Aktivierung der antigenpräsentierenden DC und T-Effektorzellen, stellen humane Defensine ein zentrales Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr dar.

1.5 Weitere potenzielle Peptidantibiotika der Lunge

An der effektiven Abwehr von potenziellen Krankheitserregern sind mehrere weitere endogene Peptid- und Proteinantibiotika beteiligt. Proteine vom S100-Typ zeichnen sich durch ihre ungewöhnliche Struktur und geringe Molekularmasse von 9 bis 13 kDa aus¹⁰¹. Dabei wurde das erste S100-Protein bereits 1965 aus Gehirn-Homogenaten mehrerer Spezies isoliert und als integraler Bestandteil des Nervensystems identifiziert¹⁰². Dank seiner Löslichkeit in einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung bei einem pH-Wert von 7,2 wurde das Protein auf den Namen "S100" (*soluble* in 100 % *ammonium sulfate*) getauft¹⁰². Basierend auf den Gemeinsamkeiten in der Aminosäure-, Protein- und Genstruktur dieser Protein-Familie konnten bis heute mindestens 25 Mitglieder charakterisiert werden¹⁰³. Sie alle zeichnen sich durch eine ausgeprägte zelltyp- und gewebespezifische Expression aus¹⁰⁴. Ihr charakteristisches Merkmal bilden zwei Ca²⁺-bindende Helix-Turn-Helix-Motive (EF-Hand), welche durch eine zentrale flexible Scharnier-Domäne getrennt und jeweils von einer α -Helix flankiert sind¹⁰⁵. Neben ihrer funktionellen Beziehung zu grundlegenden zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Zellkommunikation üben S100-

Proteine einen Einfluss auf die Organisation des Cytoskeletts und somit auf das Zellverhalten wie Zelladhäsion, -migration und Chemotaxis aus¹⁰⁵. Für einige wenige Mitglieder dieser Familie wie Calprotectin¹⁰⁶, Calgranulin C¹⁰⁷ und S100A7 (syn. Psoriasin)¹⁰⁸ konnten bereits antimikrobielle, antifungale sowie antiparasitäre Wirkungen gezeigt werden. Erst vor kurzem konnte das letztere, S100A7, im Oralepithel detektiert werden¹⁰⁹.

Eine weitere bedeutsame Komponente der Verteidigungsstrategie gegen Mikroorganismen bilden Mitglieder der Ribonuclease (RNase)-A-Superfamilie. Dabei wurde das erste Nucleinsäureabbauende Enzym bereits 1920 von Walter Jones entdeckt und beschrieben¹¹⁰. Der Name "Ribonuclease" wurde allerdings erst 1938 vergeben und in der Literatur erwähnt¹¹¹. Aus den Beobachtungen der Interaktion des Enzyms mit abgetöteten Bakterien ("*pneumococci*") wurde schon damals die antimikrobielle Wirkung dieser RNase postuliert¹¹¹. Mittlerweile gibt es mindestens fünf unterschiedliche humane RNasen (RNASE2 und 3^{112,113}, ANG¹¹⁴, RNASE7¹¹⁵⁻¹¹⁷ und RNASE8¹¹⁸), welche neben ihren spezifischen Funktionen wie beispielsweise Chemotaxis oder Angiogenese auch als endogene Antibiotika wirken. Dabei handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe pyrimidin-spezifischer RNasen, die von verschiedenen Zelltypen, unter anderem von Neutrophilen, Eosinophilen und Keratinocyten, synthetisiert werden und dort gegen potenzielle Krankheitserreger mitwirken. In der humanen Lunge konnte bisher allerdings nur RNASE7 als einziges epitheliales, antibiotisch-aktives Mitglied dieser Proteinfamilie identifiziert werden^{109,115}.

1.6 Epigenetik und Genregulation

Das chemische Abwehrsystem der Lunge besteht sowohl aus konstitutiv produzierten, gegen verschiedene Erreger gerichteten AMPs als auch erst durch Kontakt mit bestimmten Mikroorganismen induzierbaren Peptidantibiotika. Mechanismen, welche die Genexpression kontrollieren, operieren auf verschiedenen Ebenen. Eine davon ist das Chromatin selbst¹¹⁹. Diese Ebene ist epigenetischer Natur und vermittelt nicht nur die Umsetzung des genetischen Codes, sondern passt diese auch gleichzeitig an die Umwelteinflüsse an.

Unabhängig von seiner geschichtlichen Entwicklung wird der Begriff "Epigenetik" heutzutage häufig als eine Regulationsebene über der DNA (abgeleitet vom griechischen "*epi*" = "über", "an", "bei") bezeichnet. Obwohl diese Wortdeutung einen wichtigen Aspekt in der Epigenetik betrifft, ist der Ursprung des Wortes historisch gesehen nicht korrekt. Die eigentliche Epigenetik entwickelte sich ab Beginn der 1940er Jahre, obwohl ihre Ansätze und Grundlagen bereits auf frühere Zeiten zurückgehen. Schon Aristoteles (384-322 v. Chr.) glaubte an die Epigenese und vertrat die Meinung, dass sich individuelle organische Formen aus formlosen Substanzen entwickeln^{120,121}. Er war ein Gegner des Präformismus und stellte seine "epigenetische" Betrachtungsweise gegen die damalige Ansicht, wonach sich die vollständigen Organismen aus winzigen, bereits vollständig geformten, präformierten

Körpern entwickeln. Doch um die Kontinuität und die zunehmende Komplexität der Organismen während der Entwicklung zu erklären, mussten Epigenetiker eine unbeobachtbare Kraft postulieren, die in der Lage wäre, diese Entwicklung zu steuern¹²¹. Und damit hatte die Theorie der Epigenese ein ernstes Problem. Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Epigenetik lieferten die Arbeiten des britischen Biologen Conrad Hal Waddington (1905-1975). Er hat als erster zwei damals völlig getrennte Disziplinen, Entwicklungsbiologie und Genetik, miteinander verknüpft und 1966 in seinem Werk "*Principles of development and differentiation*" veröffentlicht¹²⁰. Nach Waddington bestimmen nicht nur Gene, sondern auch deren "Umwelt", die er als "...a certain number of different regions of cytoplasm..." oder Epigenotyp definiert hat, einen bestimmten Phänotyp während der Entwicklung. Dabei prägte er durch das Zusammenziehen der beiden Wörter "*epigenesis*" und "*genetics*" den Begriff "*epigenetics*" (Epigenetik) und beschrieb damit den Prozess, durch den sich ein Genotyp zum Phänotyp ausprägt. Mit seiner Definition überbrückte er erstmals das Spannungsfeld zwischen der klassischen Genetik und der Umwelt und vereinigte in der Epigenetik Prozesse wie Vererbung, Entwicklung und Evolution. Noch heute gibt es jedoch keine einheitliche Meinung dazu, inwiefern unsere genetische Information durch unsere Umwelt (vor)geprägt wird.

Die moderne Epigenetik wird meist definiert als das Studium von Effekten, die mitotisch und/oder meiotisch vererbbar sind, aber nicht auf eine Änderung der DNA-Sequenz zurückgeführt werden können¹²². Demnach sind epigenetische Effekte stabile, aber zugleich potenziell reversible Änderungen der Genexpression. Sie werden durch Umwelteinflüsse und endogene Faktoren bestimmt und sind in ein komplexes regulatorisches Netzwerk eingebunden¹²³. Und dieses steuert, wann, wo und unter welchen Bedingungen bestimmte Gene aktiviert und abgelesen oder inaktiviert werden. Diese Form der Genregulation wird durch Mechanismen bestimmt, welche nachhaltig vererbbar Markierungen und Variationen in das Chromatin einbringen¹²⁴. Sie wird im Wesentlichen durch DNA-Methylierung, kovalente Histon-Modifikationen und Nucleosomen-Umformungen festgelegt, die lokale Veränderungen in der Chromatinstruktur ermöglichen und somit deren funktionelle Aktivität bestimmen können^{125,126}. Zahlreiche weitere Faktoren wie beispielsweise nicht-codierende RNAs und Proteine des Polycomb-Trithorax-Systems stehen ebenfalls im Zusammenhang mit der Regulation der Genaktivität und sind für viele grundlegende Prozesse während der Entwicklung und Differenzierung unabdingbar^{127,128}. In ihrer Gesamtheit stellen sie einen eigenen, an die nächste Zellgeneration vererbaren Code dar und werden gemeinsam unter dem Begriff "Epigenetik" zusammengefasst.

Aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden auf die beiden erstgenannten Mechanismen, DNA-Methylierung und kovalente Histon-Modifikationen, näher eingegangen.

1.6.1 DNA-Methylierung

Bereits im Jahr 1904 gelang es Wheeler und Johnson¹²⁹, das damals noch erste Aminopyrimidin, 5'-Methylcytosin, synthetisch herzustellen und seine Eigenschaften zu charakterisieren. Erst über 20 Jahre später, im Jahr 1925, wurde 5'-Methylcytosin von Johnson und Coghill¹²⁹ aus den Hydrolyseprodukten der bakteriellen ("*tubercle bacillus*") DNA isoliert und damit die Anzahl der schon damals bekannten Pyrimidinucleotide Cytosin, Uracil und Thymin um das vierte Mitglied erweitert. In den späten 1940er und frühen 1950er Jahren konnte das methylierte Cytosin auch als Bestandteil der eukaryotischen DNA identifiziert werden^{130,131}. Die ersten Diskussionen um einen möglichen, damals allerdings noch hypothetischen Zusammenhang der DNA-Methylierung mit der Genaktivität wurden durch die Arbeiten von Riggs¹³² und Holliday¹³³ eröffnet. Mittlerweile stellt sie eines der wesentlichen Prinzipien der Genregulation dar¹³⁴.

Noch bis heute ist die Methylierung von Cytosin die einzige bekannte Modifizierung der DNA von Säugetieren. Sie erfolgt durch kovalente Anheftung einer Methylgruppe an die fünfte Position des Pyrimidinrings von Cytosin und wird von Enzymen vermittelt, die als DNA-Methyltransferasen (DMTs) bezeichnet werden¹³⁵. Sie ist im Wesentlichen auf das Cytosin beschränkt, das sich innerhalb der Sequenz 5'-CG-3' befindet (CpG- oder symmetrische Methylierung), obwohl eine Methylierung außerhalb dieser Sequenz ("*non-CpG*"- oder asymmetrische Methylierung) ebenfalls in der Literatur beschrieben wurde¹³⁶. Ihre funktionelle Bedeutung und Regulation ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Im Genom von Säugetieren sind CpG-Sequenzen sehr ungleich verteilt. Die meisten davon (etwa 98 %) kommen vereinzelt vor (etwa eine CpG-Sequenz auf 100 bp), wo sie bis zu 80 % methyliert vorliegen. Oder sie konzentrieren sich zu höheren Dichten (etwa eine CpG-Sequenz auf 10 bp), den so genannten CpG-Inseln, wo sie bis auf einige wenige Ausnahmen unmethyliert verbleiben¹³⁷. Im humanen Genom wird die Anzahl solcher Inseln auf etwa 29 Tausend geschätzt¹³⁴. Sie finden sich häufig in regulativen Abschnitten, bevorzugt in Promotorbereichen, oder sie markieren das 5'-Ende von Transkriptionseinheiten wie beispielsweise von nicht-codierenden RNAs^{138,139}.

Die CpG-Methylierung gilt als stabilste unter den epigenetischen Modifikationen. Sie erfüllt wichtige Funktionen bei der Strukturierung des Chromatins und bildet die Grundlage für das Phänomen der genomischen Prägung (*genomic imprinting*) und X-Chromosom-Inaktivierung¹²⁷. Neben diesen essenziellen genetischen Funktionen ist sie auch an der Regulation der Genaktivität beteiligt. Und obwohl die genauen Mechanismen gegenwärtig noch wenig bekannt sind, gilt die direkte Interaktion von 5'-Methylcytosin mit spezifischen Proteinen, welche über eine Methyl-CpG-Binde-Domäne verfügen (wie beispielsweise MECP2, *methyl CpG binding protein 2*), als das Schlüssel-Element dieser Funktion¹³⁹. Auch die Wechselwirkungen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise MYC

(*avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*, syn. C-Myc), welche die CpG-Sequenzen in seinem Erkennungsmotiv enthalten und deren Bindung durch das 5'-Methylcytosin direkt vermittelt werden, werden im Zusammenhang mit der Genregulation diskutiert¹⁴⁰. Dabei gilt eine langfristige Abschaltung von Genen als die am weitesten akzeptierte Funktion, die durch CpG-Methylierung vermittelt wird¹³⁴.

1.6.2 Kovalente Histon-Modifikationen

Einen der ersten Beiträge zur Aufklärung der Rolle der Histon-Modifikationen in der Genregulation lieferte bereits 1964 die Arbeit von Allfrey *et al.*¹⁴¹. Dabei stellten sie fest, dass Änderungen in der Histon-Struktur die Ableserate der DNA und somit die RNA-Synthese beeinflussen. Und obwohl schon damals erkannt wurde, dass Modifikationen an Histonen einen dynamischen, reversiblen Mechanismus darstellen, über den Zellen ihre Transkriptionsprogramme steuern, wurde ihre epigenetische Bedeutung erst vor wenigen Jahren erkannt. Mit der Beschreibung der ersten Histon-Acetyltransferase (HAT) im Jahr 1996¹⁴² und der ersten Histon-Methyltransferase (HMT) im Jahr 2000¹⁴³ gelang der wesentliche Durchbruch in der Aufdeckung der molekularen Grundlagen der Epigenetik. Heute weiß man, dass die N-terminalen Regionen der Histone, welche grundlegende Funktionen bei dem Verpacken der DNA und dem Aufbau des Nucleosoms übernehmen, vielfältig kovalent modifiziert werden können¹⁴⁴. Zu diesen Modifikationen gehören im Wesentlichen die Acetylierung spezifischer Lysinseitenketten durch HATs sowie die Methylierung von Lysin- und Argininresten durch HMTs.¹⁴⁵ Die Phosphorylierung von Serinresten durch Histon-Kinasen sowie die Anheftung von Ubiquitin- (Ubiquitinierung), SUMO- (SUMOylierung) und Poly(ADP-Ribose)-Einheiten (ADP-Ribosylierung) werden ebenfalls als weitere Modifikationsmöglichkeiten in der Literatur beschrieben¹⁴⁶. Diese Modifikationen stellen eine Art epigenetischer Markierungen dar, welche genaue Informationen über den Aktivitätszustand von Genen enthalten können. Insbesondere im Fall des Histons H3 konnte gezeigt werden, dass sie in einem engen Zusammenhang mit der Aktivierung und der Repression von Transkriptionsvorgängen stehen¹⁴⁷. So führt beispielsweise die Acetylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9-Acetyl) und Lysin-14 (H3K14-Acetyl) ebenso wie die Di- oder Tri-Methylierungen am Lysin-4 (H3K4me₂, H3K4me₃) im Allgemeinen zu einer Aktivierung der Transkription. Dagegen stehen die Di- und Tri-Methylierungen des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9me₂, H3K9me₃) im Zusammenhang mit der Repression bestimmter Genabschnitte¹⁴⁸. Alle diese Histon-Modifikationen können miteinander "kommunizieren" und sich wechselseitig beeinflussen¹⁴⁹. Sie bestimmen durch die Änderungen der Gesamtladung, der Basizität oder der Hydrophobie der Histon-Proteine deren Affinität gegenüber der DNA und schaffen zahlreiche Bindungsstellen für chromatinassoziierte Proteine. Dabei stellt beispielsweise das H3K9me₃

die Bindungsstelle für das Heterochromatin-Protein-1 (HP1, *heterochromatin protein 1*), welches mit der Inaktivierung von Genen und der Repression der Transkription in Verbindung gebracht wird, dar¹⁵⁰. In ihrer Gesamtheit vermitteln die Histon-Modifikationen funktionell vielfältige Interaktionen mit ATP-getriebenen Chromatin-Umformungskomplexen, welche schließlich zu veränderten nucleosomalen Strukturen führen und somit das Chromatin funktionell determinieren¹³⁹. In ihrer Vielfalt werden sie als "Histon-Code" bezeichnet und bilden ein eigenes zelluläres Informationssystem, das zur Steuerung transkriptionsabhängiger Vorgänge verwendet wird¹⁵¹. Dieses System unterliegt einer strengen Kontrolle, deren Etablierung auf unterschiedlichen Enzym-Familien wie beispielsweise HATs, HMTs oder Histon-Deacetylasen (HDACs) beruht.

1.6.3 Humane Histon-Deacetylasen

Nur einen Monat nach der Beschreibung der ersten HAT¹⁴², die Acetylgruppen auf Histone übertragen kann, hatten Jack Taunton *et al.*¹⁵² ein ähnliches Ergebnis, allerdings mit umgekehrten "Vorzeichen", erzielt. Ihnen gelang der Nachweis der ersten Histon-Deacetylase, HDAC1, die Acetylgruppen von Histonen entfernt und damit den Gegenpart in der Regulation des Acetylierungsstatus darstellt. Bis heute wurden 18 humane HDACs identifiziert, die aufgrund (i) von Sequenzhomologien zu den Hefe-Proteinen von *Saccharomyces cerevisiae*, (ii) der Lokalisation in der Zelle, (iii) Gewebespezifität und (iv) enzymatischen Aktivitäten in vier Klassen eingeteilt werden^{153,154}. Die Mitglieder der Klassen I, II und IV werden von Zink (Zn^{2+})-abhängigen Metalloproteasen gebildet und in der Literatur als klassische HDACs bezeichnet. Durch ihre Zn^{2+} -Abhängigkeit unterscheiden sie sich von der Klasse III der HDACs, welche in ihrer Katalyse das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) als Cofaktor benötigen und durch ihre Homologie zum Hefeprotein *silent information regulator 2* (Sir2) als Sirtuine (SIRT) bezeichnet werden. Aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit werden die Zn^{2+} -abhängigen HDACs im Folgenden näher erläutert.

HDACs der Klasse I zeichnen sich durch ihre Homologie zu den *reduced potassium dependency 3* (RPD3)-Proteinen der Hefe aus und umfassen HDAC1¹⁵², 2¹⁵⁵, 3¹⁵⁶ und 8¹⁵⁷. Ihnen gemeinsam ist eine kompakte Struktur mit nur einer katalytischen Domäne, eine vorwiegend nucleäre Lokalisation sowie eine ubiquitäre Expression. Die katalytische Domäne ist generell bei allen HDACs hoch konserviert, während die N- und C-terminalen Abschnitte sehr unterschiedlich sein können.

Zu den HDACs der Klasse II werden die Homologen des Hefeproteins *histone deacetylases A1* (Hda1) gerechnet. Sie umfassen HDAC4^{158,159}, 5¹⁵⁹, 6¹⁵⁹, 7¹⁶⁰, 9¹⁶¹ und 10¹⁶² und zeichnen sich durch eine gewebespezifische Expression aus, wobei sie sowohl eine nucleäre als auch

eine cytoplasmatische Lokalisation aufweisen. Sie unterscheiden sich in der Anzahl ihrer katalytischen Domänen, welches die Basis für eine weitere Klassifizierung dieser Proteine darstellt: Während die Mitglieder der Subklasse HDACIIa (HDAC4, 5, 7 und 9) über eine katalytische Domäne verfügen, bilden zwei solche Domänen das charakteristische Merkmal der Subklasse HDACIIb (HDAC6 und 10)¹⁵³.

Die zuletzt entdeckte HDAC11¹⁶³ weist sowohl charakteristische Merkmale der Klasse I (wie beispielsweise nucleäre Lokalisation) als auch der Klasse II (gewebespezifische Expression) auf, wird allerdings aufgrund zu geringer Sequenzhomologien zu den beiden Klassen in die eigene Klasse IV eingegliedert.

Als Gegenspieler der HATs spielen HDACs eine bedeutende Rolle in der Regulation der Transkription und sind in das Kontrollsystem fundamentaler zellulärer Prozesse wie Zellzyklus, Differenzierung und Zellüberleben eingebunden^{153,154}. Fehlerhafte Enzymaktivitäten führen damit nicht nur zu einem fehlerhaften Muster der Genexpression. Sie zerstören die zelluläre Homöostase und haben schwerwiegende neurodegenerative und psychiatrische Erkrankungen sowie Krebs zur Folge¹⁶⁴. Es gibt mindestens zwei chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen, bei denen eine gestörte HDAC-Aktivität als wesentlicher pathogenetischer Mechanismus postuliert wird: das Asthma bronchiale und die COPD^{14,165,166}.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die COPD stellt mit weltweit über 210 Millionen betroffenen Menschen ein hochrelevantes medizinisches Problem mit einer kontinuierlich ansteigenden Inzidenz dar. Als wesentlicher Teil der molekularen Pathogenese bei der COPD wird eine veränderte Expression bzw. Aktivität von Genen postuliert, die an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt ist^{12,13}. Ob die angeborenen Abwehrmechanismen des Bronchialepithels dabei beteiligt sind, ist aber bisher ungeklärt. Untersuchungen der letzten Jahre haben die molekularen Mechanismen der antimikrobiellen angeborenen Immunabwehr bei entzündlichen und infektiösen pulmonalen Erkrankungen wie der Pneumonie oder dem Asthma bronchiale näher beleuchtet^{167,168}. Einige epidemiologisch-genetische Untersuchungen belegen zudem einen Zusammenhang zwischen *DEFB1*-Genpolymorphismen und dem Auftreten der COPD¹⁶⁹. Basierend auf der Hypothese, dass die antimikrobielle angeborene Abwehr eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der COPD spielt, sollten in der vorliegenden Arbeit AMPs bezüglich ihrer Genexpression in der humanen Lunge und im Hinblick auf eine Modulation beim Fortschreiten einer COPD charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte neben den humanen Defensinen die Expression zweier neuartiger,

bisher wenig charakterisierter antimikrobieller Peptide, RNASE7 und S100A7, in der Lunge ebenfalls untersucht werden.

Im Detail sollten untersucht werden:

- Die Expression von α - und β -Defensinen, RNASE7 und S100A7 in der humanen Lunge im Zusammenhang mit der COPD. Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:
 - Ist die Expression dieser Peptide bzw. Proteine bei der COPD gestört?
 - Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser Peptide bzw. Proteine und den – für die COPD-Diagnostik relevanten – Parametern?
 - Welchen Einfluss haben potenzielle Krankheitserreger der Atemwege auf die Expression dieser Peptide bzw. Proteine?
- Die molekularen Mechanismen der Genexpression von *DEFB1* im Zusammenhang mit der COPD. Hier sollten folgende Fragen beantwortet werden:
 - Welche epigenetischen Mechanismen sind an der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* beteiligt?
 - Ist die transkriptionelle Aktivierung von *DEFB1* mit einem Muster bestimmter Histon-Modifikationen assoziiert?
 - Besteht ein Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* und humanen Histon-Deacetylasen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Ausgewählte Geräte und Zubehör

Binocular und Durchlichtmikroskop:	Zeiss (Jena, Deutschland)
Brutschrank:	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
BioPhotometer:	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5415C:	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
LightCycler 2.0 und 480:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (white):	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
20 µl LightCycler Sample Carousel 2.0:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Mastercycler gradient:	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pellet Pestle Cordless Motor:	Kontes (New Jersey, USA)
RNase Free Pellet Pestle Only (1,5 ml):	Kontes (New Jersey, USA)
RNase Free Pellet Pestle w/tube (1,5 ml):	Kontes (New Jersey, USA)
Rotanta 46RC:	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Rotixa 50 RS:	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Sonifier 250 mit Regeleinheit TM2:	Bradson (Danbury/CT, USA)

2.2 Kits

AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity:	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Absolutely RNA Miniprep Kit:	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
EpiTect Bisulfite Kit:	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hemacolor-Schnellfärbung-Färbeset:	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Human Interleukin-8 (Hu IL-8) ELISA Kit:	Invitrogen (Leek, Niederlande)
LightCycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green Master:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
LightCycler TaqMan Master:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
LightCycler 480 SYBR Green Master:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
LightCycler 480 Probes Master:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit:	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Promega-PCR-Mix:	Promega (Madison, USA)

QIAamp DNA Mini Kit:	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SuperScript III Reverse Transcriptase Kit:	Invitrogen (Leek, Niederlande)
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing:	Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose:	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Aqua ad iniectabilia:	Braun (Melsungen, Deutschland)
Bacto-Agar:	Otto Nordwald (Hamburg, Deutschland)
Bovine serum albumin (BSA):	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Bromphenolblau:	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Complete Mini EDTA-free:	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT):	Biochemika Fluka (Buchs, Schweiz)
Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP):	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA):	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ethidiumbromid:	GIBCO GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Fetal calf serum (FCS):	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Formaldehyd (37 % in H ₂ O):	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Glukose:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Glycerin:	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl):	Biochemika Fluka (Buchs, Schweiz)
Kanamycin:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl):	Roth (Karlsruhe Deutschland)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃):	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃):	Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ :	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Paraformaldehyd (PFA):	Biochemika Fluka (Buchs, Schweiz)
Penicillin:	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow:	Amersham (Uppsala, Schweden)
RNA (aus Bäckerhefe):	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS):	Amersham (Cleveland, USA)
Streptomycin:	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Tris:	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Tris-HCl:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Triton X-100:	Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
10 x Trypsin/EDTA:	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Trypton:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Xylencyanol:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Weitere Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.4 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert. Die Puffer wurden mit dem Wasser *Aqua ad iniectabilia* von der Firma B. Braun (Melsungen, Deutschland) angesetzt.

2.4.1 Zellkultur

DMEM-komplett:	DMEM, <i>high Glucose, with L-Glutamin</i> (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS; Lagerung bei 4 °C
Einfriermedium:	10 % (v/v) DMSO in FCS; frisch angesetzt
PBS:	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4; Lagerung bei 4 °C
RPMI:	RPMI 1640, <i>high Glucose, with L-Glutamin</i> (PAA Laboratories, Pasching, Österreich); Lagerung bei 4 °C
RPMI-komplett:	RPMI 1640, <i>high Glucose, with L-Glutamin</i> (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS; Lagerung bei 4 °C
10 x Trypsin/EDTA:	PAA Laboratories (Pasching, Österreich), enthält 0,5 % (w/v) Trypsin, 0,2 % (w/v) EDTA; nach der Verdünnung Lagerung bei 4 °C

2.4.2 Bakterienanzucht

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,5; Lagerung bei 4 °C
LB/Kanamycin-Agar-Platten:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar, autoklaviert und vor der Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration: 25 µg/ml) auf 50 °C abgekühlt; Lagerung bei 4 °C
LB/Kanamycin-Medium:	30 µg/ml Kanamycin im LB-Medium; Lagerung bei 4 °C

2.4.3 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

ChIP-PBS:	150 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5; kurz vor Verwendung wurde in je 10 ml Puffer eine Proteaseinhibitor-Tablette (<i>Complete Mini EDTA-free</i> , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) aufgelöst; Lagerung bei 4 °C
-----------	---

ChIP-Verdünnungspuffer:	0,01 % (w/v) SDS, 1,1 % (v/v) Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl (pH 8), 167 mM NaCl; kurz vor Verwendung wurde in je 10 ml Puffer eine Proteaseinhibitor-Tablette (<i>Complete Mini EDTA-free</i> , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) aufgelöst; Lagerung bei 4 °C
Elutionspuffer:	0,1 M NaHCO ₃ , 1 % SDS; frisch angesetzt
Hochsalzwaschpuffer:	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl; Lagerung bei 4 °C
Lithiumchlorid-Waschpuffer:	0,25 M LiCl, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8); Lagerung bei 4 °C
Niedrigsalzwaschpuffer:	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl; Lagerung bei 4 °C.
SDS-Lysepuffer:	1 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8); kurz vor Verwendung wurde in je 10 ml Puffer eine Proteaseinhibitor-Tablette (<i>Complete Mini EDTA-free</i> , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) aufgelöst
1 %-ige Formaldehyd-Lösung:	1 % (w/v) Formaldehyd (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in RPMI; frisch angesetzt
20/2 TE-Puffer:	2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8); Lagerung bei 4 °C

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer:	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8,0
6 x Beladungspuffer:	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin in H ₂ O; Lagerung bei 4 °C

2.5 Stimulantien und weitere Substanzen

<i>Acinetobacter lwoffii</i> F78:	zur Verfügung gestellt von Ania Hanuszkiewicz (Forschungszentrum Borstel, FZB)
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 618:	zur Verfügung gestellt von Kay Vogel (FZB)
DMSO:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
<i>Escherichia coli</i> F1111 9-41:	zur Verfügung gestellt von Uwe Mamat und Ania Hanuszkiewicz (FZB)
Ethanol:	Merck (Darmstadt, Deutschland)
humanes rekombinantes TNF- α :	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Daniela Männel (Regensburg, Deutschland)
LPS von <i>Salmonella enterica</i> : (serovar Friedenau)	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Helmut Brade (FZB)

Pam ₃ CS-K ₄ :	EMC microcollections GmbH (Tübingen, Deutschland)
Trichostatin A (TSA):	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
5-Aza-2'-desoxycytidin (ZdCyt):	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.6 Enzyme

EcoR1 & EcoR1-Puffer:	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Proteinase K:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
RNase A:	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
RNaseOut:	Invitrogen (Leek, Niederlande).

2.7 Antikörper

Anti-Acetyl-Histone H3:	Millipore (#17-615; Billerica, MA, USA)
Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9):	Millipore (#07-352, Billerica, MA, USA)
Anti-acetyl-Histone H3 (Lys14):	Millipore (#07-353, Billerica, MA, USA)
Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys9):	Millipore (#07-712, Billerica, MA, USA)
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys4):	Millipore (#05-745, Billerica, MA, USA)
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys9):	zur Verfügung gestellt von Dr. Jörn Bullwinkel (FZB);
Anti-trimethyl-Histone H4 (Lys20):	zur Verfügung gestellt von Dr. Jörn Bullwinkel (FZB).

2.8 Oligonucleotide (Primer)

Tabelle 2-1 Verwendete Primer.

Primer	Sequenz	Größe des Produktes [bp]	Intron-überspannend
GAPDH	<i>sense</i> GTCATCATCTCCGCCCTTCTGC <i>antisense</i> GATGCCTGCTTACCACCTTCTTG	443	Nein
β ₂ -M	<i>sense</i> GCTGTGCTCGCGCTACTCTC <i>antisense</i> GCGGCATCTTCAAACCTCCAT	368	Ja
PBG-D	<i>sense</i> AACCTGCCAGAGAAGAGTG <i>antisense</i> AGCCGGGTGTTGAGGTTT	117	Ja
DEFA5	<i>sense</i> GCCATCCTTGCTGCCATTC <i>antisense</i> TGATTTACACACCCCGGAGA	241	Ja
DEFA6	<i>sense</i> GCAGGCAAAAGCTTATGAGG <i>antisense</i> AGTGAAAGCCCTTGTTGAGC	127	Ja
DEFB1	<i>sense</i> TGTCTGAGATGGCCTCAGGT <i>antisense</i> GGGCAGGCAGAATAGAGACA	106	Ja
DEFB4	<i>sense</i> TCAGCCATGAGGGTCTTGTA <i>antisense</i> GGATCGCCTATACCACAAA	89	Ja
DEFB103A	<i>sense</i> TTGCTCTTCCTGTTTTTGGTG <i>antisense</i> CGCCTCTGACTCTGCAATAA	85	Ja

Tabelle 2-1 Verwendete Primer (Fortsetzung).

Primer		Sequenz	Größe des Produktes [bp]	Intron- überspannend
DEFB104A	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CCAGCATTATGCAGAGACTTG CATGCATAGGTGTTGGGACA	178	Ja
RNASE7	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA GGAGTCACAGCACGAAGACCA	235	Ja
S100A7	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CTGCTGACGATGATGAAGGA CGAGGTAATTTGTGCCCTTT	73	Ja
IL8	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TTGCCAAGGAGTGCTAAAGAA CAACCCTACAACAGACCCACAC	334	Ja
HDAC1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CCAAGTACCACAGCGATGAC TGGACAGTCCTCACCAACG	110	Ja
HDAC2	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TGAAGGAGAAGGAGGTGCGAA GGATTTATCTTCTTCTTAACGTCTG	124	Ja
HDAC3	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CACCATGCCAAGAAGTTTGA CCCGAGGGTGGTACTTGAG	91	Ja
HDAC4	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GTGGTAGAGCTGGTCTTCAAGG GACCACAGCAAAGCCATTC	60	Ja
HDAC5	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TCTGAATACCACACCCTGCTC ACAAGGCAGCACAGCATACA	111	Ja
HDAC6	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AGTTCACCTTCGACCAGGAC GCCAGAACCTACCCTGCTC	72	Ja
HDAC7	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CATGACCTCACAGCCATCTG CATTGAGGTTGGGGTTTCTG	113	Ja
HDAC8	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CAGGATGGCATAACAAGATGAAA ATGGGATCCCCAGCTATTGT	128	Ja
HDAC9	<i>sense</i> <i>antisense</i>	ATCCCAAGCTCTGGTACACG TCTTGTGCTCCTGGTAATGTGT	109	Ja
HDAC10	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CTGTCAACCTGCCCTGGA CAGCTCAGGGTCAAACCTCAA	105	Ja
HDAC11	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TGTCTACAACCGCCACATCT TGTTCTCTCCACCTTATCCA	119	Ja
GAPDH ^{ChIP}	<i>sense</i> <i>antisense</i>	TACTAGCGGTTTTACGGGCG TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	166	Nein
Histon H4	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CATCACCAAGCCTGCCATTCGG CACATCCATGGCTGTGACGGTC	162	Nein
LINE-1	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GCAGGCCTGGTGGTGAC CAGAATTTTCATATCCAGCCA	101	Nein
DEFB1 ^{ChIP-I}	<i>sense</i> <i>antisense</i>	CCCACTGGGGGCTCACTTTTCT TGGCCAAGGCTACCTTCTCA	136	Nein
DEFB1 ^{ChIP-II}	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GAAGAGGGTGAAGTTTGGAG AGGCAGTTCACACTGGA	150	Nein
DEFB1 ^{ChIP-III}	<i>sense</i> <i>antisense</i>	AGAACTGCCTAACCTAGAAA ACTTCTAATCGCTAACCCCT	151	Nein
DEFB1 ^{ChIP-IV}	<i>sense</i> <i>antisense</i>	GGTTAGCGATTAGAAGTTC TGGAGCGTCACTGTATT	100	Nein

Tabelle 2-1 Verwendete Primer (Fortsetzung).

Primer		Sequenz	Größe des Produktes [bp]	Intron-überspannend
DEFB1 ^{ChIP-V}	<i>sense</i>	GCAATCCACCAGTCTTAT	113	Nein
	<i>antisense</i>	AGGCAACACTCAGGATT		
DEFB1 ^{ChIP-VI}	<i>sense</i>	GAGAACTTCCTACCTTCTGC	135	Nein
	<i>antisense</i>	AGCCATCCGAGACTCAC		
DEFB1 ^{ChIP-VII}	<i>sense</i>	TGCCATAAGCACATTGC	107	Nein
	<i>antisense</i>	GCCGAGAATAGCCAAGA		
DEFB1 ^{ChIP-VIII}	<i>sense</i>	CAATGTCTCTATTCTGCCT	117	Nein
	<i>antisense</i>	TTCACTTCTGCGTCATT		
DEFB1 ^{Bisulfit} (S1-Abschnitt)	<i>sense</i>	TTTAGTGGGAAAAGAGAAAAGTT	498	Nein
	<i>antisense</i>	AACTAATAAATTACACAACCTC		
DEFB1 ^{Bisulfit} (S2-Abschnitt)	<i>sense</i>	GGGTTAATTTTTTGGGAAGAGAA	389	Nein
	<i>antisense</i>	CACAAAATTCATTTTAACCC		
DEFB1 ^{Bisulfit}	<i>sense</i>	GGTTGGGTTAGATTTTTATTTTT	873	Nein
	<i>antisense</i>	ATACTTTCCTACTACTTATTCTCT		

2.9 Studiendesign und Patientenmaterial

Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad einer COPD und gesunde Probanden wurden in der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel rekrutiert. Die Diagnose einer COPD basierte auf dem Nachweis einer nicht vollständig reversiblen Atemwegsobstruktion. Die Schweregradeinteilung erfolgte gemäß der Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der DGP³ anhand der Messungen von FEV₁ und VC sowie der Bestimmung des Quotienten FEV₁/VC (FEV₁/VC < 70 % und FEV₁ < 80 %). Die Teilnahme an dieser Studie war freiwillig und setzte ein schriftliches Einverständnis nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Information über die Studie und die Untersuchungen voraus. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Lübeck bewilligt.

Es wurden insgesamt 34 COPD-Patienten und zehn gesunde Probanden rekrutiert. Nach Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie wurden alle Studienteilnehmer mittels eines strukturierten Fragebogens charakterisiert und auf ihre Lungenfunktion und allgemeinen körperlichen Parameter hin untersucht. Die wesentlichen dieser Zielparameter sind: Anamnese (Symptome), Raucherstatus (*pack years*), Lungenfunktion (Spirometrie und Ganzkörperplethysmographie), Belastungstest (6-Min-Gehtest) und Laboruntersuchungen (Zelldifferenzierung in der BAL-Flüssigkeit). Folgende Lungenfunktionstests waren für diese Arbeit von besonderer Bedeutung:

- 1-Sekunden-Kapazität (FEV₁): Volumen, das innerhalb der ersten Sekunde einer forcierten Expiration ausgeatmet wird
- inspiratorische Vitalkapazität (VC): Volumen zwischen maximaler Ausatmung und maximaler Einatmung

Residualvolumen (RV):	Volumen, das nach maximaler Ausatmung in der Lunge verbleibt
Totale Lungenkapazität (TLC):	gesamtes, sich in der Lunge befindliches Volumen bei maximaler Einatmung = Summe aller einzelnen Lungenvolumina
intrathorakales Gasvolumen (ITGV):	Volumen, das nach einer Ausatmung in der Lunge verbleibt
inspiratorische Kapazität (IC):	Volumen, das nach normaler Ausatmung bei maximaler Inspiration eingeatmet werden kann

Die Normalwerte der Lungenvolumina [Liter, l] sind abhängig von Größe, Alter und Geschlecht, werden daher zur Beurteilung des Schweregrades einer Funktionsstörung als % vom Mindest- bzw. Höchstsollwert angegeben.

Alle Studienteilnehmer wurden einer Bronchiskopie unterzogen. Diese wurden nach den nationalen Empfehlungen¹⁷⁰ von PD Dr. Christoph Lange in der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel durchgeführt. Während der Bronchoskopie wurden jeweils bronchoalveoläre Lavage (BAL)-Flüssigkeiten und Bronchialschleimhautbiopsien mittels einer BAL gewonnen. Dieses Material stellte die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dar und wurde direkt nach der Gewinnung im Labor weiter verarbeitet.

2.9.1 Verarbeitung der BAL-Flüssigkeiten

Die BAL-Flüssigkeiten wurden durch ein Nylon-Filtergewebe (A. Hartenstein GmbH, Würzburg/Versbach, Deutschland) filtriert, zentrifugiert (10 min, 2000 rpm, 4 °C) und die isolierten Zellen wurden einmal in 1 x PBS gewaschen (5 min, 2000 rpm, 4 °C). Je nach Experiment wurden die Zellen (i) für die Zelldifferenzierung mittels Hemacolor-Schnellfärbung verwendet (Abschnitt 2.9.3), (ii) für die RNA-Isolierung bei -20 °C eingefroren (Abschnitt 2.12.3) oder (iii) für die Chromatinimmunpräzipitation sofort weiterverarbeitet (Abschnitt 2.12.8).

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen der BAL-Flüssigkeit mit 0,1 % (w/v) Trypanblau-Lösung in 1 x PBS (GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Braun, Ludwigshafen, Deutschland) ausgezählt. Die Epithelzellen und Erythrocyten wurden dabei nicht berücksichtigt.

2.9.2 Verarbeitung der Bronchialschleimhautbiopsien

Die Bronchialschleimhautbiopsien wurden von der physiologischen Kochsalzlösung befreit (5 min, 2000 rpm, 4 °C) und je nach Experiment wie folgt weiterverarbeitet: (i) das Biopsiematerial wurde nach Zugabe von zunächst 100 µl Lysispuffer und anschließend noch weiteren 500 µl Lysispuffer inklusive β-Mercapthoethanol (Endvolumen 600 µl) aus dem *Absolutely RNA Miniprep Kit* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) mit einem *Pellet Pestle*

Cordless Motor (Kontes, New Jersey, USA) bei 4 °C homogenisiert und für die RNA-Isolierung bei -20 °C eingefroren (Abschnitt 2.12.3) oder (ii) das Biopsiematerial wurde für die Bisulfit-Sequenzierung sofort weiterverarbeitet (Abschnitt 2.12.7).

2.9.3 Hemacolor-Schnellfärbung

Die Hemacolor-Schnellfärbung von Zellen der BAL-Flüssigkeit erfolgte mit dem Hemacolor-Schnellfärbung-Färbeset der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Durchführung der Färbung und die anschließende Zelldifferenzierung wurde von Frau Simone Ross aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Pneumologie von Herrn PD Dr. Hans-Peter Hauber der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel übernommen.

2.10 Zellkultur

Beide Zelllinien, A549 (humane Lungenepithelkarzinom-Zelllinie) und NCI-H727 (humane Bronchialepithelkarzinom-Zelllinie), wurden von der LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland) bezogen.

A549-Zellen wurden in DMEM-komplett und NCI-H727-Zellen in RPMI-komplett in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen geerntet, in neue Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität wurden die Zellen mit 0,1 % (w/v) Trypanblau-Lösung in PBS (GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Braun, Ludwigshafen, Deutschland) ausgezählt.

2.10.1 Behandlung von A549 und NCI-H727-Zellen

A549-Zellen wurden für die verschiedenen Experimente mit 3×10^5 Zellen/ml (in DMEM-komplett) in 6-well-Platten (1 ml) bzw. in 75 cm² Zellkulturflaschen (10 ml) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. NCI-H727-Zellen wurden entsprechend mit 5×10^5 Zellen/ml (in RPMI-komplett) in 6-well-Platten (1 ml) bzw. in 75 cm²-Zellkulturflaschen (10 ml) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Die Zellen wurden mit 5 µM bzw. 50 µM ZdCyt, 400 nM TSA, 1 ng/ml IL-1β (A549) oder 100 ng/ml LPS (NCI-H727) über 12 bis 72 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit entsprechendem Volumen Medium, Ethanol oder DMSO versetzt. Je nach Experiment wurden nach den Behandlungen (i) der Überstand gewonnen und für ELISA-Analysen verwendet (Abschnitt 2.11), (ii) die Zellen für die RNA-Isolierung bei -20 °C eingefroren (Abschnitt 2.12.3) bzw. (iii) die Zellen für die Bisulfit-Sequenzierung sofort weiterverarbeitet (Abschnitt 2.12.7).

Für ChIP-Experimente wurden NCI-H727-Zellen mit 10^6 Zellen/ml in 75 cm²-Zellkulturflaschen (10 ml) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Die Zellen wurden mit 50 µM ZdCyt für 72 h bzw. mit 400 nM TSA für 24 h behandelt und sofort für die Chromatinimmunpräzipitation weiterverarbeitet (Abschnitt 2.12.8).

2.11 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der CXCL8-Konzentration erfolgte mit dem *Human Interleukin-8 (Hu IL-8) ELISA Kit* (Invitrogen, Leek, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Die Absorption der entwickelten ELISA-Platten wurde mit Hilfe eines Tecan Sunrise Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 550 nm gemessen und mit der Software "Magellan 2" ausgewertet.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der genomischen DNA wurde mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt und die genomische DNA bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem *PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit* (Invitrogen, Leek, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt und die Plasmid-DNA bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

2.12.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *Absolutely RNA Miniprep Kit* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt und die Gesamt-RNA bis zur weiteren Bearbeitung bei -70 °C gelagert.

2.12.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem *SuperScript III Reverse Transcriptase Kit* unter Verwendung von RNaseOut (40 Units/µl), 10 mM dNTP-Mix und einem 10 nM Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Mix (jeweils Invitrogen, Leek, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Zur Überprüfung der RNA auf genomische Verunreinigungen wurden RNA-Proben ohne Zugabe des Enzyms

(sog. RT-negative-Proben) mitgeführt. Anschließend wurde die Reinheit der RNA anhand nicht Intron-überspannender Primer für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) mittels einer PCR (Abschnitt 2.12.5) überprüft. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.12.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR zum Nachweis von *GAPDH* erfolgte mit dem Promega-PCR-Mix (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers. Die dabei verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.8 aufgeführt. Die PCR wurde im *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei die Schritte 2. bis 4. 35-mal wiederholt wurden:

1. Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Anlagerung der Primer	40 s	60 °C
4. Elongation	40 s	72 °C
5. Finale Elongation	2 min	72 °C
6. Abkühlen	auf 4 °C	

Für die Bisulfit-Sequenzierung wurde eine *proof reading*-Polymerase, *AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity*, der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) verwendet. Der PCR-Mix wurde mit 200 ng der *Template*-DNA unter Zusatz von 1 µl Mg₂SO₄ (Endkonzentration 1 mM) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Die PCR wurde im *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei die Schritte 2. bis 4. 35-mal wiederholt wurden und die Elongations-Zeit auf die Länge des zu amplifizierenden Produkts angepasst wurde:

1. Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Anlagerung der Primer	30 s	55 °C
4. Elongation	variabel [†]	68 °C
5. Finale Elongation	10 min	68 °C
6. Abkühlen	auf 4 °C	

([†] 1 min pro 1000 bp des PCR-Produkts)

Die dabei verwendeten Primer wurden mittels der Software "BiSearch Primer Design and Search Tool" (<http://bisearch.enzim.hu>) für die Bisulfit-konvertierte DNA generiert und sind im Abschnitt 2.8 aufgeführt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.12.10) visualisiert.

2.12.6 Quantitative *Real-time*-PCR

Für die quantitative *Real-time*-PCR wurden zwei unterschiedliche Detektionsmethoden nach Angaben des Herstellers verwendet: (i) *SYBR Green*, ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei 530 nm emittiert, wenn dieser in doppelsträngige DNA interkaliert und damit die vorhandene Menge des Produktes anzeigt und (ii) sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden

(*UniversalProbeLibrary* Sonden), die ebenfalls bei 530 nm emittieren, wenn sie die Zielsequenz gebunden haben. Alle Experimente mit Patienten-Material wurden mit dem *LightCycler 2.0* unter Verwendung von *Light-Cycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green Master* bzw. *LightCycler TaqMan Master* in 20 µl LightCycler-Kapillaren (jeweils Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Experimente mit der Zellkultur erfolgten mit dem *LightCycler 480* unter Verwendung von *Light-Cycler 480 SYBR Green Master* bzw. *LightCycler 480 Probes Master* in 96-well-Platten. Alle dafür benötigten Materialien wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die dabei verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.8 aufgeführt, die verwendeten Detektionsmethoden sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2-2 Verwendete *LightCycler*-Programme.

Primer	Anlagerungs- temperatur [°C]	Elongationszeit [s]	Fluoreszenz- aufnahme [°C]	Methode (Sonde)
β ₂ -M	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
PBG-D	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
DEFA5	64-60	10	83	<i>SYBR Green</i>
DEFA6	60-55	3	83	<i>SYBR Green</i>
DEFB1	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
DEFB4	60	30	72	<i>TaqMan (#35)</i>
DEFB103A	60-53	10	75	<i>SYBR Green</i>
DEFB104A	60-55	4	83	<i>SYBR Green</i>
RNASE7	65-60	9	86	<i>SYBR Green</i>
S100A7	60	30	72	<i>TaqMan (#60)</i>
IL8	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
HDAC1	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
HDAC2	60	30	72	<i>Probes Master (#5)</i>
HDAC3	60	30	72	<i>Probes Master (#1)</i>
HDAC4	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
HDAC5	63-58	10	80	<i>SYBR Green</i>
HDAC6	60	30	72	<i>Probes Master (#58)</i>
HDAC7	63-58	10	80	<i>SYBR Green</i>
HDAC8	63-58	10	74	<i>SYBR Green</i>
HDAC9	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
HDAC10	63-58	10	82	<i>SYBR Green</i>
HDAC11	63-58	10	80	<i>SYBR Green</i>
GAPDH ^{ChIP}	68-58	10	82	<i>SYBR Green</i>
Histon H4	68-58	10	82	<i>SYBR Green</i>
LINE-1	65-60	10	68	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-I}	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-II}	63-58	10	83	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-III}	63-58	10	81	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-IV}	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-V}	63-58	10	81	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-VI}	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-VII}	63-58	10	74	<i>SYBR Green</i>
DEFB1 ^{ChIP-VIII}	63-58	10	78	<i>SYBR Green</i>

Zur Auswertung wurde die "LightCycler 4.05"- bzw. "LightCycler 480"-Software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die absolute Quantifizierung wurde basierend auf einer Verdünnungsreihe aus Plasmid-DNA anhand einer Standardkurve

durchgeführt. Anschließend wurden die experimentell ermittelten Kopienzahlen des Zielgens auf jeweils eine Kopie eines nicht regulierten "*housekeeping gene*", entweder β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M) oder *porphobilinogen deaminase* (PBG-D), berechnet und ggf. für die anschließenden statistischen Analysen logarithmiert. Bei der relativen Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes "*housekeeping gene*" (β_2 -M oder PBG-D) bezogen und gegen eine unabhängige Probe (Kalibrator) normalisiert. Bei beiden Quantifizierungsstrategien wurden die *Real-time*-PCR-Effizienzen anhand von Primer-spezifischen Verdünnungsreihen ermittelt und bei der Auswertung mitberücksichtigt (effizienz-korrigierte Quantifizierung).

2.12.7 Bisulfit-Sequenzierung

Die Bisulfit-Konvertierung erfolgte mit jeweils 1 μ g genomischer DNA, isoliert aus dem Biopsiematerial bzw. aus den Zelllinien A549 und NCI-H727 (Abschnitt 2.12.1), mit dem *EpiTect Bisulfite Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Bei der Bisulfit-Behandlung von einzelsträngiger DNA wird Cytosin zur RNA-Base Uracil desaminiert, während 5'-Methylcytosin vor dieser "Konversion" geschützt ist. Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde mittels einer PCR unter Verwendung einer *AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity* der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) mit spezifischen, für die Bisulfit-konvertierte DNA generierten Primern amplifiziert (Abschnitt 2.12.5), wobei Uracil als Thymin amplifiziert wird und 5'-Methylcytosin unbeeinflusst bleibt. Einzelne PCR-Produkte wurden in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert und in die *One Shot TOP10* chemisch kompetente *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.12.9). Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.12.2) und unter Verwendung von Standard-Primern (T3- und T7-Primer) durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die Methylierungsanalysen wurden mittels der Software "MethTools" (<http://genome.imb-jena.de/methtools/>) durchgeführt und das Muster der CpG-Methylierung ermittelt. Hierfür wurden jeweils mindestens 10 Klone analysiert.

2.12.8 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Experimente mit den Zelllinien wurden nach dem bereits von Bullwinkel *et al.*¹⁷¹ (FZB) publizierten Protokoll durchgeführt.

Die Durchführung der ChIP-Experimente mit Patienten-Material orientiert sich im Wesentlichen ebenfalls an diesem Protokoll. Die Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden hierfür wie folgt verarbeitet: ChIP-Experimente wurden mit jeweils $1,5 \times 10^7$ Zellen der BAL-Flüssigkeit durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit ChIP-PBS gewaschen und mit einer 1 %-igen Formaldehyd-Lösung in 15 ml serumfreiem RPMI bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die Vernetzungs-Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 0,125 M)

gestoppt, die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS inklusive Proteaseinhibitoren (*Complete Mini EDTA-free*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gewaschen und in 2,5 ml Lysispuffer resuspendiert. Der weitere Versuchablauf erfolgte nach dem Protokoll von Bullwinkel *et al.*¹⁷¹.

Zur Präzipitation der DNA-Protein-Komplexe wurden folgende Antikörper von der Firma Millipore (Billerica, MA, USA) verwendet:

Anti-Acetyl-Histone H3:	5 µg, Isotyp <i>rabbit polyclonal</i> IgG, (# 17-615)
Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9):	10 µl, Isotyp <i>rabbit polyclonal</i> IgG (#07-352)
Anti-acetyl-Histone H3 (Lys14):	10 µl, Isotyp <i>rabbit polyclonal</i> IgG (#07-353)
Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys9):	10 µl, Isotyp <i>rabbit polyclonal</i> IgG (#07-712)
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys4):	10 µg, Isotyp <i>rabbit monoclonal</i> IgG Klon MC315 (#05-745)

Zwei weitere Antikörper wurden von Dr. Jörn Bullwinkel (FZB) zur Verfügung gestellt:

Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys9):	10 µl Isotyp <i>rabbit polyclonal</i> IgG
Anti-trimethyl-Histone H4 (Lys20):	10 µl Isotyp <i>rabbit polyclonal</i> IgG

Um die Relevanz der Ergebnisse beurteilen zu können, wurden Präzipitationen ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen) und alle Präzipitate mittels quantitativer *Real-time-PCR* mit Primern gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH^{ChIP}*), *Histon-4* (*Histon H4*) und *long interspersed nuclear element 1* (*LINE-1*) (jeweils interne Kontrollen) untersucht.

Die Untersuchung der gewonnenen DNA-Fragmente erfolgte ebenfalls mittels quantitativer *Real-time-PCR* (Abschnitt 2.12.6). Zur Quantifizierung der präzipitierten DNA wurde ein Ansatz verarbeitet, der weder mit Antikörper noch mit *Protein G Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham, Uppsala, Schweden) und Elutionspuffer behandelt wurde (Input). Die absolute Quantifizierung wurde basierend auf einer Verdünnungsreihe aus der Input-DNA anhand einer Standardkurve durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach Abzug der Negativ-Kontrollen auf *GAPDH^{ChIP}*, *Histon H4* bzw. *LINE-1* normalisiert.

2.12.9 Klonierung mittels *TOPO Cloning-System*

Zur Klonierung wurden das *TOPO Cloning-System* und die *One Shot TOP10* chemisch kompetente *E. coli* als Zielzellen der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) verwendet. Die Klonierung erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing* nach Angaben des Herstellers. Das Ergebnis der Transformation wurde durch Restriktionsfragmentierung überprüft. Hierfür wurden folgende Restriktionsansätze hergestellt: 0,5 µg Plasmid-DNA, 1 µl *EcoR1*(Endkonzentration 5 U), 1 µl *EcoR1*-Puffer (beides New England Biolabs, Ipswich, USA) und *Aqua ad iniectabilia* (Braun, Melsungen, Deutschland) bis zu einem Endvolumen von 10 µl. Die Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert, durch Zugabe von 2 µl

des 6 x Beladungspuffers abgestoppt und die Restriktionsfragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.12.10) visualisiert.

2.12.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA-Fragmente wurden native 1,5 % (w/v) Agarosegele in 1 x TBE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Es wurden jeweils 10 µl der 1:6 mit 6 x Beladungspuffer verdünnten Proben auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 100 Volt im TBE-Puffer aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde der Größenmarker *GeneRuler 100 bp DNA ladder plus* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV Licht (320 nm) mit Hilfe der ChemiDoc 2000-Geldokumentationsanlage und der "QuantityOne"-Software (beide BioRad Laboratories, München, Deutschland).

2.13 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, sind die Daten von allen Studienteilnehmern als Einzeldaten und Mittelwert \pm SEM, alle weiteren Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen von Studienteilnehmern wurden mittels eines ungepaarten t-Tests (bei normal verteilten Werten) bzw. eines *Mann Whitney* Tests oder eines ANOVA mit *Tukey's Multiple Comparison*-Posttest (bei nicht normaler Verteilung der Werte) analysiert. Die Korrelationsanalysen erfolgten unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r . Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Alle statistischen Analysen wurden mit der "GraphPad Prism 5"-Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patienten-Kollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 34 COPD-Patienten und zehn gesunde Probanden rekrutiert. Von allen Studienteilnehmern wurde eine Vielzahl körperlicher und klinischer Parameter ermittelt; eine Auswahl davon ist in der Tabelle 3-1 zusammengefasst. Nach der Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der DGP³ wurden zum Zeitpunkt der Bronchoskopie bei vier Patienten eine sehr schwere (Schweregrad IV), bei 15 eine schwere (Schweregrad III), bei 13 eine mittelgradige (Schweregrad II) und bei zwei Patienten eine leichtgradige (Schweregrad I) COPD diagnostiziert. Für die Schweregradeinteilung galten die Messwerte FEV₁ und VC sowie die Bestimmung des Verhältnisses FEV₁/VC (jeweils in % des Sollwerts, vgl. auch Abschnitt 1.1).

Tabelle 3-1 Auswahl körperlicher und klinischer Parameter der Studienteilnehmer.

Die Schweregradeinteilung der COPD erfolgte anhand der Messung der 1-Sekunden-Kapazität (FEV₁), der inspiratorischen Vitalkapazität (VC) und der Bestimmung des Verhältnisses FEV₁/VC (jeweils in % des Sollwerts). Dauer und Menge des Tabakkonsums ist in *pack years* angegeben. Die Beurteilung der Leitungsfähigkeit erfolgte anhand eines 6-Min-Gehtests. Weitere Parameter: inspiratorische Kapazität (IC), Residualvolumen (RV), Totalkapazität (TLC), intrathorakales Gasvolumen (ITGV), angegeben als % von Mindest- bzw. Höchstsollwert. Alle Angaben sind Mittelwert ± Standardabweichung, in Klammern ist die Spannweite von Minimum bis Maximum angegeben.

Parameter	gesunde Probanden	Schweregrad der COPD			
		I (leicht)	II (mittel)	III (schwer)	IV (sehr schwer)
Teilnehmer [Anzahl]	10	2	13	15	4
Alter [Jahre]	31 ± 8 (20-46)	74 ± 8 (68-79)	67 ± 9 (52-82)	66 ± 8 (46-77)	58 ± 4 (55-63)
Größe [cm]	172 ± 11 (160-193)	161 ± 11 (153-169)	172 ± 10 (157-186)	171 ± 9 (158-187)	166 ± 11 (156-182)
Gewicht [kg]	67 ± 12 (58,5-90)	71 ± 9 (64-77)	84 ± 21 (62-135,1)	74 ± 15 (56-117,5)	59 ± 17 (43-81)
Geschlecht [M / W]	3 / 7	1 / 1	9 / 4	10 / 5	2 / 2
Raucher / Ex-Raucher [Anzahl]	2 / 2	0 / 2	5 / 8	1 / 14	1 / 3
Tabakkonsum [pack-years]	2,9 ± 2,8 (1-7)	50 ± 14 (40-60)	42 ± 19 (10-85)	40 ± 16 (5-65)	43 ± 19 (30-70)
6-Min-Gehtest [m]	516 ± 49 (430-625)	305 ± 170 (185-425)	352 ± 127 (150-545)	291 ± 122 (0-465)	368 ± 89 (240-430)
FEV ₁ [% Soll]	104 ± 17 (61-117)	90 ± 2 (89-91)	64 ± 10 (50-79)	38 ± 6 (30-47)	26 ± 2,8 (23-29)
VC [% Soll]	109 ± 26 (54-161)	107 ± 2 (106-109)	86 ± 12 (65-109)	69 ± 15 (43-98)	62 ± 11 (53-76)
FEV ₁ /VC [% Soll]	89 ± 9 (74-102)	73 ± 11 (65-81)	66 ± 13 (50-91)	47 ± 10 (30-66)	39 ± 8 (32-46)
IC [l]	2,7 ± 0,9 (1,8-4,6)	1,5 ± 1,2 (0,7-2,4)	1,9 ± 0,5 (0,9-2,6)	1,4 ± 0,4 (0,6-1,9)	1,1 ± 0,3 (0,9-1,4)
RV [l]	1,6 ± 0,8 (0,6-3,1)	1,9 ± 0,7 (1,5-2,4)	3,2 ± 0,8 (1,4-5,0)	4,1 ± 1,3 (2,0-6,8)	5,0 ± 0,6 (4,3-5,7)
TLC [l]	6,0 ± 1,8 (3,8-10,1)	5,0 ± 2,1 (3,5-6,4)	6,3 ± 1,1 (4,1-8,4)	6,6 ± 1,2 (4,9-8,8)	7,2 ± 0,95 (6,1-8,4)
ITGV [% Soll]	111 ± 22 (61-145)	114 ± 3,4 (112-117)	135 ± 33 (68-192)	161 ± 35 (103-210)	199 ± 14 (187-218)

Generell stellt das Rauchen einen wesentlichen kausalen Faktor dar, der zur Entwicklung der COPD führt⁹. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen der Patientenuntersuchung der Raucherstatus sowie die Dauer und Menge des Tabakkonsums erfasst. Die letzteren beiden werden als *pack years* angegeben und entsprechen der Anzahl der Zigaretten pro Tag dividiert durch 20 und multipliziert mit Anzahl der Jahre, seit denen geraucht wurde. Wie der Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, lag die Raucherquote bei COPD-Patienten mit 100 % (34 von 34, inklusive aktiver Raucher und Ex-Raucher) deutlich höher als bei gesunden Probanden (4 von 10, entspricht 40 %). Der direkte Vergleich zeigte allerdings keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer COPD und dem Tabakkonsum (*pack years*). Die höchsten absoluten *pack years* ergaben sich nach dieser Studie bei den Schweregraden II (85 *pack years*) und IV (70 *pack years*), der höchste Mittelwert war für den Schweregrad I (50 *pack years*) zu verzeichnen.

Im Allgemeinen zeigen Patienten mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen wie der COPD eine verminderte Belastungsfähigkeit. Ursache ist die Obstruktion der Atemwege. Zur Ermittlung der allgemeinen Leistungsfähigkeit der Patienten wurde der 6-Minuten-Gehtest durchgeführt. Dieser zeigte generell eine deutlich verminderte körperliche Belastbarkeit der Patienten gegenüber jener der gesunden Probanden, mit Tiefstwerten von 240 m (Schweregrad IV), 185 m (Schweregrad I), 150 m (Schweregrad II) bis zur absoluten Unbelastbarkeit (0 m, Schweregrad III). Auf weitere in der Tabelle 3-1 aufgeführte differentialdiagnostische Lungenfunktionsparameter wird im Abschnitt 3.2.5 näher eingegangen.

Von allen Studienteilnehmern wurden bronchoalveoläre Lavage (BAL)-Flüssigkeiten und Bronchialschleimhautbiopsien mittels einer BAL während einer Bronchoskopie gewonnen. Dieses Material stellte die Grundlage der weiteren Untersuchungen dar.

3.1.1 Analyse der Zellverteilung in der BAL-Flüssigkeit in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege

Das aktuelle Entzündungsmodell einer COPD geht davon aus, dass Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen, Neutrophile und Lymphocyten eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der COPD spielen^{4,10}. In diesem Zusammenhang wurden Analysen der zellulären Zusammensetzung der BAL-Flüssigkeit von allen Studienteilnehmern in Abhängigkeit von den Parametern der Atemwegsobstruktion durchgeführt.

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, wird das Vorliegen einer Obstruktion durch die Bestimmung des Verhältnisses FEV_1/VC festgestellt und durch $FEV_1/VC < 70\%$ des Sollwerts definiert. Hierfür wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Zelltypen aus der BAL-Flüssigkeit gegen den Quotienten FEV_1/VC korreliert (Abbildung 3-1).

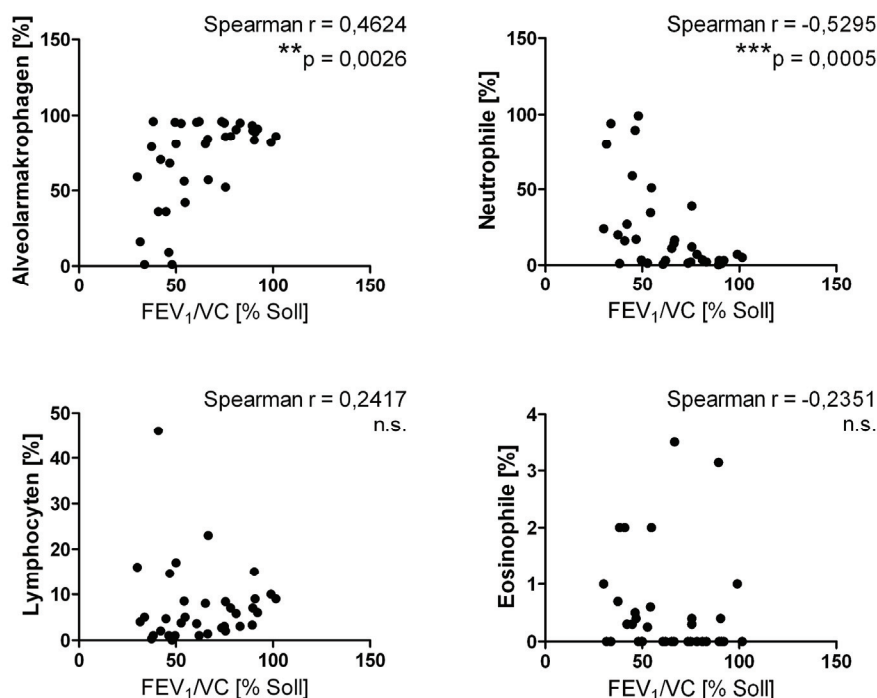


Abbildung 3-1 Analyse der zellulären Zusammensetzung der BAL-Flüssigkeit in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege.

Die Differenzierung der Zellen aus der BAL-Flüssigkeit erfolgte mittels Haemocolor-Schnell-Färbung. Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen den prozentualen Anteilen von Alveolarmakrophagen, Neutrophilen, Lymphocyten und Eosinophilen und dem Quotienten FEV₁/VC (als % des Sollwerts) als Parameter der Atemwegsobstruktion. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r . Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

Die Schwere der Obstruktion zeigte dabei einen signifikanten Einfluss auf die Verteilung von Alveolarmakrophagen und Neutrophilen in der BAL-Flüssigkeit (Abbildung 3-1). Während das Fortschreiten der Obstruktion (d.h. Verringerung des Quotienten FEV₁/VC) mit einer Reduktion des Alveolarmakrophagen-Anteils ($p = 0,0026$) korrelierte, führte dieses gleichzeitig zu einem Anstieg des prozentualen Anteils der Neutrophilen ($p = 0,0005$). Dagegen konnte keine signifikante Korrelation zwischen den Anteilen von Lymphocyten ($p = 0,0810$) bzw. Eosinophilen ($p = 0,0870$) und dem Quotienten FEV₁/VC in der BAL-Flüssigkeit verzeichnet werden.

3.1.2 Identifikation von Mikroorganismen im Patientenmaterial

Im Abschnitt 1.1 wurde bereits dargestellt, dass bakterielle und virale Infektionen der Atemwege an den akuten Verschlechterungen des Zustands der COPD-Patienten (AECOPD) einen beträchtlichen Anteil haben. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen der Kooperationen mit Dr. Nicole Fischer (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf) und Prof. Dr. Hany Sahly (Institut für Infektionsmedizin, Kiel) Untersuchungen des Patientenmaterials auf Krankheitserreger (Viren, Bakterien, Pilze) durchgeführt. Die

Verteilung der Erreger im untersuchten Material ist in der Tabelle 3-2 wiedergegeben. Dabei sind Patienten mit einer stabilen COPD sowie diejenigen mit einer AECOPD getrennt aufgeführt. Erreger, die aktuellen Studien zufolge als häufigste Verursacher einer akuten Exazerbation angesehen werden^{3,172-174}, sind in der Tabelle fett dargestellt.

Tabelle 3-2 Nachgewiesene Mikroorganismen im Biopsiematerial und in Zellen der BAL-Flüssigkeit der Studienteilnehmer.

Fett dargestellt sind Erreger, die als häufigste Verursacher einer Exazerbation angesehen werden. In Klammern ist die prozentuale Erregernachweisrate in der jeweiligen Gruppe angegeben. Der Exponent gibt die Häufigkeit des nachgewiesenen Erregers in der Gruppe wieder. AECOPD – akute Exazerbation einer COPD.

	Bakterien- und Pilze-Nachweis		Viren-Nachweis
	Biopsiematerial	BAL-Flüssigkeit	BAL-Flüssigkeit
gesunde Probanden (40 %)	Enterobacteriaceae ² <i>Staphylococcus aureus</i> vergrünende Streptokokken ² Sprosspilze	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Enterobacteriaceae ² <i>Staphylococcus aureus</i> ²	Adeno-Virus Retro-Virus ² Herpes-simplex-Virus
stabile COPD (38 %)	koagulasenegative Staphylokokken ³ vergrünende Streptokokken	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacteriaceae ⁵	Corona-Virus Zytomegalie-Virus ² Epstein-Barr-Virus Herpes-simplex-Virus
AECOPD (56 %)	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> ² <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacteriaceae ³ <i>Staphylococcus aureus</i> ² <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA <i>Staphylococcus pasteurii</i> koagulasenegative Staphylokokken vergrünende Streptokokken ³ <i>Enterococcus faecium</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> ² <i>Streptococcus pneumoniae</i> ² <i>Moraxella catarrhalis</i> ² <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacteriaceae ³ <i>Staphylococcus aureus</i> ⁴ <i>Enterococcus faecium</i> <i>Prevotella gingivalis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Hafnia alvei</i> Sprosspilze	Rhino-Virus Adeno-Virus Retro-Virus ² Cytomegalie-Virus ² Epstein-Barr-Virus Herpes-simplex-Virus ²

Es lagen mikrobiologische und virologische Befunde von elf Patienten mit einer stabilen COPD, 23 mit einer AECOPD sowie neun gesunden Probanden zur Auswertung vor. Wie der Tabelle 3-2 zu entnehmen ist, konnten pathogene Erreger in allen untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. In der Gruppe der gesunden Probanden lag die Erregernachweisrate bereits bei 40 % und war mit jener der Patienten mit einer stabilen COPD (38 %) sehr ähnlich. Mit 56 % war die Erregerlast bei Patienten mit einer AECOPD am höchsten. Dabei wurden bei Patienten mit einer AECOPD gehäuft pyogene Bakterien wie *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), *P. aeruginosa* aber auch Enterobakterien gefunden. Neben den bakteriellen konnten auch virale Erreger, welche neuen Studien zufolge ebenfalls in der AECOPD eine Rolle spielen¹⁷²⁻¹⁷⁴, in allen untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. So waren in den BAL-Flüssigkeiten bei Patienten mit einer AECOPD unter anderem sowohl

Rhino- als auch Adeno-Viren, bei Patienten mit einer stabilen COPD Corona-Viren und in der gesunden Kontrollgruppe Adeno-Viren nachweisbar.

3.2 Expression von α - und β -Defensinen im Zusammenhang mit einer COPD

Die zentrale Rolle der antimikrobiellen angeborenen Immunabwehr bei entzündlichen und infektiösen pulmonalen Erkrankungen wie Pneumonie oder Asthma bronchiale wurde bereits in den letzten Jahren erkannt^{167,168}. Dennoch gibt es kaum Belege über deren Rolle in der COPD. Das zentrale Ziel des Projektes, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, war eine Analyse humaner Defensine bezüglich ihrer Genexpression in der humanen Lunge und im Hinblick auf eine Modulation beim Fortschreiten einer COPD.

3.2.1 Analyse der mRNA-Expression von α - und β -Defensinen in Abhängigkeit von der COPD

Zu den folgenden Untersuchungen standen BAL-Flüssigkeiten und Bronchialschleimhautbiopsien von insgesamt 33 COPD-Patienten und zehn gesunden Probanden zur Verfügung. In diesem Material wurde die mRNA-Expression von *DEFB1*, *DEFB4*, *DEFB103A* und *DEFB104A* aus der Subgruppe der β -Defensine sowie *DEFA5* und *defensin, alpha 6* (*DEFA6*, syn. HD-6) aus der Subgruppe der α -Defensine untersucht. Von allen untersuchten AMPs konnte nur die mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* konstant detektiert werden (Abbildung 3-2). Diese war sowohl im Biopsiematerial als auch in Zellen der BAL-Flüssigkeit nachweisbar. Die mRNA-Expression von *DEFB103A*, *DEFB104A*, *DEFA5* und *DEFA6* wurde entweder gar nicht oder nur sporadisch im zur Verfügung stehenden Material detektiert (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde im Folgenden nur die Genexpression von *DEFB1* und *DEFB4* weiter untersucht.

Um erste Hinweise zu bekommen, ob die COPD mit einer beeinträchtigten oder gar gestörten Genexpression von *DEFB1* und *DEFB4* einhergeht, wurden Vergleichsanalysen durchgeführt. Hierfür wurde die *DEFB1*- und *DEFB4*-mRNA-Expression im Material von COPD-Patienten (unabhängig vom Schweregrad) im Vergleich zu jener von gesunden Probanden analysiert (Abbildung 3-2).

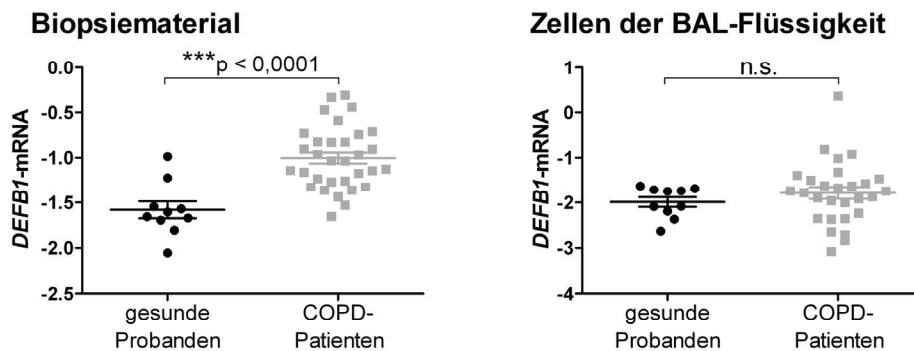
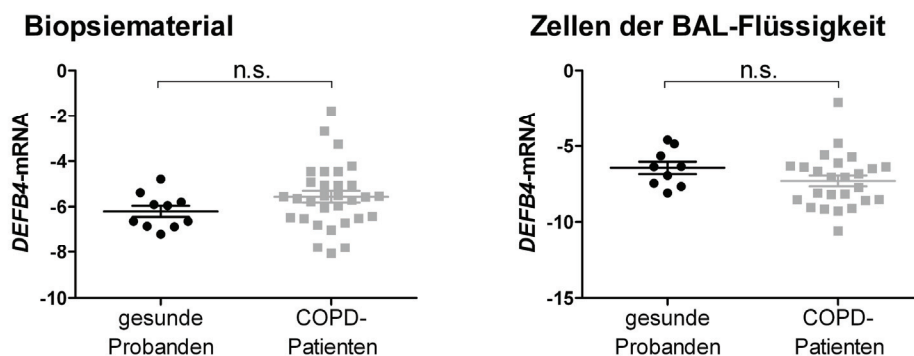
(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression**(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression**

Abbildung 3-2 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit der COPD.

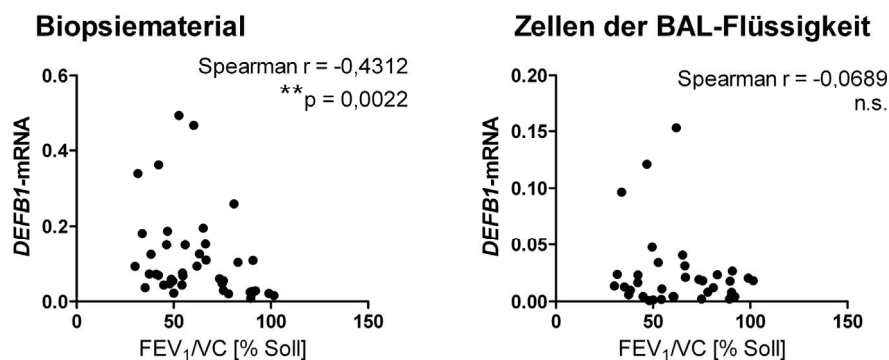
Dargestellt ist die mRNA-Expression von **(A) *DEFB1*** und **(B) *DEFB4*** in Abhängigkeit von einer COPD. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2 -M berechnet und anschließend logarithmiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant. Zusätzlich ist in der Abbildung der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Der direkte Vergleich zeigte, dass die mRNA-Expression von *DEFB4* im Gegensatz zu *DEFB1* auf einem viel niedrigeren Niveau exprimiert wird (vgl. Gruppe der gesunden Probanden in A und B). Die Gegenüberstellung der *DEFB4*-mRNA-Expression im Material von COPD-Patienten und von gesunden Probanden offenbarte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, weder im Biopsiematerial ($p = 0,0894$) noch in den Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,0969$). Dagegen konnte ein signifikanter Anstieg ($p < 0,0001$) der *DEFB1*-mRNA-Expression im Biopsiematerial von COPD-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe verzeichnet werden. Eine solche Analyse in den Zellen der BAL-Flüssigkeit zeigte dagegen keine Unterschiede in der Expression von *DEFB1*-mRNA zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,1951$).

3.2.2 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege

Eine weitere wichtige Fragestellung war, ob ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* und dem Fortschreiten einer Atemwegsobstruktion besteht. Hierfür wurde die mRNA-Expression der beiden Defensine mit dem Quotienten FEV_1/VC korreliert (Abbildung 3-3).

(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression



(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression

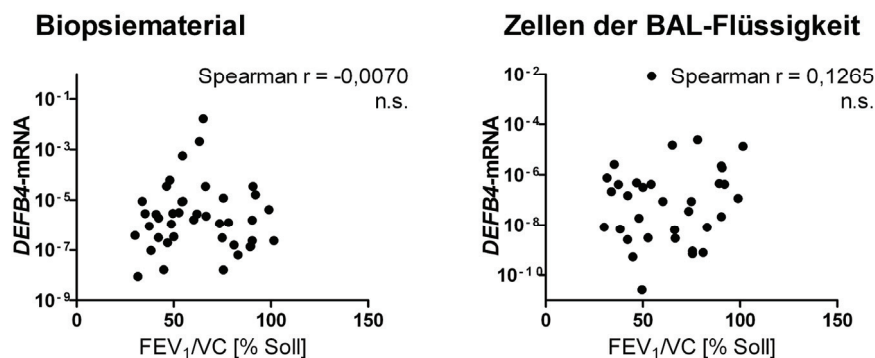


Abbildung 3-3 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege.

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen der mRNA-Expression von (A) *DEFB1* und (B) *DEFB4* in Abhängigkeit vom Quotienten FEV_1/VC (als % des Sollwertes) als Parameter der Atemwegsobstruktion. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2-M berechnet und anschließend unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

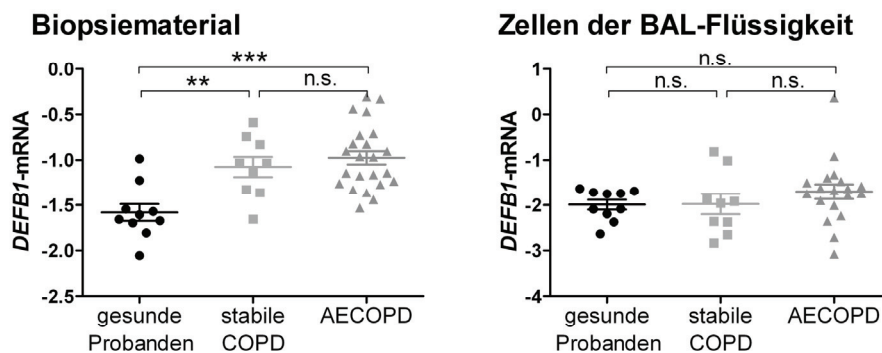
Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Quotienten der Atemwegsobstruktion und der mRNA-Expression von *DEFB1* verzeichnet werden. Wie der Abbildung 3-3 (A) zu entnehmen ist, war das Fortschreiten der Obstruktion (d.h. die Verringerung des Quotienten FEV_1/VC) mit dem Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression im Biopsiematerial ($p = 0,0022$), jedoch nicht in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,3427$) verbunden. In Bezug auf *DEFB4* konnte dagegen keine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression und dem

Quotienten FEV_1/VC nachgewiesen werden, weder im Biopsiematerial ($p = 0,1515$) noch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,2379$, Abbildung 3-3 B).

3.2.3 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von der AECOPD

Akute Verschlechterungen treten bei COPD-Patienten häufig auf und werden als akute Exazerbationen bezeichnet (vgl. auch Abschnitt 1.1). Die Häufigkeit der Exazerbationen nimmt beim Fortschreiten einer COPD kontinuierlich zu und ist durch akute Verschlechterungen des Patienten-Zustandes, zunehmende Atemnot, Husten und Auswurf charakterisiert³. Zwischen diesen Phasen wird die COPD als stabil bezeichnet. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob eine AECOPD auch mit einer veränderten mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* einhergeht (Abbildung 3-4).

(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression



(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression

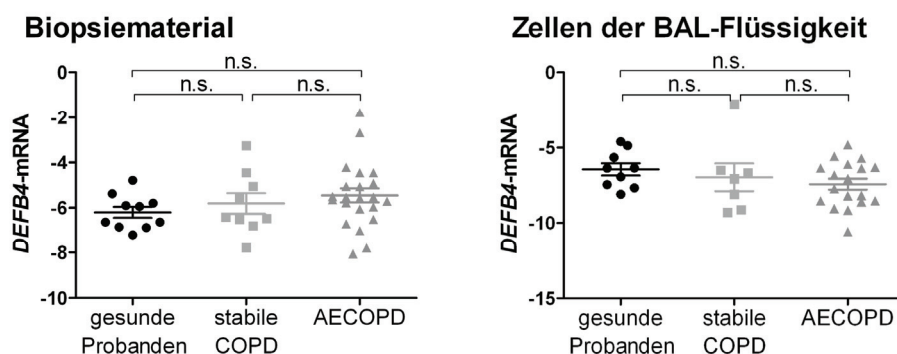


Abbildung 3-4 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von der AECOPD.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von (A) *DEFB1* und (B) *DEFB4* bei Patienten mit einer AECOPD, einer stabilen COPD und bei gesunden Probanden. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie $\beta_2\text{-M}$ berechnet und anschließend logarithmiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines ANOVA mit *Tukey's Multiple Comparison*-Posttest analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, $**p < 0,005$ und $***p < 0,0001$, n.s. – nicht signifikant. Zusätzlich ist in der Abbildung der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Wie bereits im Abschnitt 3.1.2 beschrieben, konnte zum Zeitpunkt der Bronchoskopie bei 23 in dieser Studie rekrutierten Patienten eine AECOPD diagnostiziert werden, elf weitere wurden mit einer stabilen COPD aufgenommen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Abbildung 3-2 konnte im Biopsiematerial von Patienten mit einer stabilen COPD ein signifikanter Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression ($p < 0,05$) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verzeichnet werden (Abbildung 3-4 A). Eine AECOPD war mit einem weiteren Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression ($p < 0,0001$) verbunden. Es gab allerdings keine signifikanten Unterschiede in der *DEFB1*-mRNA-Expression im Biopsiematerial von Patienten mit einer stabilen COPD und Patienten mit einer AECOPD. Die Gegenüberstellung der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit offenbarte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der Patienten und der gesunden Probanden. Bezüglich der *DEFB4*-mRNA-Expression konnten weder im Biopsiematerial noch in Zellen der BAL-Flüssigkeit signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen verzeichnet werden (Abbildung 3-4 B).

Basierend auf der Erkenntnis, dass eine AECOPD neben den akuten Verschlechterungen der Symptome auch durch eine Abnahme der Lungenfunktion (insbesondere Abfall des FEV_1) charakterisiert ist³, wurde die mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* mit dem FEV_1 korreliert (Abbildung 3-5). Dabei konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Abnahme des FEV_1 und dem Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression im Biopsiematerial verzeichnet werden ($p = 0,003$). In Zellen der BAL-Flüssigkeit bestand diese Korrelation nicht ($p = 0,4515$). Im Bezug auf *DEFB4* konnte dagegen weder im Biopsiematerial ($p = 0,1515$) noch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,3670$) ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem FEV_1 und der mRNA-Expression nachgewiesen werden.

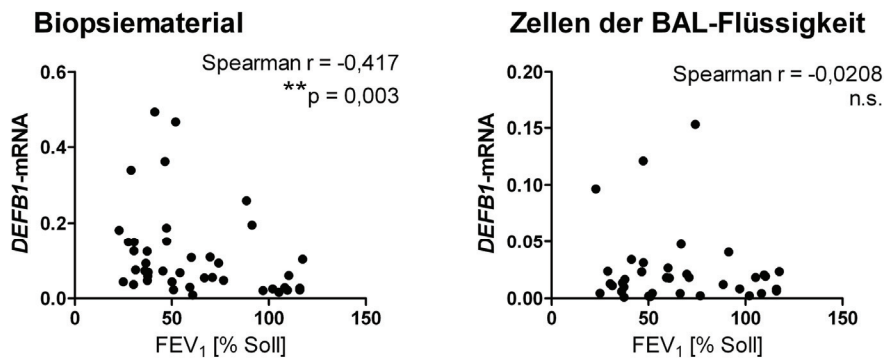
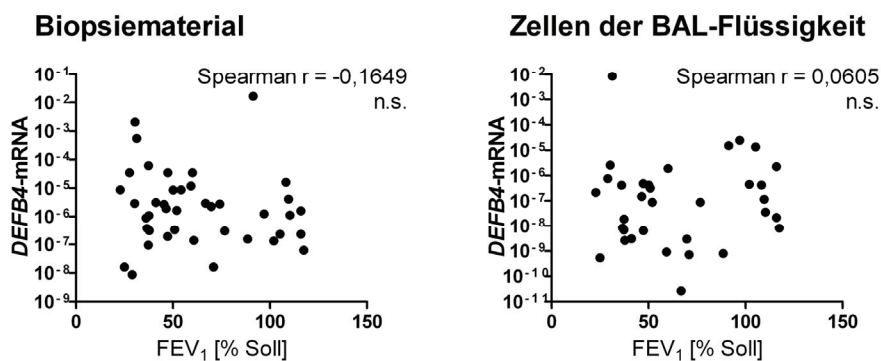
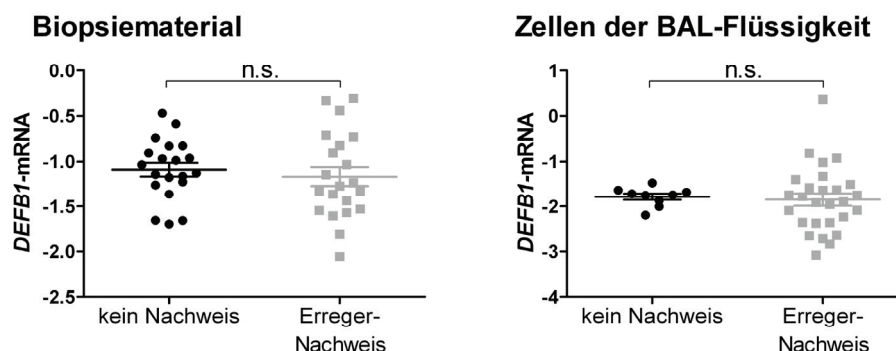
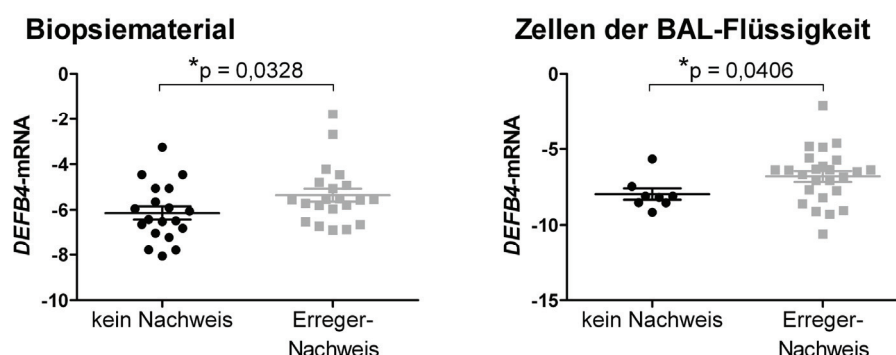
(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression**(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression**

Abbildung 3-5 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von der 1-Sekunden-Kapazität FEV₁.

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen der mRNA-Expression von **(A) *DEFB1*** und **(B) *DEFB4*** in Abhängigkeit von FEV₁ (in % des Sollwertes). Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2 -M berechnet und anschließend unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

3.2.4 Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4*

Obwohl ein kausaler Zusammenhang zwischen Infektionen und der Ausbildung einer COPD bisher nicht gezeigt werden konnte, nimmt die Häufigkeit der Atemwegsinfektionen beim Fortschreiten einer COPD kontinuierlich zu¹⁷⁴. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über die Rolle der Defensine bei der initialen Auseinandersetzung des Immunsystems mit Mikroorganismen wurde untersucht, ob ein spezifischer Erregernachweis mit der Expression von *DEFB1*- und *DEFB4*-mRNA korreliert (Abbildung 3-6).

(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression**(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression****Abbildung 3-6 Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression *DEFB1* und *DEFB4*.**

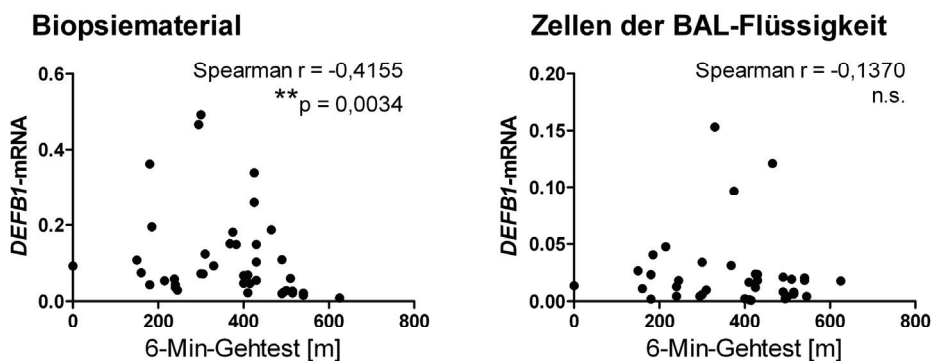
Dargestellt ist die mRNA-Expression von **(A) *DEFB1*** und **(B) *DEFB4*** in Abhängigkeit vom Nachweis der Mikroorganismen. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie $\beta_2\text{-M}$ berechnet und anschließend logarithmiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines *Mann Whitney*-Tests analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant. Zusätzlich ist in der Abbildung der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Hierfür wurde die mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* im Material ohne Erreger-Nachweis im Vergleich zu jenen mit Erreger-Nachweis (ohne Berücksichtigung einer COPD) analysiert (vgl. auch Tabelle 3-2). Dabei konnten für die *DEFB1*-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen verzeichnet werden. Sowohl im Biopsiematerial ($p = 0,2750$) als auch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,3978$) war die mittlere mRNA-Expression nahezu identisch (Abbildung 3-6 A). Im Hinblick auf *DEFB4* konnte dagegen ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression im Zusammenhang mit mikrobiologischen Befunden sowohl im Biopsiematerial ($p = 0,0328$) als auch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,0406$) nachgewiesen werden (Abbildung 3-6 B).

3.2.5 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von weiteren diagnostischen Parametern

Im Zusammenhang mit obigen Untersuchungen wurde auch der Frage nachgegangen, ob neben FEV_1 und VC auch weitere – für die COPD-Diagnostik relevante – Parameter im Zusammenhang mit der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* stehen. Ausgehend von einer verminderten körperlichen Belastung und einem stark erhöhten Tabakkonsum bei den COPD-Patienten wurden zunächst diese beiden Parameter mit der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* korreliert (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8).

(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression



(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression

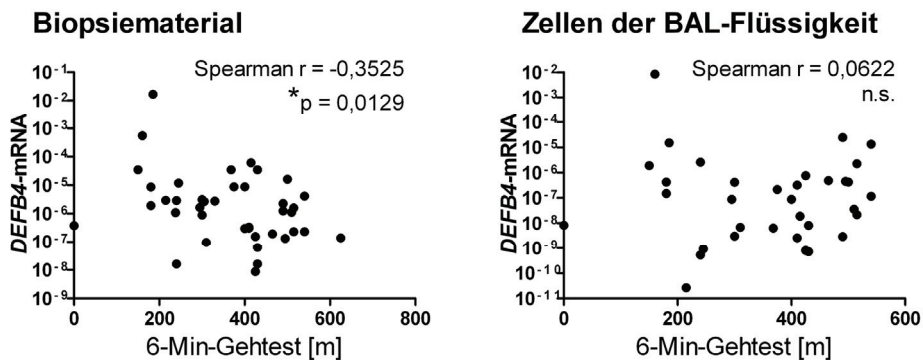


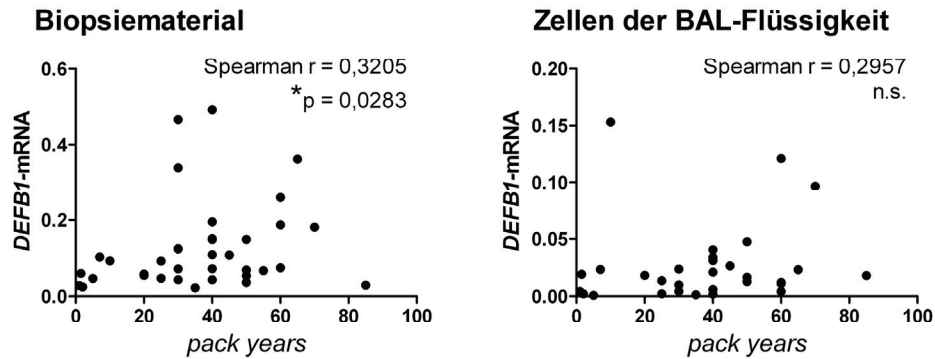
Abbildung 3-7 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von der Belastungsfähigkeit.

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen der mRNA-Expression von (A) *DEFB1* und (B) *DEFB4* in Abhängigkeit von 6-Min-Gehtests. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2-M berechnet und anschließend unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

Im Hinblick auf den 6-Min-Gehtest als "Ermittler" der Leistungsfähigkeit der Patienten konnte im Biopsiematerial eine signifikante Korrelation zwischen einer verminderten Belastungsfähigkeit (Abnahme der 6-Minuten-Gehstrecke) und einer gesteigerten mRNA-

Expression von *DEFB1* ($p = 0,0034$) und *DEFB4* ($p = 0,0129$) verzeichnet werden (Abbildung 3-7).

(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression



(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression

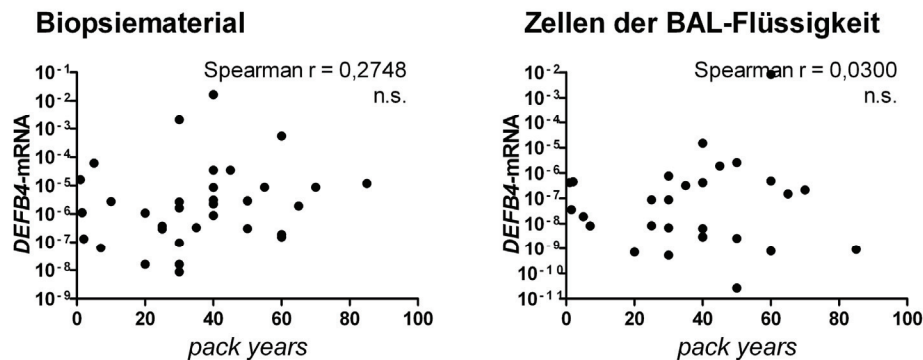


Abbildung 3-8 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit vom Tabakkonsum.

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen der mRNA-Expression von (A) *DEFB1* und (B) *DEFB4* in Abhängigkeit von *pack years*. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2 -M berechnet und anschließend unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

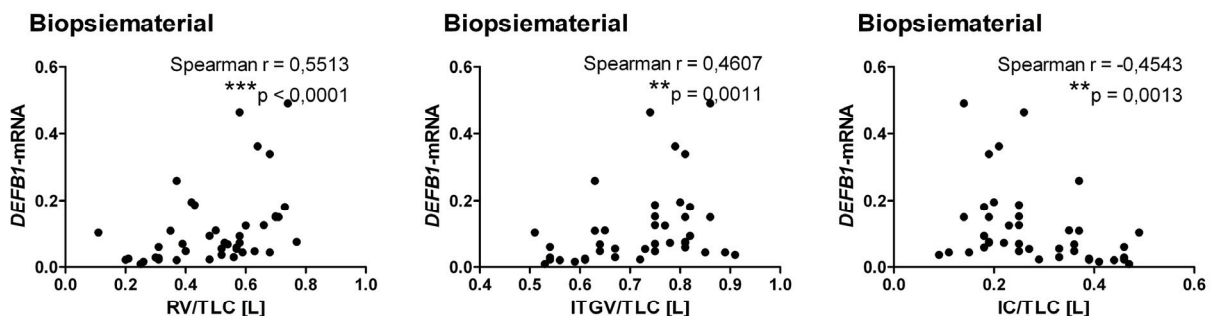
Auch im Bezug auf den Tabakkonsum bestand im Biopsiematerial eine signifikante Korrelation zwischen einer Zunahme an *pack years* und einem Anstieg der mRNA-Expression, allerdings nur von *DEFB1* ($p = 0,0283$) und nicht von *DEFB4* ($p = 0,0551$, Abbildung 3-8).

In Zellen der BAL-Flüssigkeit konnte dagegen keine signifikante Korrelation zwischen den oben genannten Parametern und der mRNA-Expression von *DEFB1* (6-Min-Gehtest: $p = 0,2094$; *pack years*: $p = 0,0531$) und *DEFB4* (6-Min-Gehtest: $p = 0,3633$; *pack years*: $p = 0,4386$ für) nachgewiesen werden (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* mit weiteren, für die COPD relevanten, Parametern der Lungenfunktion korreliert (Abbildung 3-9). Im Einzelnen handelte es sich dabei um:

- RV/TLC: Quotient aus dem Residualvolumen^d (RV) und der Totalen Lungenkapazität^e (TLC), das bei allen Formen der Obstruktion erhöht ist,
- ITGV/TLC: Quotient aus dem intrathorakalen Gasvolumen^f (ITGV) und TLC, das sich bei einer Überblähung der Lunge erhöht, sowie
- IC/TLC: Quotient aus der inspiratorischen Kapazität^g (IC) und TLC, das sich im Gegensatz zu ITGV/TLC mit einer Zunahme der Lungenüberblähung erniedrigt.

(A) Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression



(B) Analyse der *DEFB4*-mRNA-Expression

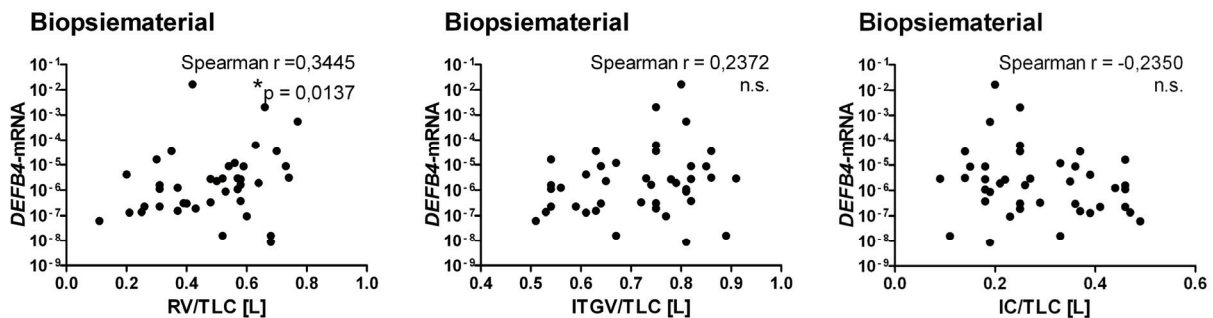


Abbildung 3-9 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* in Abhängigkeit von Parametern der Lungenfunktion.

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen der mRNA-Expression von (A) *DEFB1* und (B) *DEFB4* in Abhängigkeit von RV/TLC, ITGV/TLC und IC/TLC. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2 -M berechnet und anschließend unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

^d Volumen, das nach maximaler Ausatmung in der Lunge verbleibt

^e Gesamtes, sich in der Lunge befindliches Volumen bei maximaler Einatmung

^f Volumen, das nach einer Ausatmung in der Lunge verbleibt

^g Volumen, das nach normaler Ausatmung bei maximaler Inspiration eingeatmet werden kann

Wie der Abbildung 3-9 (A) zu entnehmen ist, konnte im Biopsiematerial eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und den Quotienten RV/TLC, ITGV/TLC sowie IC/TLC nachgewiesen werden: die Zunahme der *DEFB1*-mRNA-Expression korrelierte dabei mit einem Anstieg von RV/TLC ($p < 0,0001$) und ITGV/TLC ($p = 0,0011$) sowie einer Verringerung von IC/TLC ($p = 0,0013$). Im Bezug auf *DEFB4* konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Zunahme der *DEFB4*-mRNA-Expression und dem Anstieg von RV/TLC ($p = 0,0137$) verzeichnet werden. Für ITGV/TLC ($p = 0,0677$) und IC/TLC ($p = 0,0696$) bestand dagegen eine solche Korrelation nicht (Abbildung 3-9 B).

Für Zellen der BAL-Flüssigkeit konnten dagegen keine signifikanten Korrelationen zwischen den oben genannten Parametern und der mRNA-Expression von *DEFB1* und *DEFB4* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ergab die Analyse der Genexpression, dass die mRNA von *DEFB1* und *DEFB4* in der humanen Lunge exprimiert wird. Für die *DEFB1*-mRNA-Expression konnte zudem ein Zusammenhang mit der COPD sowie den wesentlichen Parametern der COPD-Diagnostik gezeigt werden.

3.3 Expression von *RNASE7* und *S100A7* im Zusammenhang mit einer COPD

Neueren Vorstellungen zufolge bilden neben den humanen Defensinen auch zwei weitere antimikrobielle Peptide, *RNASE7* und *S100A7*, einen festen Bestandteil der "chemischen" epithelialen Abwehr¹⁰¹. Dennoch ist es unklar, welche Rolle diese Proteine in den Atemwegen spielen. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der Studie die Genexpression von *RNASE7* und *S100A7* in der humanen Lunge im Hinblick auf eine Modulation beim Fortschreiten einer COPD näher untersucht.

3.3.1 Analyse der mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* in Abhängigkeit von der COPD und diagnostischen Parametern

Zunächst wurde die mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* im Biopsiematerial und in Zellen der BAL-Flüssigkeit in Abhängigkeit von einer COPD untersucht (Abbildung 3-10).

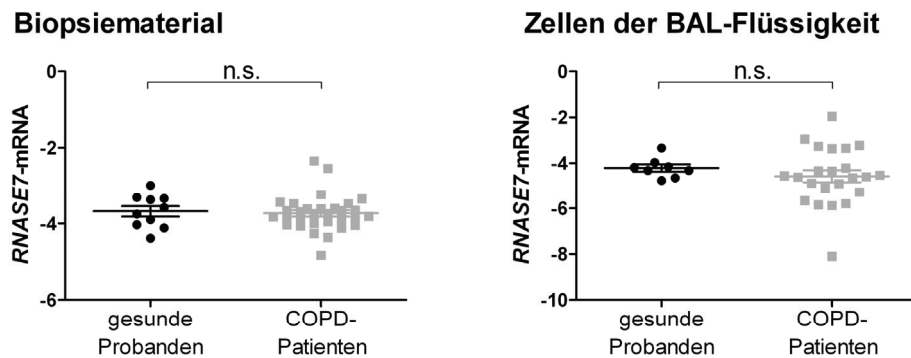
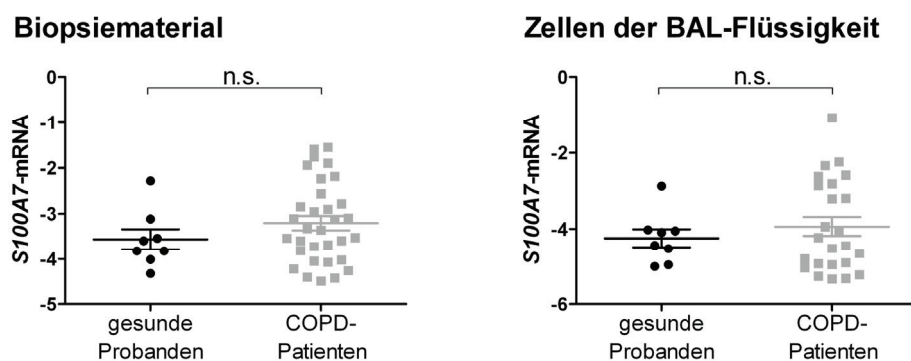
(A) Analyse der *RNASE7*-mRNA-Expression**(B) Analyse der *S100A7*-mRNA-Expression**

Abbildung 3-10 Analyse der mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* in Abhängigkeit von der Diagnose der COPD.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von **(A)** *RNASE7* und **(B)** *S100A7* in Abhängigkeit von einer COPD. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie β_2 -M berechnet und anschließend logarithmiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant. Zusätzlich ist in der Abbildung der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Der direkte Vergleich der mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* offenbarte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der COPD-Patienten und der gesunden Probanden. Im Hinblick auf *RNASE7* war die mittlere mRNA-Expression sowohl im Biopsiematerial ($p = 0,2976$) als auch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,2164$) nahezu identisch (Abbildung 3-10 A). Bezüglich der mRNA-Expression von *S100A7* konnte nur eine ausgeprägte Variabilität in der Gruppe der COPD-Patienten sowohl im Biopsiematerial ($p = 0,1447$) als auch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,2164$) verzeichnet werden (Abbildung 3-10 B).

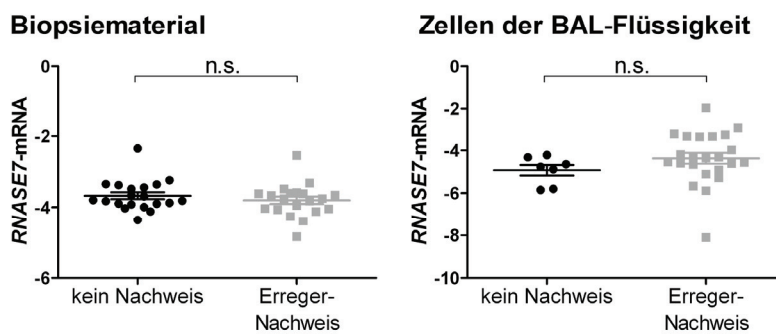
Im Zusammenhang mit den obigen Untersuchungen (vgl. Abschnitt 3.2) wurden Analysen zur Korrelation der mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* mit den wesentlichen Parametern der COPD-Diagnostik wie FEV_1 , FEV_1/VC , RV/TLC , $ITGV/TLC$, IC/TLC , 6-Min-Gehtest sowie *pack years* durchgeführt. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation

zwischen der mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* und diesen Parametern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7*

Basierend auf bereits dargestellten Ergebnissen wurde weiterhin untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen bakteriellen und viralen Erregern und der mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* besteht. Hierfür wurde das zu untersuchende Material in Gruppen ohne (kein Nachweis) bzw. mit Erreger-Nachweis ohne Berücksichtigung einer COPD aufgeteilt und die Expression von *RNASE7*- und *S100A7*-mRNA zwischen den beiden Gruppen verglichen (Abbildung 3-11).

(A) Analyse der *RNASE7*-mRNA-Expression



(B) Analyse der *S100A7*-mRNA-Expression

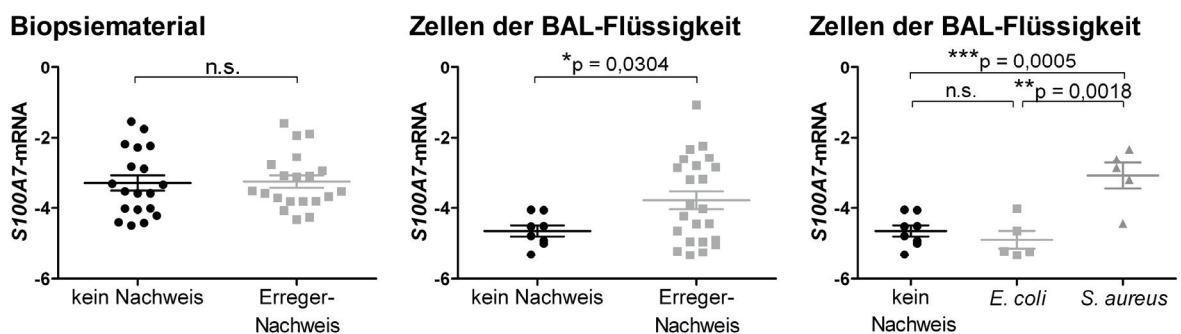


Abbildung 3-11 Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7*.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von (A) *RNASE7* und (B) *S100A7* in Abhängigkeit von Mikroorganismen. Die mRNA-Expression wurde als Kopienzahl des Zielgens pro Kopie $\beta_2\text{-M}$ berechnet und anschließend logarithmiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests analysiert. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant. Zusätzlich ist in der Abbildung der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Wie in der Abbildung 3-11 (A) dargestellt, konnten keine signifikanten Unterschiede in der RNASE7-mRNA-Expression zwischen den Gruppen detektiert werden, weder im Biopsiematerial ($p = 0,2204$) noch in Zellen der BAL-Flüssigkeit ($p = 0,1331$).

Im Hinblick auf die *S100A7*-mRNA-Expression konnten im Biopsiematerial ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ($p = 0,4403$, Abbildung 3-11 B). Dagegen konnte in Zellen der BAL-Flüssigkeit ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von *S100A7* in der "Erreger"-Gruppe verzeichnet werden ($p = 0,0304$). Die hoch variable mRNA-Expression in dieser Gruppe stellte die weitere Frage auf, welche der Erreger einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *S100A7* haben könnten. Dabei ist beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*) im Bezug auf die Genexpression von *S100A7* mittlerweile gut untersucht, der Zusammenhang mit anderen bakteriellen Erregern ist dagegen jedoch weniger bekannt¹⁰⁸. Basierend auf den in der Tabelle 3-2 dargestellten Daten wurden der Effekt der einzelnen Erreger auf die *S100A7*-mRNA-Expression untersucht. Die Koinfektionen viraler und bakterieller bzw. mehrerer bakterieller Erreger wurden dabei ausgeschlossen. Es ergab sich dabei nur für *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *E. coli* jeweils eine Gruppe mit $N = 5$, die untersucht werden konnten. Nach dieser Unterteilung zeigte sich ein starker Zusammenhang zwischen der *S100A7*-mRNA-Expression und dem Nachweis von *S. aureus* ($p = 0,0005$). Für *E. coli* bestand dieser Zusammenhang nicht ($p = 0,1976$; Abbildung 3-11 B).

Zusammenfassend ergab die Analyse der Genexpression, dass die mRNA-Expression von *RNASE7* und *S100A7* in der humanen Lunge exprimiert wird. Es konnte jedoch weder ein Zusammenhang mit der COPD noch mit den wesentlichen Parametern der COPD-Diagnostik nachgewiesen werden.

3.4 Molekulare Mechanismen transkriptioneller Aktivierung von *DEFB1*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war eine Untersuchung der Mechanismen, die zu einem veränderten Muster der *DEFB1*-mRNA-Expression in der COPD führen. Da die Transkription von Genen oft mit einer Veränderung ihrer Chromatinstruktur korreliert, wurden die molekularen Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* in der Lunge anhand von Analysen der DNA-Methylierung und der kovalenten Histon-Modifikationen näher untersucht.

3.4.1 Methylierungsanalyse von *DEFB1*

Wie bereits im Abschnitt 1.6.1 erwähnt, wird bei der DNA-Methylierung die Methylgruppe durch DMTs an dem Cytosin eingeführt, das sich innerhalb der Sequenz 5'-CG-3' befindet. Diese Sequenzen sind im Genom sehr ungleich verteilt und kommen sowohl vereinzelt als CpG-Dinucleotide als auch konzentriert als sog. CpG-Inseln vor¹³⁷. In beiden Fällen erfüllen sie eine wichtige Funktion bei der epigenetischen Kontrolle der Genregulation. In diesem Zusammenhang wurde das Muster der CpG-Methylierung im Gen für *DEFB1* näher untersucht.

3.4.1.1 Analyse von CpG-Inseln im *DEFB1*

Für die folgenden Untersuchungen wurde ein etwa 8000 bp großer Genomabschnitt gewählt, der einen etwa 700 bp großen Bereich stromaufwärts vom Startpunkt der mRNA-Synthese (hypothetischer Promotorbereich), die beiden Exone 1 und 2 sowie die dazu gehörige Intronsequenz des *DEFB1* enthält. Die Bestimmung CpG-reicher Regionen erfolgte mittels der Software "EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) cpplot @ EBI" (Abbildung 3-12).

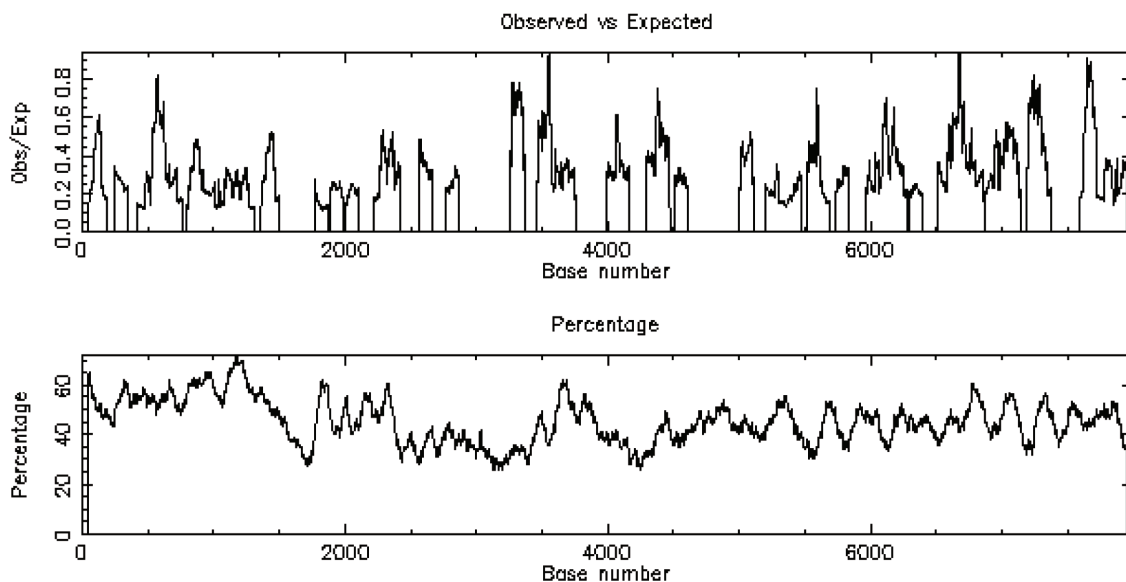


Abbildung 3-12 Analyse von CpG-Inseln im *DEFB1* mittels "EMBOSS cpplot @ EBI".

Folgende Kriterien wurden zur Identifikation einer CpG-Insel verwendet: Verhältnis von beobachtetem CpG-Gehalt zu erwartetem CpG-Gehalt mindestens 0,6 (obere Darstellung); "C+G"-Gehalt der DNA mindestens 50 % (mittlere Darstellung); minimale beobachtete Sequenzlänge 200 bp. Die Software berechnet das Verhältnis von beobachtetem zu erwartetem CpG-Gehalt in einem 100 bp großen Fenster, das in 1-bp-Schritten über die gesamte Sequenz verschoben wird, und ermittelt die Position von CpG-Inseln in der Sequenz.

Folgende Kriterien wurden zur Identifikation einer CpG-Insel verwendet^{138,175,176}: (i) das Verhältnis von beobachtetem CpG-Gehalt zu erwartetem CpG-Gehalt sollte mindestens 0,6 sein, (ii) der "C+G"-Gehalt der DNA sollte mindestens 50 % betragen und (iii) die beobachtete Sequenzlänge sollte mindestens 200 bp sein. Die Analyse zeigte, dass die Kriterien zur Identifikation einer CpG-Insel im gesamten, etwa 8000 bp großen, Sequenzbereich nicht erfüllt wurden. Somit konnten keine CpG-Inseln im Gen für *DEFB1* identifiziert werden.

3.4.1.2 Analyse der CpG-Methylierung im *DEFB1* nach Bisulfit-Behandlung im Biopsiematerial

Im Allgemeinen wird angenommen, dass die transkriptionelle Aktivität von Genen, die keine CpG-Inseln in ihren Promotoren besitzen, durch die Verteilung und Dichte der einzelnen methylierten CpG-Dinucleotide reguliert werden kann¹⁴⁰. Basierend auf dieser Hypothese wurde das Methylierungsmuster der einzelnen CpG-Dinucleotide im *DEFB1* mit Hilfe einer Bisulfit-Behandlung im Biopsiematerial untersucht (Abbildung 3-13). Diese Technik ermöglicht die Erfassung aller methylierten CpG-Dinucleotide unabhängig von ihren Positionen und lässt somit eine Aussage über den Methylierungszustand der einzelnen Cytosine innerhalb der Sequenz zu.

Für die Analyse der CpG-Methylierung wurden zwei Sequenzabschnitte im Gen für *DEFB1* gewählt: ein 498 bp großer Abschnitt mit acht CpG-Dinucleotiden, der sich stromaufwärts vom Startpunkt der mRNA-Synthese befindet (hypothetischer Promotorbereich, S1-Abschnitt), sowie ein 389 bp großer Abschnitt mit sieben CpG-Dinucleotiden, der die komplette Sequenz des Exons 2 enthält (S2-Abschnitt). Die Lage der einzelnen CpG-Dinucleotide in den beiden Sequenzabschnitten ist in der Abbildung 3-13 (A) schematisch dargestellt. Die Expression der dazugehörigen *DEFB1*-mRNA im untersuchten Biopsiematerial ist in der Abbildung 3-13 (B) wiedergegeben. Hier konnte ein signifikanter Unterschied in der *DEFB1*-mRNA-Expression in der Gruppe der COPD-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe verzeichnet werden ($p = 0,0079$).

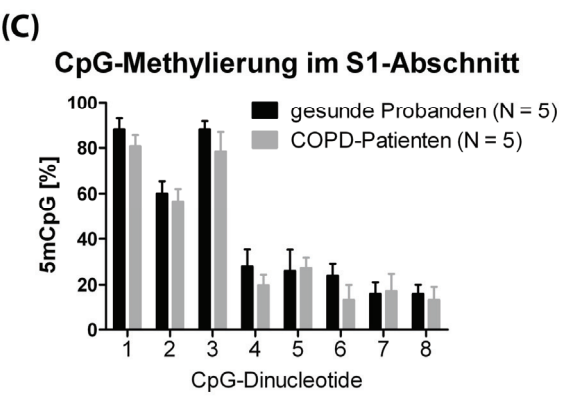
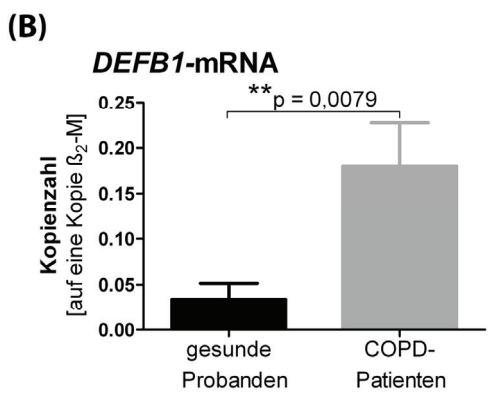
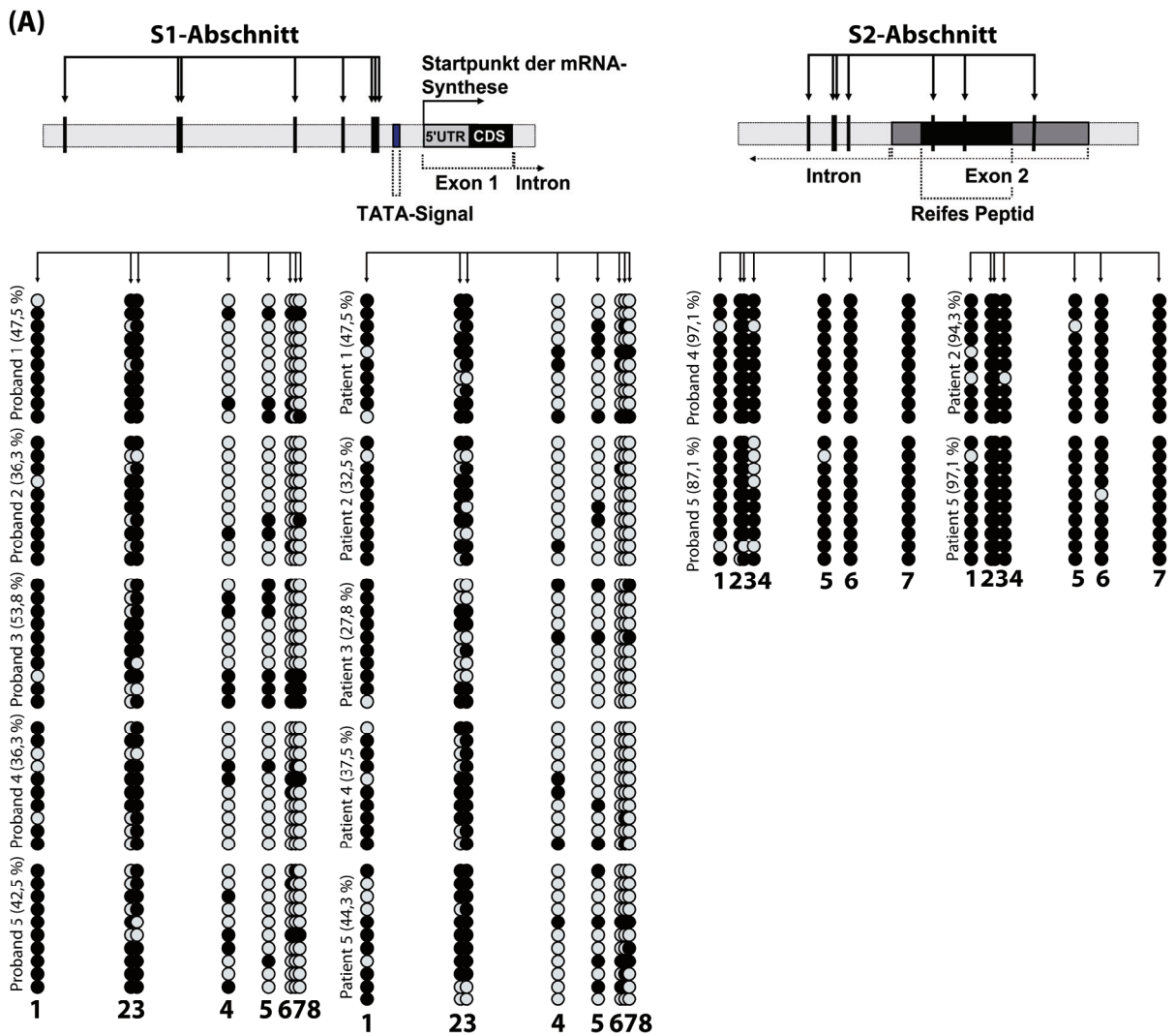


Abbildung 3-13 Analyse der CpG-Methylierung im *DEFB1* nach Bisulfit-Behandlung im Biopsiematerial.

(A) Genomische DNA wurde aus Biopsiematerial von fünf COPD-Patienten und fünf gesunden Probanden isoliert, einer Bisulfit-Behandlung unterzogen und mittels PCR amplifiziert. Einzelne PCR-Produkte wurden kloniert und der Methylierungsstatus mittels Sequenzierung bestimmt. Hierbei wurden für jeden Probanden bzw. Patienten mindestens 10 Klone analysiert. Die Lage der CpG-Dinucleotide ist durch Pfeile gekennzeichnet; graue Kreise stehen für unmethylierte, schwarze für methylierte CpG-Dinucleotide. (B) *DEFB1* mRNA-Expression und (C) CpG-Methylierungsprofil im S1-Abschnitt von *DEFB1*. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests bzw. 2way-ANOVA mit *Bonferroni*-Posttest analysiert, $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Die Sequenzanalysen im S1-Bereich wurden mit dem Biopsiematerial von insgesamt fünf COPD-Patienten sowie fünf gesunden Probanden durchgeführt. Die CpG-Dinucleotide im S2-Bereich wurden anhand von zwei Patienten und zwei gesunden Probanden analysiert. Die Sequenzanalyse nach der Bisulfit-Behandlung zeigte, dass der S2-Bereich in einer stark methylierten Form sowohl bei COPD-Patienten (mittlerer Methylierungsgrad 95,7 %) als auch bei gesunden Probanden (92,1 %) vorliegt. Demgegenüber konnten im S1-Abschnitt zwei unterschiedliche Bereiche definiert werden: ein weniger methylierter proximaler Bereich in unmittelbarer Nähe zum Startpunkt der RNA-Synthese sowie ein distaler Bereich, der eine stärkere Methylierung aufweist (Abbildung 3-13 A). Der Vergleich der Methylierung der einzelnen CpG-Dinucleotide offenbarte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen COPD-Patienten und gesunden Probanden im gesamten S1-Abschnitt (Abbildung 3-13 C). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und der CpG-Methylierung im Biopsiematerial nachgewiesen werden, weder im S1- noch im S2-Abschnitt von *DEFB1* (Daten nicht gezeigt).

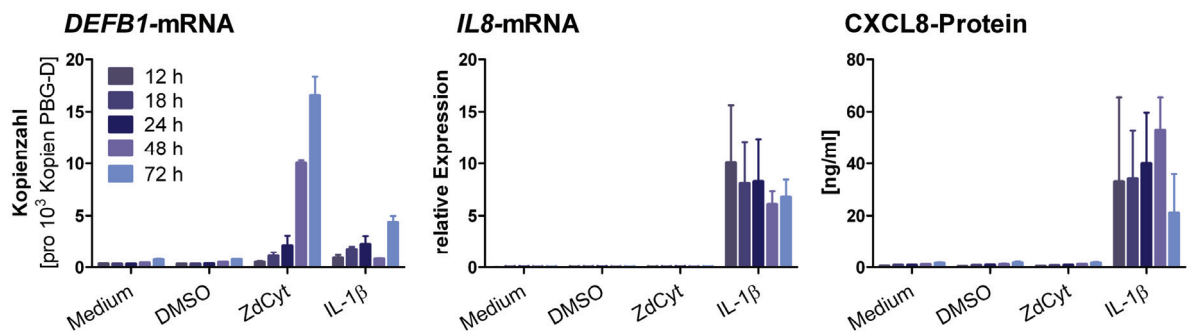
3.4.2 Effekte von 5-Aza-2'-desoxycytidin auf *DEFB1*

Der Einsatz spezifischer Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen (DMTs) wie beispielsweise 5-Aza-2'-desoxycytidin (ZdCyt) bietet eine weitere Möglichkeit, um den Einfluss der DNA-Methylierung auf die *DEFB1*-Expression zu untersuchen. ZdCyt ist chemisch mit dem Cytosin verwandt und wird von DMTs ebenfalls als Substrat erkannt. Dies führt zu einer Hemmung der Enzym-Aktivität und schließlich zum Verlust der DNA-Methylierung¹⁷⁷.

3.4.2.1 Effekte von ZdCyt auf die mRNA-Expression von *DEFB1* im Zellkulturmodell

Basierend auf der Hypothese, dass die Hemmung der DMTs durch ZdCyt einen Effekt auf die mRNA-Expression von *DEFB1* hat, wurden zwei humane Epithel-Zelllinien A549 (Lungenepithel) und NCI-H727 (Bronchialepithel) mit dem DMT-Inhibitor ZdCyt behandelt (Abbildung 3-14).

(A) A549-Zellen



(B) NCI-H727-Zellen

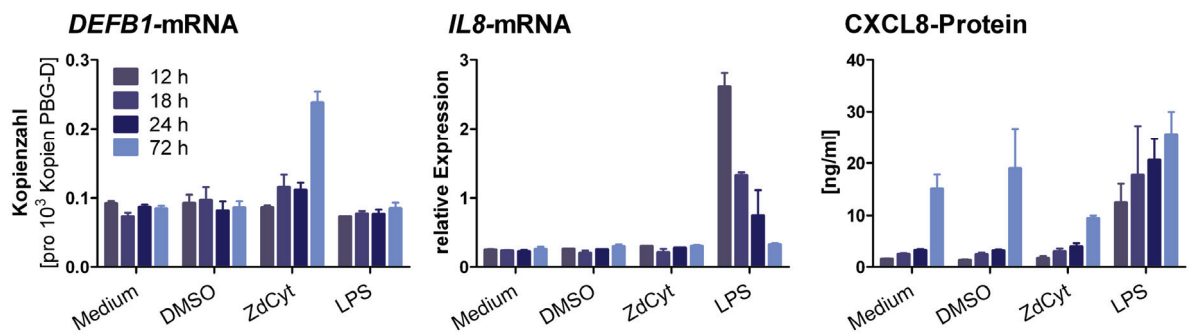


Abbildung 3-14 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* nach ZnCyt-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.

(A) A549- und (B) NCI-H727-Zellen wurden mit 5 μM ZnCyt, 1 ng/ml IL-1β (A549) bzw. 100 ng/ml LPS (NCI-H727) über 12 bis 72 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit entsprechendem Volumen Medium oder DMSO versetzt. Die mRNA-Expression von *DEFB1*, *IL8* und *PBG-D* als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) wurde mittels quantitativer *Real-time-PCR* bestimmt. Die CXCL8-Freisetzung wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von zwei bis vier unabhängigen Experimenten.

Unter der Voraussetzung, dass ZnCyt zellzyklus-spezifisch (S-Phase-spezifisch) wirkt¹⁷⁷ und dass die Zellen eine mittlere Teilungsrate von 22 (A549) bzw. 48 h (NCI-H727) besitzen, wurde der Einfluss des Inhibitors in einem Zeitraum von 12 bis 72 h untersucht. Die Vergleichsansätze wurden mit entsprechendem Volumen Medium oder DMSO behandelt. Zur Kontrolle der Zellaktivierung wurden das Cytokin IL-1β (A549-Zellen) und LPS (NCI-H727-Zellen) verwendet. Als Aktivierungsmarker dienten dabei die Messungen der *IL8*-mRNA-Expression und die Freisetzung von CXCL8 nach der Behandlung der Zellen.

Wie in der Abbildung 3-14 dargestellt, konnte eine Aktivierung der Zellen durch Behandlung mit IL-1β (A549) und LPS (NCI-H727) erreicht werden. Diese zeigte sich in einer induzierten *IL8*-mRNA-Expression sowie der Freisetzung von CXCL8. Die Behandlung mit dem DMT-Inhibitor ZnCyt hatte dagegen weder in A549- noch in NCI-H727-Zellen einen Effekt auf *IL8*-mRNA-Expression und CXCL8-Freisetzung. Im Hinblick auf *DEFB1* führte die Behandlung der A549-Zellen mit ZnCyt bereits nach 24 h zu einer Induktion der *DEFB1*-mRNA-Expression, welche zum Zeitpunkt 72 h in dieser Kinetik das Maximum erreichte. In NCI-H727-Zellen dagegen konnte ein Anstieg der mRNA erst nach 72 h der Behandlung

verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu hatten die Behandlungen der A549-Zellen mit IL-1 β einen geringen bzw. der NCI-H727-Zellen mit LPS gar keinen Effekt auf die *DEFB1*-mRNA-Expression.

Die erhaltenen Ergebnisse weisen somit auf eine Rolle der DNA-Methylierung in der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* hin.

3.4.2.2 Effekte von ZdCyt auf die CpG-Methylierung im *DEFB1* im Zellkulturmodell

Aufbauend auf der Erkenntnis, dass im vorliegenden Zellkulturmodell die Genexpression von *DEFB1* unter Behandlung mit dem DMT-Inhibitor ZdCyt ansteigt, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt mit einer Veränderung der CpG-Methylierung im *DEFB1* assoziiert ist. Generell setzt der Wirkmechanismus von ZdCyt eine Inkorporation in die DNA voraus, wobei die Expositionsdauer des Inhibitors eine essenzielle Rolle spielt. Im Hinblick auf die kurze Halbwertszeit des Inhibitors von nur 12 h wurde die Arbeitskonzentration von ZdCyt für die folgenden Experimente überprüft und weiter optimiert. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von ZdCyt behandelt und der Effekt des Inhibitors auf die mRNA-Expression von *DEFB1* nach 24, 48 und 72 h untersucht (Abbildung 3-15).

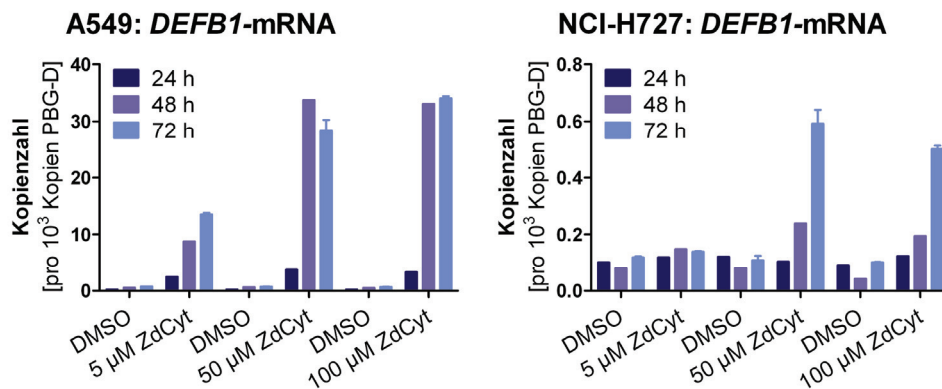


Abbildung 3-15 Konzentrationsabhängigkeit der *DEFB1*-mRNA-Expression von ZdCyt.

A549- und NCI-H727-Zellen wurden mit Konzentrationen von 5 µM, 50 µM und 100 µM ZdCyt über 24, 48 und 72 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit entsprechendem Volumen DMSO versetzt. Die mRNA-Expression von *DEFB1* und *PBG-D* als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Abbildung 3-14 führte die Behandlung der A549-Zellen bereits mit 5 µM ZdCyt zu einem deutlichen zeitabhängigen Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression. Die Behandlungen mit Konzentrationen von 50 und 100 µM ZdCyt führten zu einer noch stärkeren Induktion der mRNA-Expression. Dabei war bereits nach 24 h jeweils ein Anstieg der Expression zu verzeichnen. Sie erreichte dann nach 48 h das

Maximum und blieb bis zum Zeitpunkt 72 h nahezu unverändert. In NCI-H727-Zellen dagegen konnte in diesen Experimenten unter Verwendung von 5 μM ZdCyt kein Effekt auf die *DEFB1*-mRNA-Expression beobachtet werden. Höhere Konzentrationen waren jedoch in der Lage, die *DEFB1*-mRNA-Expression nach 48 h zu induzieren. Das Maximum der Induktion war allerdings erst nach 72 h zu verzeichnen (Abbildung 3-15). In beiden Zelllinien hatten 50 μM und 100 μM ZdCyt einen ähnlichen Effekt auf die *DEFB1*-mRNA-Expression. Angesichts einer möglichen zytotoxischen Wirkung des Inhibitors wurde in den weiteren Experimenten mit einer Konzentration von 50 μM ZdCyt über 72 h gearbeitet.

Zur Analyse der CpG-Methylierung im Gen für *DEFB1* nach Behandlung mit ZdCyt wurden Sequenzanalysen genomischer DNA von A549- und NCI-H727-Zellen mittels einer Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde ein 873 bp großer Sequenzabschnitt gewählt, der insgesamt 15 CpG-Dinucleotide im hypothetischen Promotor, Exon 1 und dem angrenzenden Intronbereich von *DEFB1* enthält (inklusive der acht CpG-Dinucleotide, welche bereits im Abschnitt 3.4.1.2 diskutiert wurden). Die Positionen der einzelnen CpG-Dinucleotide im untersuchten Abschnitt von *DEFB1* sind in der Abbildung 3-16 (A) schematisch dargestellt.

Um den Effekt des Inhibitors zu überprüfen, wurden parallel Zellkulturansätze zur Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression mitgeführt (Abbildung 3-16 B). Dabei konnte sowohl in A549- als auch in NCI-H727-Zellen nach der ZdCyt-Behandlung eine deutliche Induktion der *DEFB1*-mRNA-Expression verzeichnet werden. Gleichzeitig konnte unter der ZdCyt-Behandlung eine leichte Abnahme der CpG-Methylierung im gesamten untersuchten Sequenzabschnitt von *DEFB1* detektiert werden: Der Methylierungsgrad von *DEFB1* erniedrigte sich von 20 auf 15,3 % in A549-Zellen sowie von 12,7 auf 9,7 % in NCI-H727-Zellen (Abbildung 3-16 C).

In beiden Zelllinien zeigte die Methylierungsfrequenz innerhalb des untersuchten Sequenzabschnitts jedoch eine sehr hohe Variabilität. So wurde das Gen in keiner der untersuchten CpG-Positionen in allen Fällen als methyliert vorgefunden. Dieses traf sowohl für die unbehandelten als auch für die ZdCyt-behandelten Zellen zu. So erschien beispielsweise das CpG-Dinucleotid in der Position 2 der unbehandelten A549-Zellen weitgehend demethyliert; die ZdCyt-Behandlung führte dann zu einer punktuellen Methylierung in dieser Position. Die NCI-H727-Zellen zeigten dagegen eine stärkere CpG-Methylierung in den Positionen 2 und 3, die nach der ZdCyt-Behandlung stark zurückging (Abbildung 3-16 C). Zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und der CpG-Methylierung war damit im untersuchten Sequenzabschnitt kein Zusammenhang erkennbar.

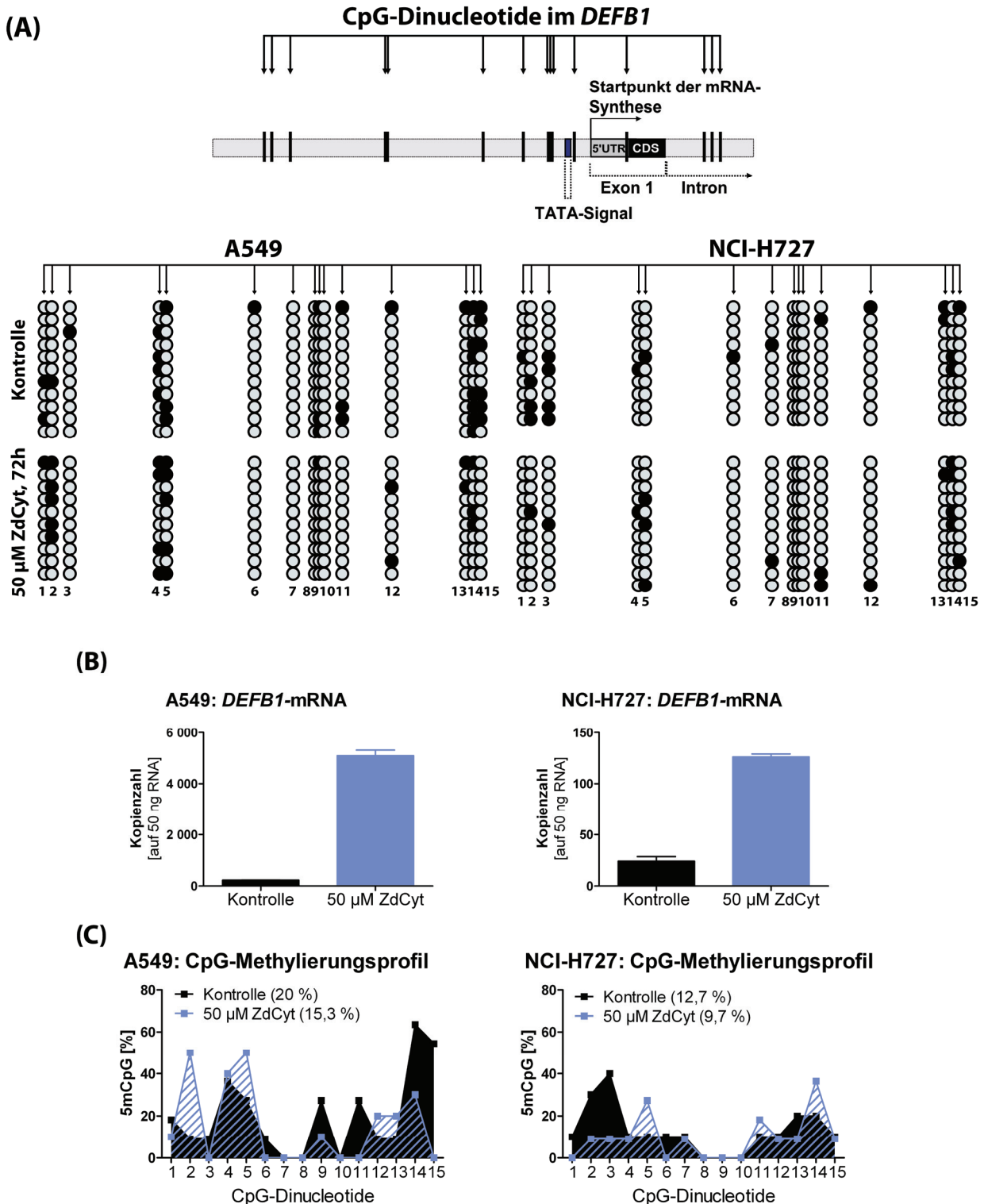


Abbildung 3-16 Analyse der CpG-Methylierung von *DEFB1* nach ZdCyt-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.

(A) A549- und NCI-H727-Zellen wurden mit 50 μ M ZdCyt für 72 h behandelt. Genomische DNA wurde isoliert, einer Bisulfit-Behandlung unterzogen und mittels PCR amplifiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Einzelne PCR-Produkte wurden kloniert und der Methylierungsstatus mittels Sequenzierung bestimmt. Hierbei wurden mindestens 10 Klone analysiert. Die Lage der CpG-Dinucleotide ist durch Pfeile gekennzeichnet; graue Kreise stehen für unmethylierte CpG-Dinucleotide, schwarze für methylierte. **(B)** *DEFB1*-mRNA-Expression und **(C)** CpG-Methylierungsprofil. In Klammern ist der Prozentwert der CpG-Methylierung über den gesamten Sequenzbereich angegeben.

3.4.3 Effekte von Trichostatin A auf *DEFB1*

In der Pathogenese der COPD spielen Histon-Deacetylasen (HDACs) offenbar eine wichtige Rolle. Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass sowohl die Expression als auch die Aktivität einiger HDACs im Lungengewebe bei der COPD beeinträchtigt ist^{12,13,166}. Der Einsatz spezifischer HDAC-Inhibitoren bietet dabei eine Möglichkeit, die Rolle von HDACs in der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* zu untersuchen. Trichostatin A (TSA) stellt einen potenten Inhibitor der HDAC-Klassen I und II dar und führt durch die Hemmung ihrer Aktivität zu einer Akkumulierung der Acetylierung von Histonen und anderen Ziel-Proteinen¹⁷⁸.

3.4.3.1 Effekte von TSA auf die mRNA-Expression von *DEFB1* im Zellkulturmodell

Um zu überprüfen, ob die Hemmung der HDACs durch TSA einen Effekt auf die mRNA-Expression von *DEFB1* hat, wurden die beiden humanen Epithel-Zelllinien A549 und NCI-H727 mit dem Inhibitor behandelt. Der Effekt von TSA auf die mRNA-Expression von *DEFB1* wurde in einem Zeitraum von 12 bis 72 h untersucht. Die Kontrolle der Zellaktivierung wurde ebenfalls (vgl. Abschnitt 3.4.2.1) anhand der Messungen der *IL8*-mRNA-Expression sowie der CXCL8-Freisetzung nach den Behandlungen mit IL-1 β (A549-Zellen) und LPS (NCI-H727-Zellen) durchgeführt (Abbildung 3-17).

Wie in der Abbildung 3-17 dargestellt, konnte eine Aktivierung der Zellen durch Behandlung mit IL-1 β (A549) und LPS (NCI-H727) erreicht werden. Diese zeigte sich in einer induzierten *IL8*-mRNA-Expression sowie einer Freisetzung von CXCL8. Dagegen hatten die Behandlungen mit TSA weder in A549 noch in NCI-H727 einen Effekt auf *IL8*-Expression bzw. CXCL8-Freisetzung.

Im Hinblick auf *DEFB1* konnte dagegen unter TSA-Behandlung sowohl in A549- als auch in NCI-H727-Zellen bereits nach 12 h eine deutliche Induktion der *DEFB1*-mRNA-Expression detektiert werden. Nach 24 h war ein weiterer Anstieg der mRNA-Expression zu verzeichnen, der in der vorliegenden Kinetik das Maximum der Induktion darstellte. Nach 72-stündiger Behandlung erreichte die *DEFB1*-mRNA-Expression in beiden Zelllinien wieder annähernd das Kontrollniveau (Abbildung 3-17).

Die erhaltenen Ergebnisse weisen somit auf eine Rolle der HDACs in der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* hin.

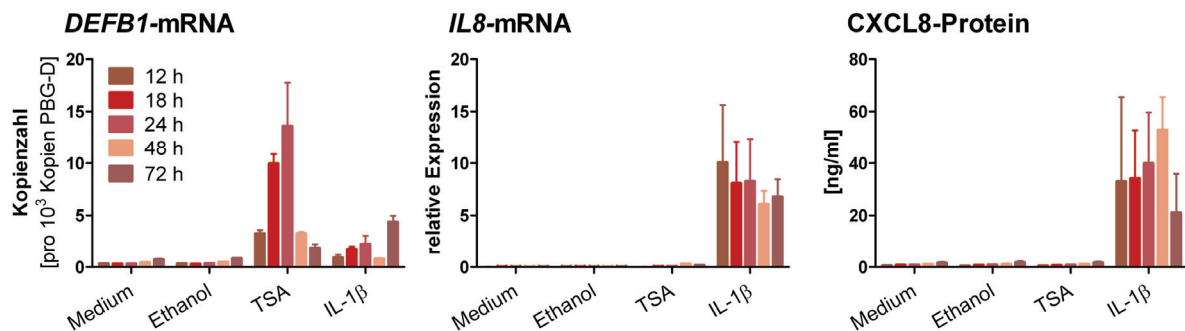
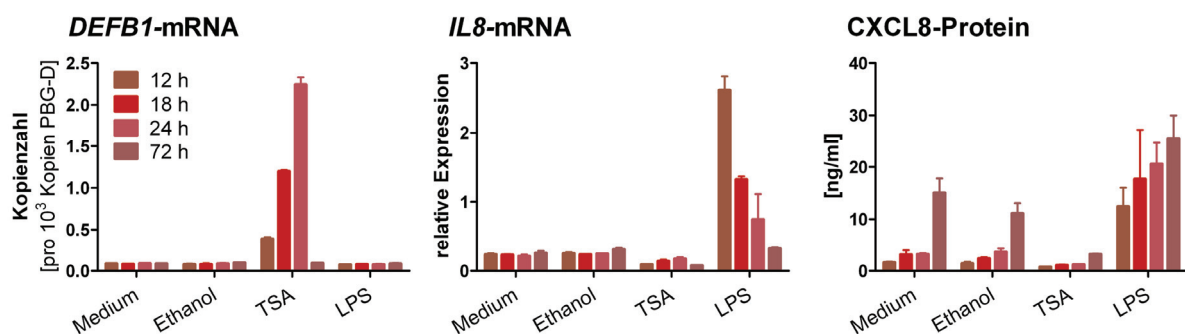
(A) A549-Zellen**(B) NCI-H727-Zellen**

Abbildung 3-17 Analyse der mRNA-Expression von *DEFB1* nach TSA-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.

(A) A549- und (B) NCI-H727-Zellen wurden mit 400 μ M TSA, 1 ng/ml IL-1 β (A549) bzw. 100 ng/ml LPS (NCI-H727) über 12 bis 72 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit entsprechendem Volumen Medium oder Ethanol versetzt. Die mRNA-Expression von *DEFB1*, *IL8* und *PBG-D* als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) wurde mittels quantitativer *Real-time-PCR* bestimmt. Die CXCL8-Freisetzung wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von zwei bis vier unabhängigen Experimenten.

3.4.3.2 Effekte von TSA auf die CpG-Methylierung im *DEFB1* im Zellkulturmodell

Wie bereits erwähnt, vermittelt der Inhibitor TSA seinen Effekt durch die Hemmung der Aktivität von HDACs. Um die Frage nach einer möglichen Assoziation zwischen der Induktion von der *DEFB1*-mRNA-Expression durch die Behandlung mit TSA und der CpG-Methylierung zu beantworten, wurde das Muster der CpG-Methylierung im Gen für *DEFB1* nach der TSA-Behandlung ermittelt. Für diese Untersuchungen wurden die beiden humanen Epithel-Zelllinien A549 und NCI-H727 mit 400 nM TSA über 24 h behandelt. Anschließend wurde das Methylierungsmuster der einzelnen CpG-Dinucleotide im gleichen Sequenzabschnitt, wie bereits im Abschnitt 3.4.2.2 beschrieben, analysiert. Die Positionen der einzelnen CpG-Dinucleotide im untersuchten Abschnitt von *DEFB1* sind in der Abbildung 3-18 (A) schematisch dargestellt.

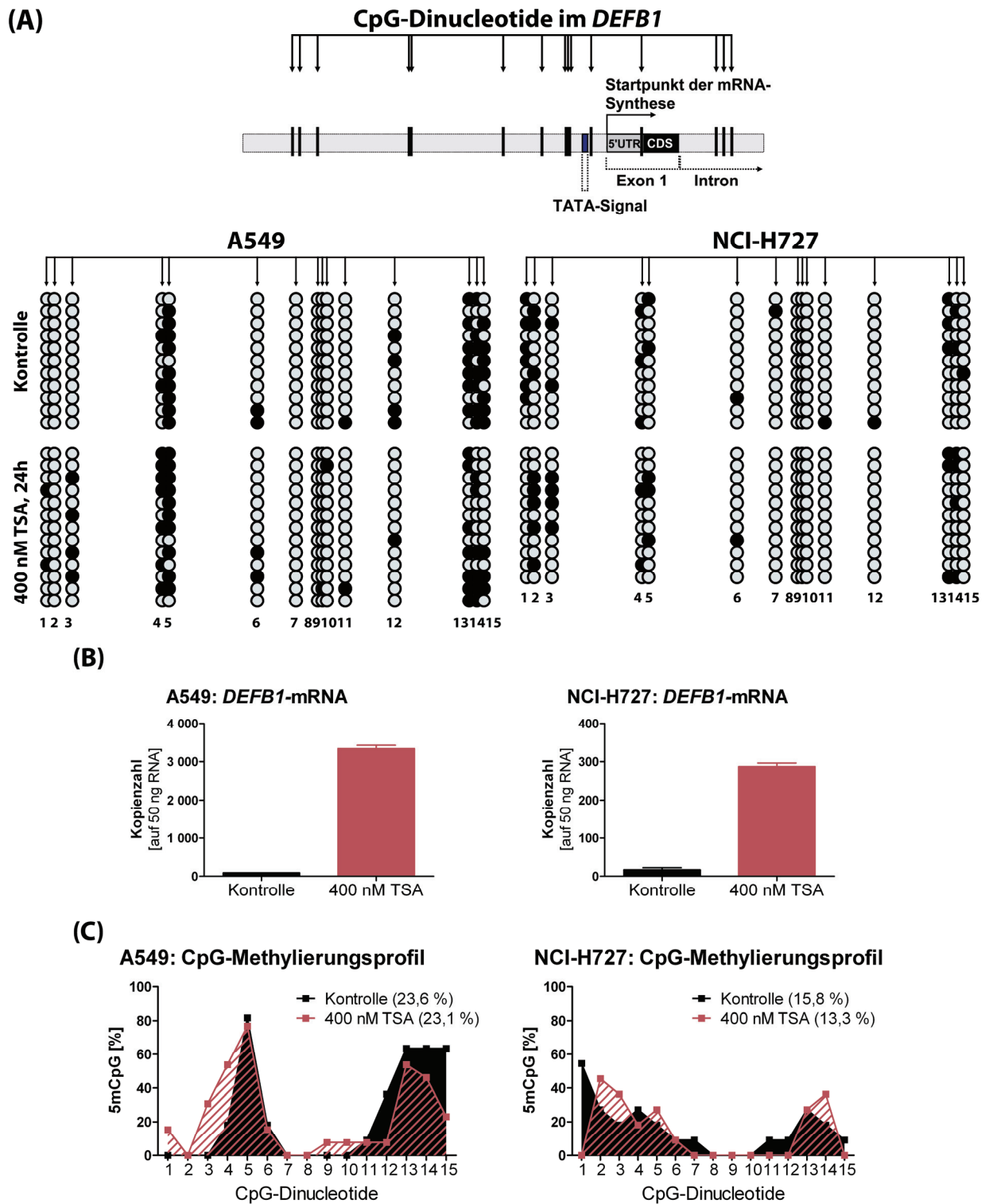


Abbildung 3-18 Analyse der CpG-Methylierung von *DEFB1* nach TSA-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.

(A) A549- und NCI-H727-Zellen wurden mit 400 μ M TSA für 24 h behandelt. Genomische DNA wurde isoliert, einer Bisulfit-Behandlung unterzogen und mittels PCR amplifiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Einzelne PCR-Produkte wurden kloniert und der Methylierungsstatus mittels Sequenzierung bestimmt. Hierbei wurden mindestens 10 Klone analysiert. Die Lage der CpG-Dinucleotide ist durch Pfeile gekennzeichnet; graue Kreise stehen für unmethylierte CpG-Dinucleotide, schwarze für methylierte. (B) *DEFB1*-mRNA-Expression und (C) CpG-Methylierungsprofil. In Klammern ist der Prozentwert der CpG-Methylierung über den gesamten Sequenzbereich angegeben.

Um den Effekt des Inhibitors zu überprüfen, wurden auch hier parallel Zellkulturansätze zur Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression mitgeführt (Abbildung 3-18 B). Auch hier führten die Behandlungen der Zellen mit TSA zu einer deutlichen Induktion der *DEFB1*-mRNA-Expression in beiden Zelllinien. Dagegen konnten keine Unterschiede in der CpG-Methylierung unter TSA-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 3-18 C). So blieb der Methylierungsgrad der unbehandelten A549-Zellen (23,6 %) im Vergleich zu jenem der behandelten Zellen (23,1 %) nahezu unverändert. In NCI-H727-Zellen konnte dagegen ein geringer Rückgang von 15,8 auf 13,3 % detektiert werden. Insgesamt konnte allerdings eine sehr hohe Variabilität der Methylierung in beiden Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 3-18 A). Zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und der CpG-Methylierung im untersuchten Sequenzabschnitt war damit kein Zusammenhang erkennbar.

3.4.4 Analyse der kovalenten Histon-Modifikationen im *DEFB1*

Im Allgemeinen erfüllt die CpG-Methylierung eine bedeutende Funktion bei der epigenetischen Genregulation, dient aber häufig auch als Einrichtung zur Verstärkung weiterer Mechanismen bei der Kontrolle der Genexpression. Einer dieser Mechanismen beruht auf der Möglichkeit, die N-terminalen Regionen der Histone vielfältig kovalent zu modifizieren, und stellt einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus bei der Kontrolle der Transkription und der transkriptionsabhängigen zellulären Prozesse dar¹⁵¹.

3.4.4.1 Analyse der Histon-Acetylierung von *DEFB1* nach Behandlungen mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen

Aufbauend auf der Erkenntnis, dass im vorliegenden Zellkulturmodell die mRNA-Expression von *DEFB1* unter Behandlung mit ZdCyt und TSA ansteigt, wurde das Muster der Histon-Acetylierung in mehreren Bereichen des *DEFB1*-Gens mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) untersucht. Diese Methode basiert auf der Erkennung der kovalent modifizierten Regionen der Histone mittels spezifischer Antikörper und erlaubt eine quantitative Analyse dieser Modifikationen in definierten Bereichen des Chromatins. Für die ChIP-Analysen wurden NCI-H727-Zellen mit ZdCyt für 72 h sowie mit TSA für 24 h behandelt und anschließend sowohl die Gesamt-Acetylierung des Histons H3 (H3-Acetyl) als auch dessen Acetylierung am Lysin-9 (H3K9-Acetyl) und Lysin-14 (H3K14-Acetyl) analysiert (Abbildung 3-19). Die Kontrollansätze wurden anstelle von Inhibitoren mit entsprechendem Volumen des Lösungsmittels (DMSO oder Ethanol) versetzt. Um den Effekt der Inhibitoren zu überprüfen, wurden parallel Zellkulturansätze zur Analyse der *DEFB1*-mRNA-Expression mitgeführt. Dabei konnte sowohl unter ZdCyt- als auch unter TSA-Behandlung eine Induktion der *DEFB1*-mRNA-Expression verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

Für die Analyse der Chromatinstruktur wurden mehrere Sequenzabschnitte innerhalb des Gens für *DEFB1* gewählt. Diese sind in der Abbildung 3-19 schematisch dargestellt. Im Einzelnen handelt es sich dabei um:

- Abschnitte I, II, III und IV stromaufwärts vom Startpunkt der RNA-Synthese innerhalb des hypothetischen Promotorbereiches,
- Abschnitt V (inklusive der TATA-Box und der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR)),
- Abschnitt VI in der kodierenden Region des Exons 1 und dem angrenzenden Intronbereich,
- Abschnitt VII innerhalb des Introns sowie
- Abschnitt VIII im Exon 2 von *DEFB1*.

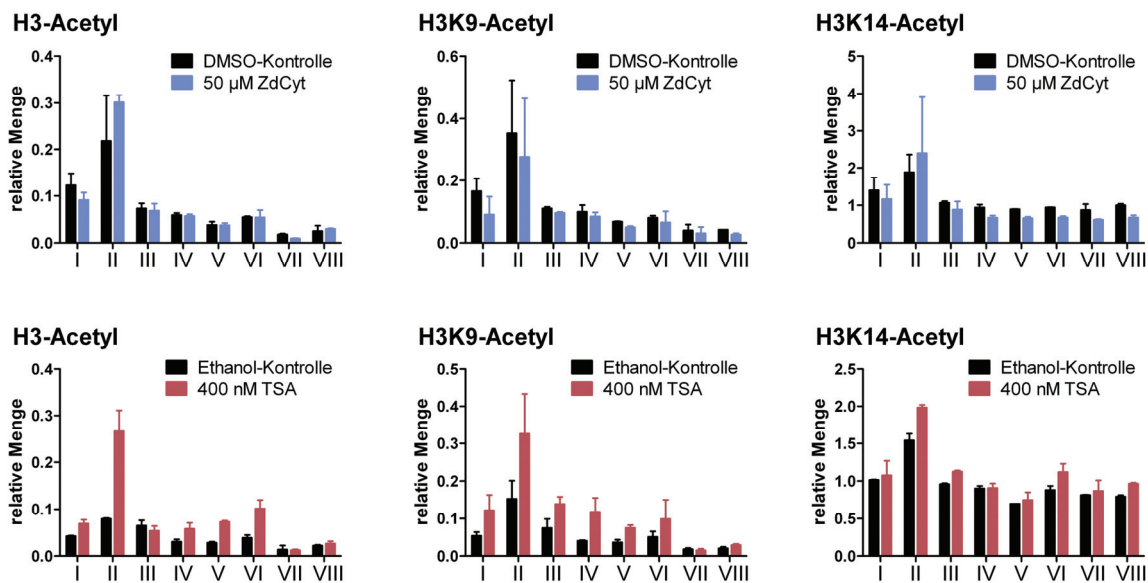
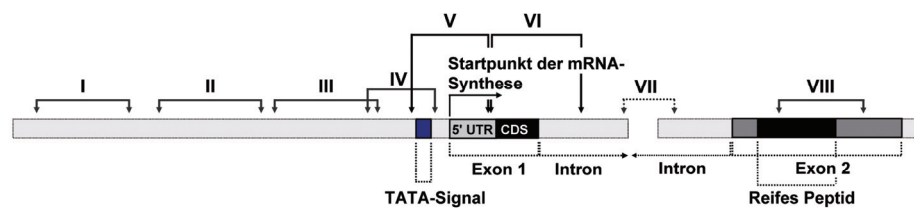


Abbildung 3-19 Analyse der Histon-Acetylierung von *DEFB1* nach Behandlung mit Zdcyt und TSA in NCI-H727-Zellen.

NCI-H727-Zellen wurden mit 50 µM Zdcyt für 72 h bzw. mit 400 nM TSA für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3-Acetyl, H3K9-Acetyl und H3K14-Acetyl immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *GAPDH* normalisiert und sind als Mittelwert ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Es konnte ein unterschiedlicher Einfluss der Inhibitoren auf die Histon-Acetylierung festgestellt werden (Abbildung 3-19). So konnten unter Behandlung der Zellen mit ZidCyt keine Änderungen in den Histon-Acetylierungen detektiert werden. In allen untersuchten Abschnitten von *DEFB1* waren sowohl die Gesamt-Acetylierung des Histons H3 (H3-Acetyl) als auch dessen Acetylierung am Lysin-9 (H3K9-Acetyl) und Lysin-14 (H3K14-Acetyl) auf dem Niveau der DMSO-Kontrolle. Dagegen führte die Behandlung der Zellen mit TSA zu einer deutlichen Zunahme der Acetylierung in allen Abschnitten von *DEFB1*. Insbesondere konnte ein sehr deutlicher Anstieg von H3-Acetyl in den Abschnitten II, V und VI sowie H3K9-Acetyl in den Abschnitten I, II, und IV detektiert werden. In den Abschnitten I, III-IV (H3-Acetyl) bzw. III, V-VI (H3K9-Acetyl) war die Zunahme der Acetylierung dagegen jeweils weniger stark ausgeprägt. In den Abschnitten VII und VIII konnte weder für H3-Acetyl noch H3K9-Acetyl eine Änderung detektiert werden. Im Hinblick auf H3K14-Acetyl konnte nur in den Abschnitten II und IV ein geringer Anstieg der Acetylierung unter TSA-Behandlung festgestellt werden, in den anderen Abschnitten veränderte sich der Acetylierungsgrad dagegen nicht.

3.4.4.2 Korrelation zwischen Histon-Acetylierung und der mRNA-Expression von *DEFB1* in Zellen der BAL-Flüssigkeit

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Histon-Acetylierung und der mRNA-Expression von *DEFB1* auch in primärem Material besteht. Hierfür wurden die Modifikationen H3-Acetyl und H3K9-Acetyl mit der Expression der *DEFB1*-mRNA in den Zellen der BAL-Flüssigkeit korreliert. Diese Untersuchungen konnten mit dem Material von insgesamt fünf (H3-Acetyl) bzw. zehn (H3K9-Acetyl) Studienteilnehmern durchgeführt werden (Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21).

Wie der Abbildung 3-20 zu entnehmen ist, konnte eine hoch signifikante Korrelation zwischen der *DEFB1*-mRNA-Expression und der Gesamt-Acetylierung des Histons H3 im Abschnitt VII ($p < 0,0001$) verzeichnet werden. Auch im Abschnitt VI konnte eine starke Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und H3-Acetyl nachgewiesen werden ($p = 0,0187$). In den Abschnitten I-V und VIII war dagegen keine signifikante Korrelation nachweisbar.

Im Hinblick auf die Acetylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9-Acetyl) war in keinem der untersuchten Genabschnitte von *DEFB1* eine signifikante Korrelation mit der *DEFB1*-mRNA-Expression nachweisbar (Abbildung 3-21).

Die erhaltenen Ergebnisse belegen eine Korrelation zwischen der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* und der Gesamt-Acetylierung des Histons H3, nicht aber dessen Acetylierung am Lysin-9.

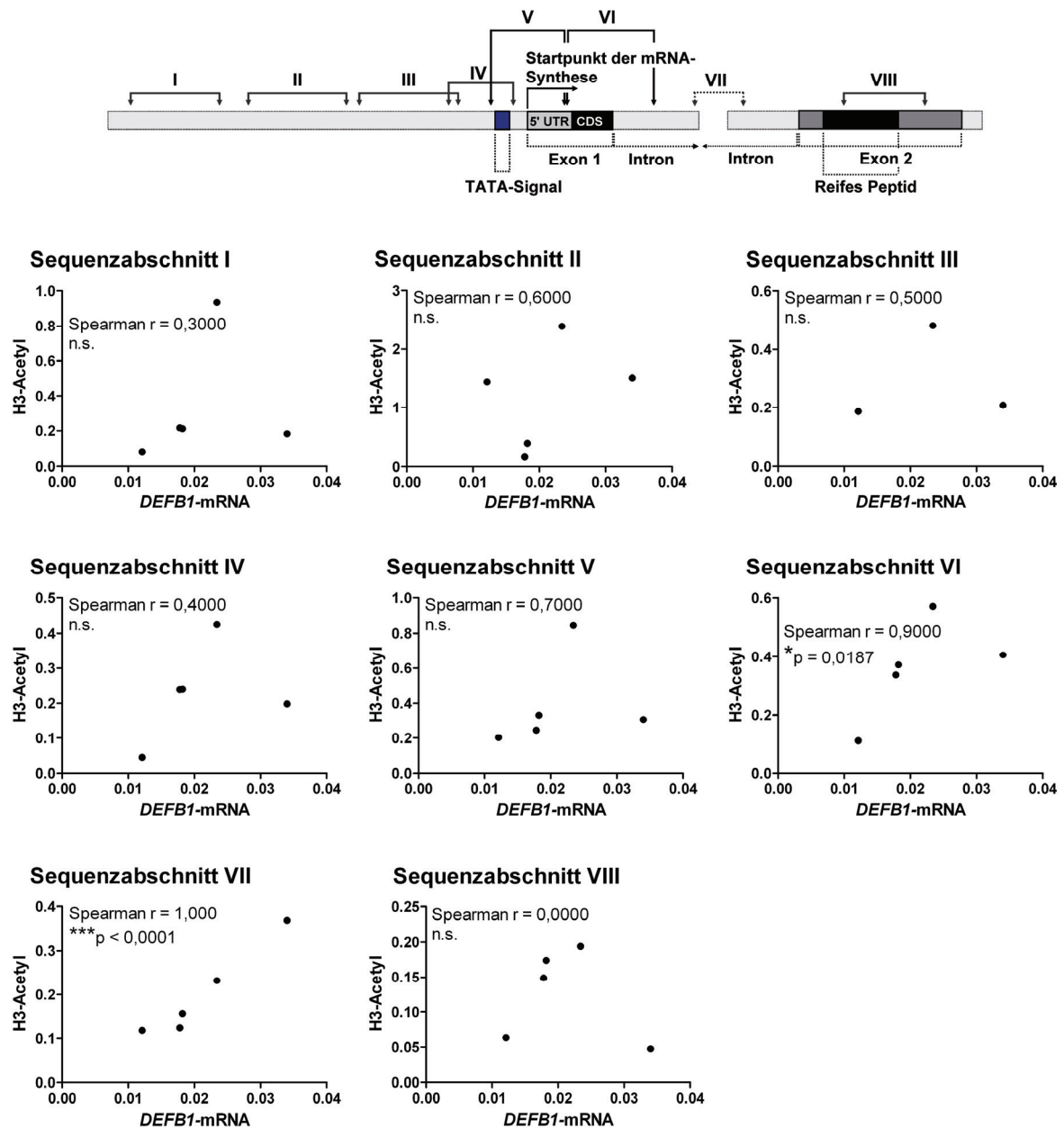


Abbildung 3-20 Analyse von H3-Acetyl in Abhängigkeit von der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.

Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3-Acetyl immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *Histon H4* normalisiert. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -M dargestellt. Die Korrelationsanalyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r, Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

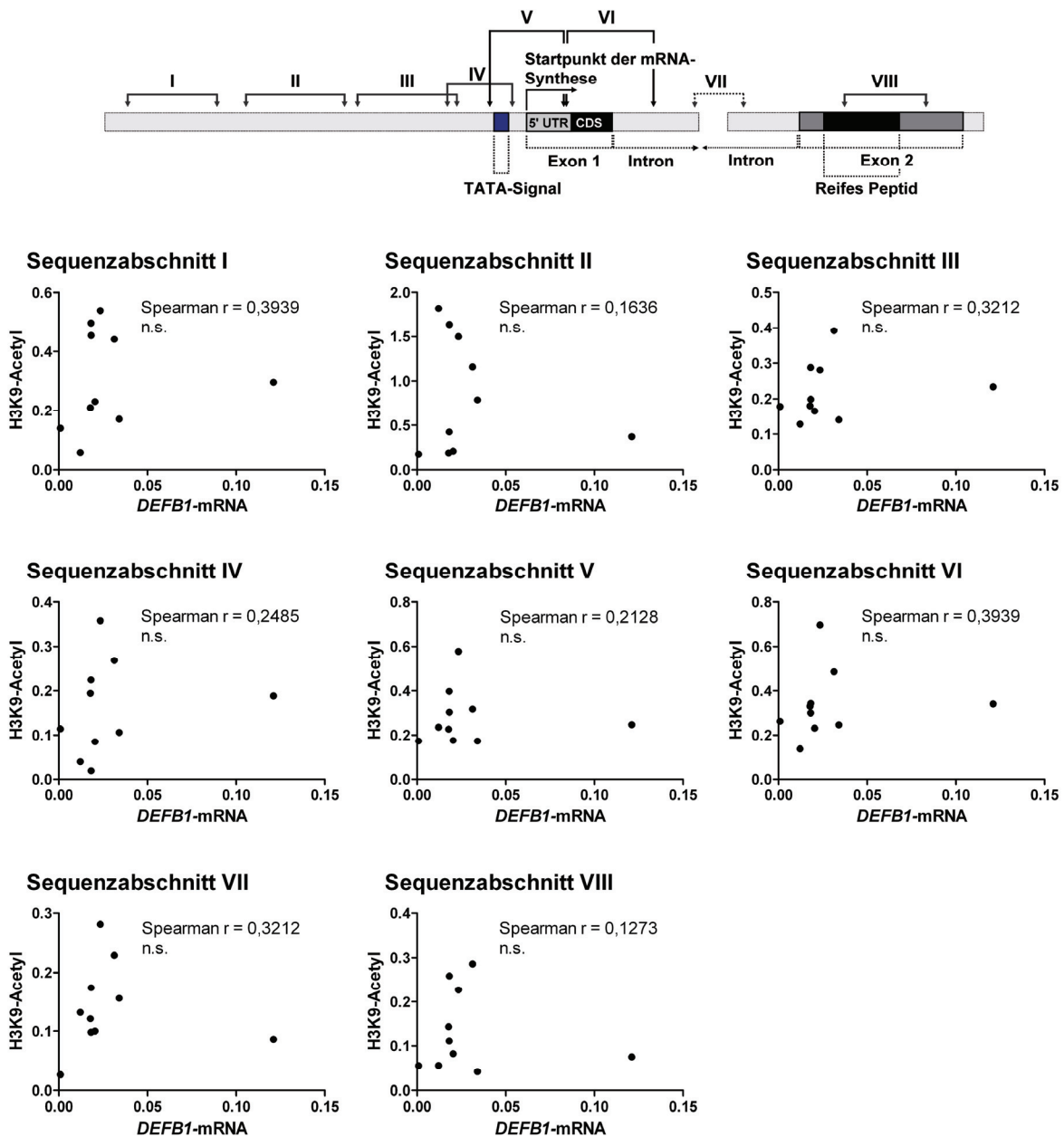


Abbildung 3-21 Analyse von H3K9-Acetyl in Abhängigkeit von der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.

Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3K9-Acetyl immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *Histon H4* normalisiert. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -M dargestellt. Die Korrelationsanalyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r , Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

3.4.4.3 Analyse der Histon-Methylierung von *DEFB1* nach Behandlungen mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen

Ebenso wie die Acetylierung ist die Methylierung von Histonen ein wichtiger Faktor in der epigenetischen Genregulation¹⁵⁰. Im Zusammenhang mit den obigen Untersuchungen (vgl. Abschnitt 3.4.4.1) wurde der Effekt von ZdCyt und TSA auf die Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-4 (H3K4me₃) sowie die Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9me₃) im Gen für *DEFB1* untersucht. Hierfür wurden NCI-H727-Zellen mit ZdCyt für 72 h und TSA für 24 h behandelt und das Muster der Histon-Methylierungen mittels ChIP untersucht (Abbildung 3-22).

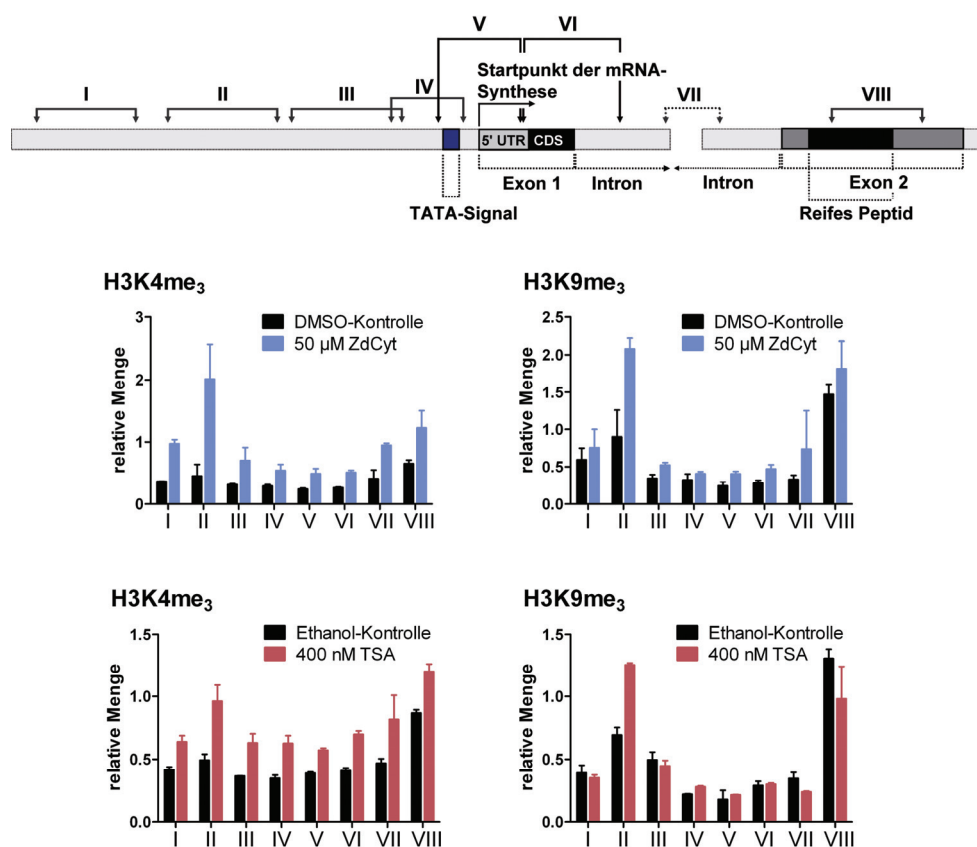


Abbildung 3-22 Analyse der Histon-Methylierung von *DEFB1* nach Behandlung mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen.

NCI-H727-Zellen wurden mit 50 µM ZdCyt für 72 h bzw. mit 400 nM TSA für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3K4me₃ und H3K9me₃ immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *GAPDH* normalisiert und sind als Mittelwert ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Wie der Abbildung 3-22 zu entnehmen ist, führte die Behandlung der Zellen sowohl mit ZdCyt als auch mit TSA zu einem Anstieg der Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-4

(H3K4me₃). Dabei konnte die Zunahme von H3K4me₃ in allen untersuchten Genabschnitten von *DEFB1*, insbesondere aber in den Abschnitten I und II nach der ZdCyt-Behandlung bzw. im Abschnitt II nach der TSA-Behandlung detektiert werden. Auch im Hinblick auf die Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9me₃) führten die Behandlungen der Zellen mit beiden Inhibitoren zu einem Anstieg von H3K9me₃ im Abschnitt II. Dagegen konnten in den Abschnitten I, III-VI keine Änderungen von H3K9me₃ detektiert werden.

3.4.4.4 Korrelation zwischen Histon-Methylierung und der mRNA-Expression von *DEFB1* in Zellen der BAL-Flüssigkeit

Basierend auf den bereits dargestellten Daten wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Histon-Methylierung und der mRNA-Expression von *DEFB1* auch in Zellen der BAL-Flüssigkeit besteht. Hierfür wurden (i) eine Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-4 (H3K4me₃; Abbildung 3-23), (ii) eine Di-Methylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9me₂; Abbildung 3-24), (iii) eine Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9me₃; Abbildung 3-25) sowie (iv) eine Tri-Methylierung des Histons H4 am Lysin-20 (H4K20me₃; Abbildung 3-26) analysiert. Für diese Untersuchungen konnte das Material von insgesamt elf (H3K4me₃ und H3K9me₃), zehn (H3K9me₂) bzw. neun (H4K20me₃) Studienteilnehmern verwendet und mittels ChIP analysiert werden.

Wie der Abbildung 3-23 zu entnehmen ist, konnte eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und der Methylierung des Histons H3 am Lysin-4 (H3K4me₃) in den Abschnitten I ($p = 0,001$), II ($p = 0,0194$), IV ($p = 0,0213$), V ($p = 0,0042$), VI ($p = 0,0008$) und VII ($p = 0,0213$) verzeichnet werden. Eine entsprechende Abhängigkeit war dagegen in den Abschnitten III und VI nicht nachweisbar.

In Hinblick auf die Di- und Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-9 (H3K9me₂ und H3K9me₃) konnte im Abschnitt VII jeweils eine signifikante Korrelation zwischen der *DEFB1*-mRNA-Expression und den beiden Histon-Modifikationen H3K9me₂ ($p = 0,0300$; Abbildung 3-24) und H3K9me₃ ($p = 0,0213$; Abbildung 3-25) nachgewiesen werden. In den Abschnitten I-VI sowie im Abschnitt VIII war dagegen keine signifikante Korrelation nachweisbar.

Bezüglich der Tri-Methylierung des Histons H4 am Lysin-20 (H4K20me₃; Abbildung 3-26) konnte ebenfalls nur im Abschnitt VII eine signifikante Korrelation ($p = 0,0249$) mit der *DEFB1*-mRNA-Expression verzeichnet werden. Auch hier war in den Abschnitten I-VI sowie im Abschnitt VIII keine signifikante Korrelation nachweisbar.

Die erhaltenen Ergebnisse belegen eine Korrelation zwischen der Histon-Methylierung und der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1*. Dabei konnte für definierte Genabschnitte von *DEFB1* ein bestimmtes Muster der Histon-Modifizierungen H3K4me₃, H3K9me₂ und H3K9me₃ sowie H4K20me₃ gezeigt werden.

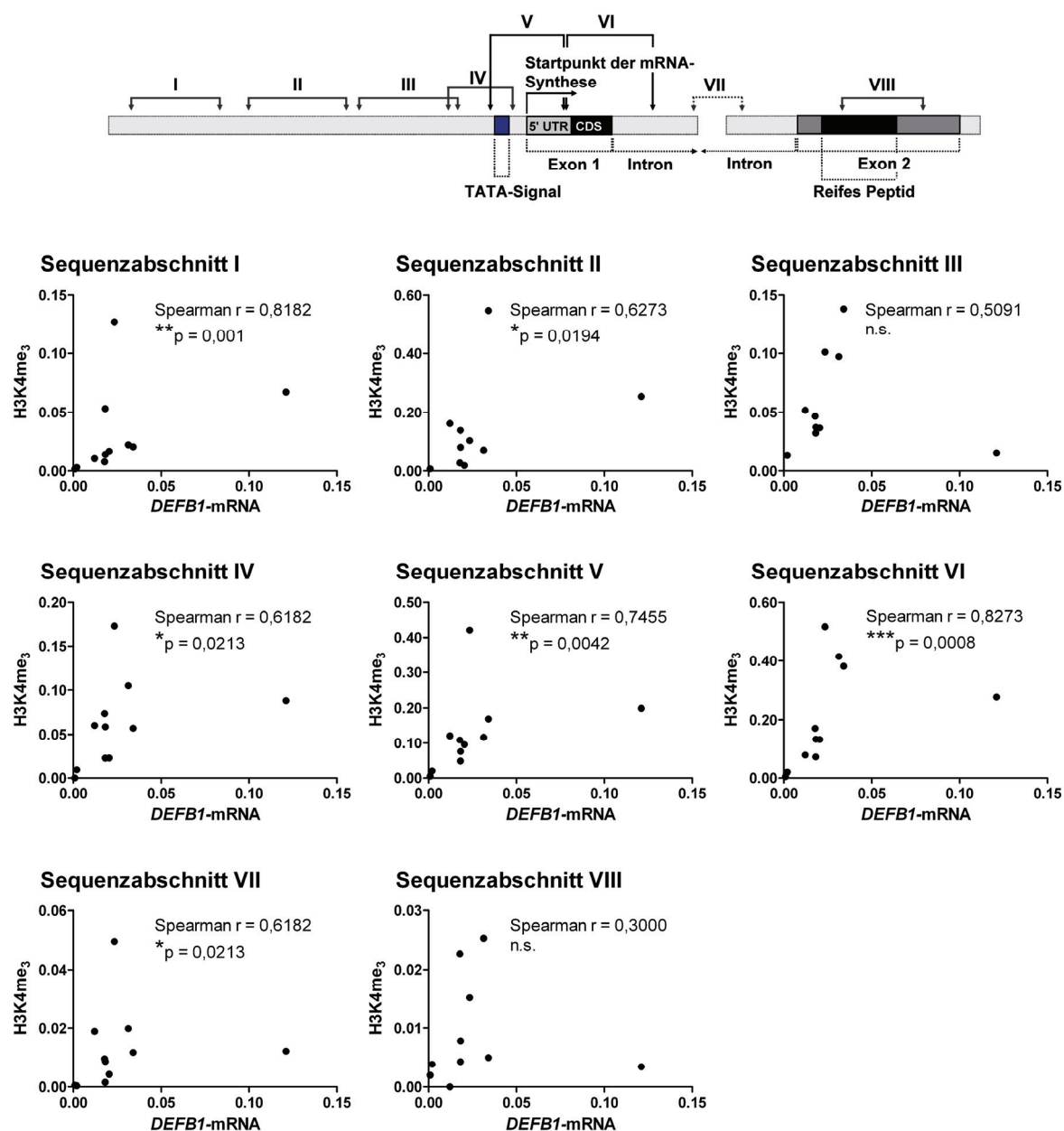


Abbildung 3-23 Analyse von H3K4me₃ in Abhängigkeit von der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.

Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3K4me₃ immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *Histon H4* normalisiert. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -M dargestellt. Die Korrelationsanalyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r , Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

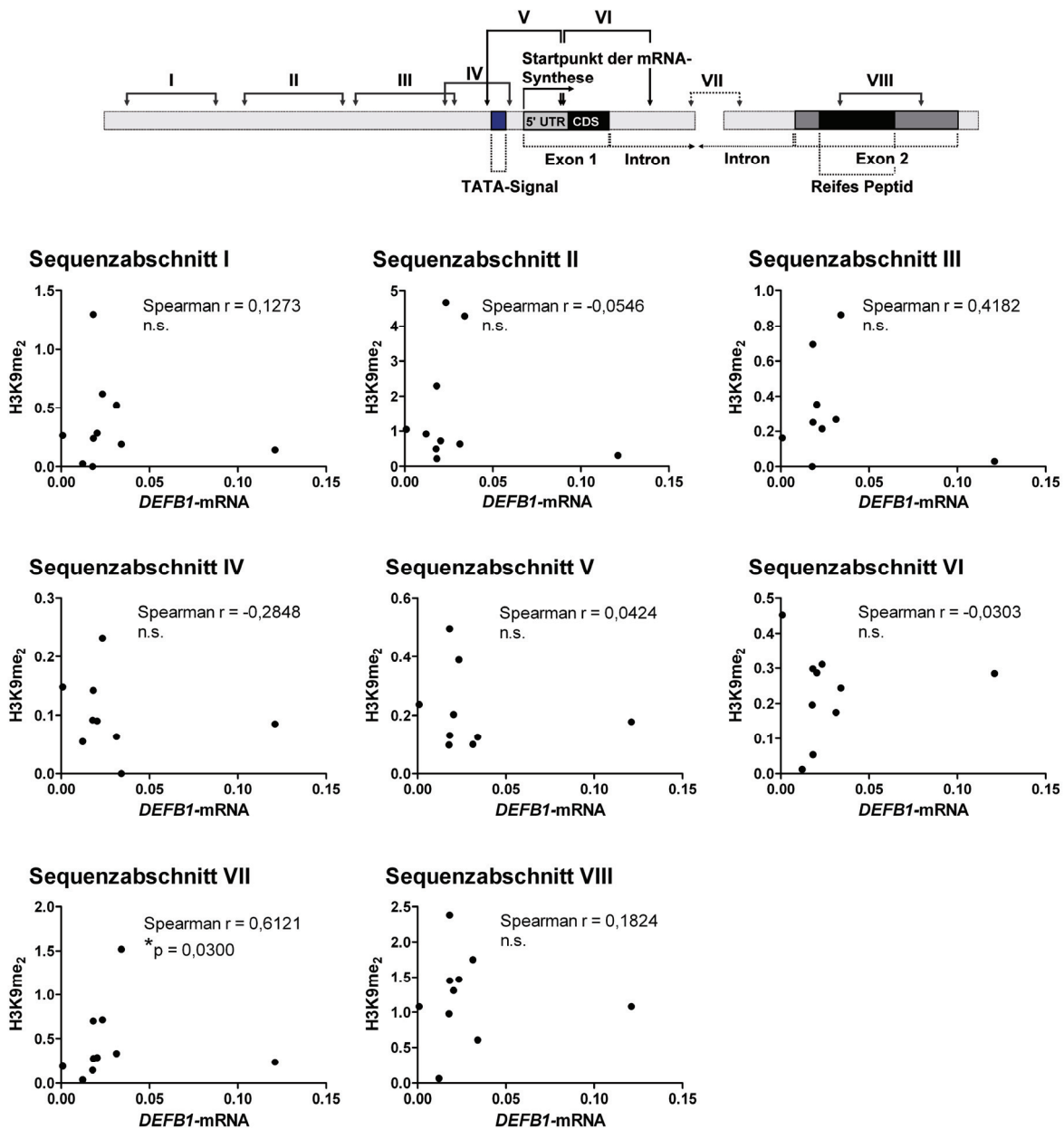


Abbildung 3-24 Analyse von H3K9me₂ in Abhängigkeit von der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.

Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3K9me₂ immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time-PCR* bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *LINE-1* normalisiert. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -M dargestellt. Die Korrelationsanalyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r , Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

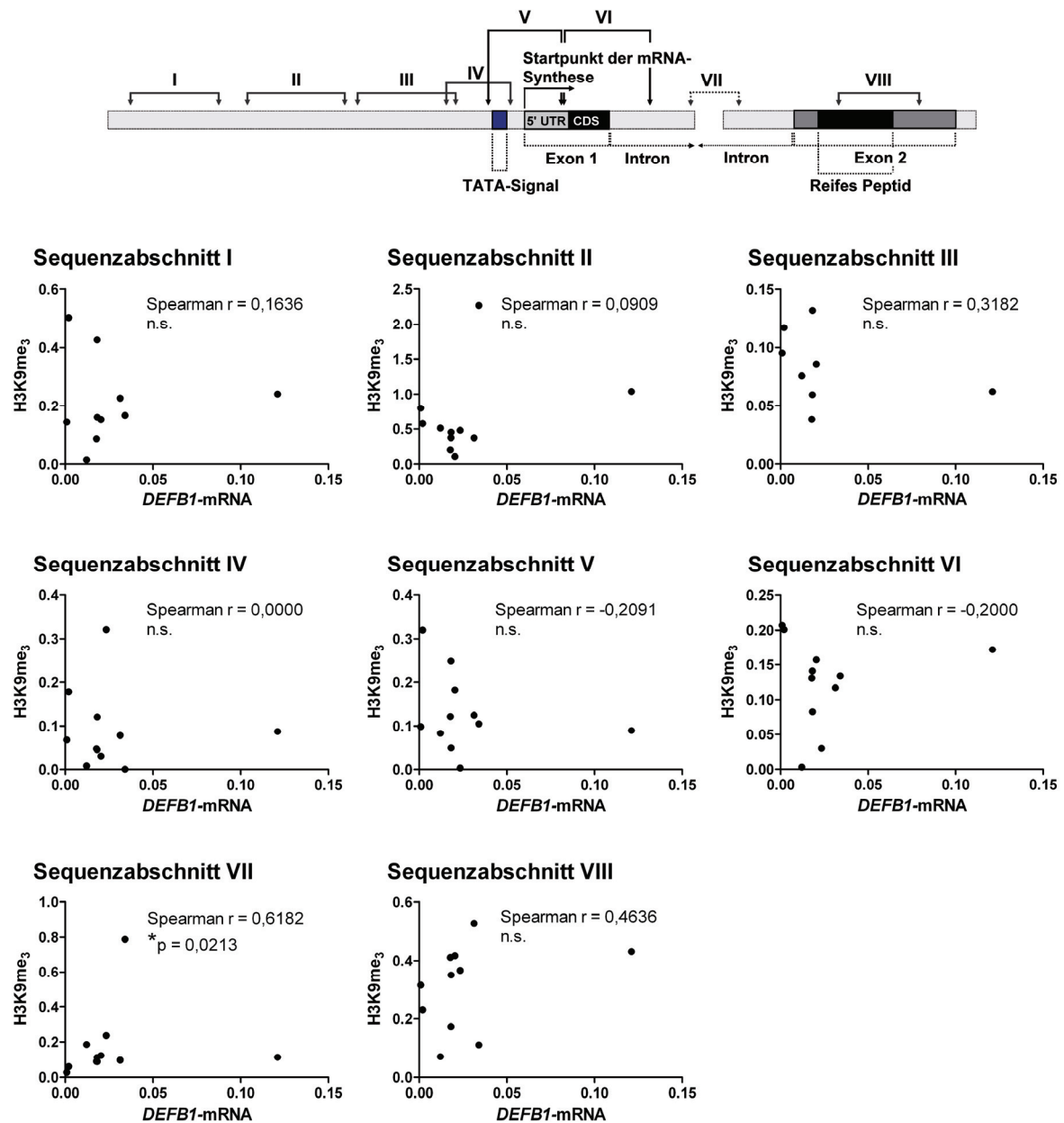


Abbildung 3-25 Analyse von H3K9me₃ in Abhängigkeit von der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.

Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H3K9me₃ immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *LINE-1* normalisiert. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -*M* dargestellt. Die Korrelationsanalyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r , Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

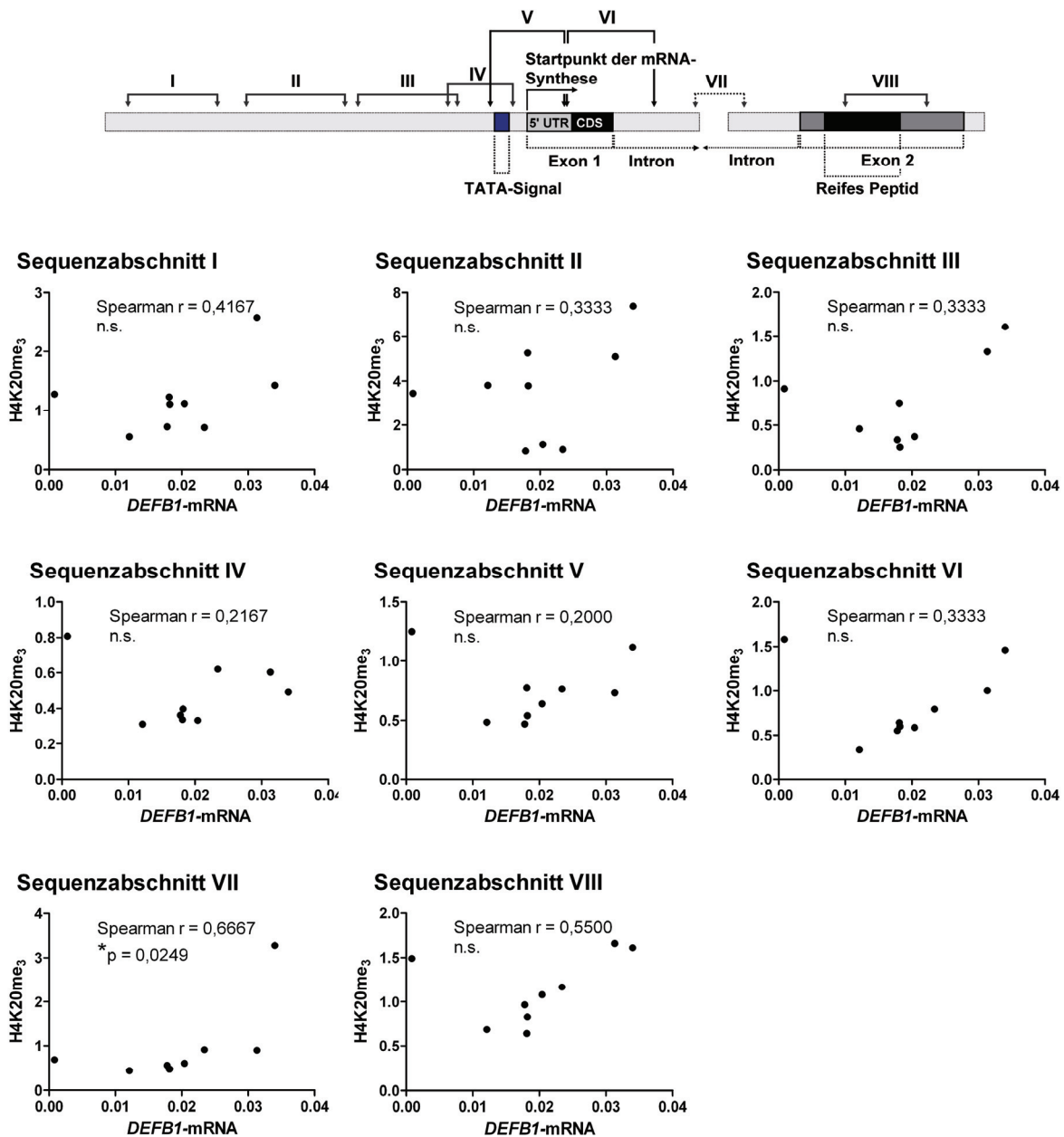


Abbildung 3-26 Analyse von H4K20me₃ in Abhängigkeit von der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.

Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden lysiert, aus der Gesamt-DNA 200-1000 bp große Fragmente durch Ultraschall generiert und mittels Antikörper gegen H4K20me₃ immunpräzipitiert. Zum Nachweis der Spezifität der Präzipitation wurden jeweils Ansätze ohne Antikörper mitgeführt (Negativ-Kontrollen). Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung auf die Input-DNA. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach dem Abzug der Negativ-Kontrollen auf *LINE-1* normalisiert. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -M dargestellt. Die Korrelationsanalyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r, Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

3.4.5 Analyse der Rolle von *HDACs* in der Regulation von *DEFB1*

Wie bereits im Abschnitt 3.4.3 erwähnt, wird die Bedeutung der *HDACs* in der Pathogenese der COPD in der Literatur besonders hervorgehoben. So tragen aktuellen Studien zufolge offensichtlich sowohl eine gestörte Expression als auch eine beeinträchtigte Aktivität der *HDACs* zur Chronifizierung der Erkrankung bei^{12,13,166}. In diesem Zusammenhang wurde die Genexpression der humanen *HDACs* sowie ihre Beteiligung an der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* während einer COPD untersucht.

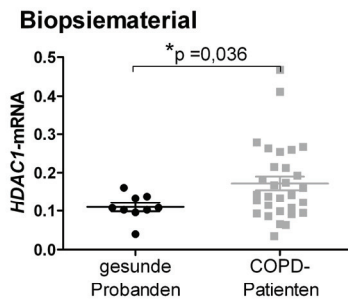
3.4.5.1 Analyse der mRNA-Expression von *HDACs* in Abhängigkeit von der COPD und Parametern der Lungenfunktion

Um zu überprüfen, ob *HDACs* an der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* beim Fortschreiten einer COPD beteiligt sind, wurde zunächst untersucht, welche der elf *HDACs* in der humanen Lunge exprimiert werden. Für diese Untersuchungen wurde das Biopsiematerial von insgesamt 33 COPD-Patienten und zehn gesunden Probanden verwendet und die mRNA-Expression von *HDAC1* bis 11 mittels quantitativer *Real-time-PCR* untersucht. In diesem Material konnten die mRNA-Transkripte aller untersuchten *HDACs* (*HDAC1-11*) detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichende Analyse der Genexpression offenbarte nur für *HDAC1* einen Zusammenhang mit COPD. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg ($p = 0,036$) der *HDAC1*-mRNA-Expression im Biopsiematerial von COPD-Patienten gegenüber der gesunden Probanden verzeichnet werden (Abbildung 3-27 A). Für *HDAC2-11* konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Zusammenhang zwischen der *HDAC1*-mRNA-Expression und den Parametern der Lungenfunktion FEV_1 , VC sowie dem Quotienten FEV_1/VC untersucht. Wie bereits im Abschnitt 1.1 erwähnt, wird VC von der Deutschen Atemwegsliga und DGP³ für die Definition der Obstruktion verwendet, welche durch $FEV_1/VC < 70\%$ des Sollwerts definiert wird. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Änderung der *DEFB1*-mRNA-Expression und FEV_1 ($p = 0,0177$), VC ($p = 0,3283$) sowie dem Quotienten FEV_1/VC ($p = 0,0768$) nachgewiesen werden (Abbildung 3-27 B).

Auch bezüglich *HDAC2-11* bestand keine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression und den Parametern der Lungenfunktion (Daten nicht gezeigt).

(A)



(B)

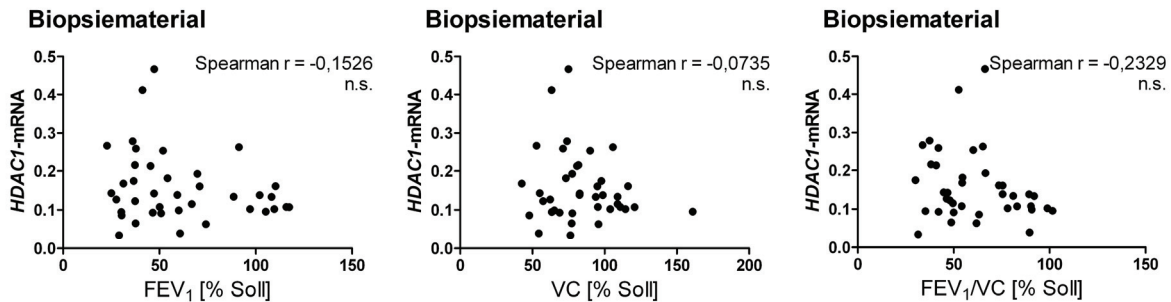


Abbildung 3-27 Analyse der mRNA-Expression von *HDAC1* in Abhängigkeit von der COPD und Parametern der Lungenfunktion.

(A) Die Expression von *HDAC1*-mRNA relativ zu β_2 -M wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests analysiert. Zusätzlich in der Abbildung ist der Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Gruppe dargestellt. (B) *HDAC1*-mRNA-Expression wurde in Abhängigkeit von FEV₁, VC und dem Quotienten FEV₁/VC untersucht. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r . In beiden Tests wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

3.4.5.2 Korrelation zwischen mRNA-Expression von *HDACs* und *DEFB1* im Biopsiematerial

Um die Bedeutung der HDACs in der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* genauer zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von *HDACs* (*HDAC1-11*) mit der Expression von *DEFB1*-mRNA im Biopsiematerial von insgesamt 33 COPD-Patienten und zehn gesunden Probanden korreliert (Abbildung 3-28).

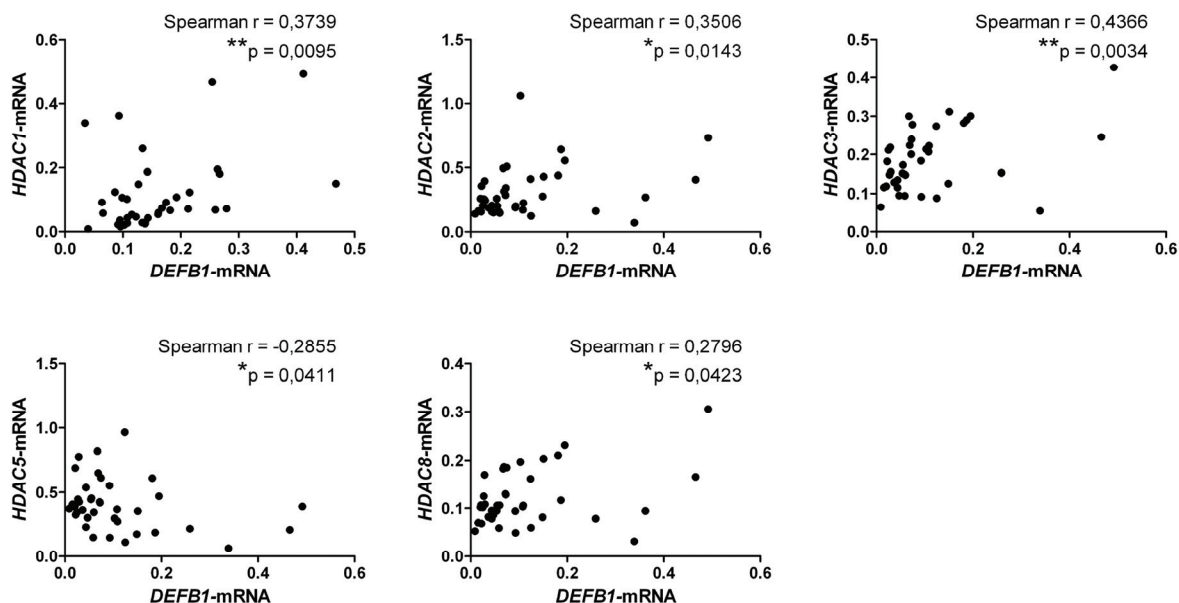


Abbildung 3-28 Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *HDACs* und *DEFB1* im Biopsiematerial.

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen zwischen der mRNA-Expression von *HDAC1-3*, *HDAC5* und *HDAC8* in Abhängigkeit von der Expression der *DEFB1*-mRNA. Die *DEFB1*-mRNA ist als Kopienzahl pro Kopie β_2 -M angegeben, die mRNA der *HDACs* ist relativ zu β_2 -M dargestellt. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r . Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet, n.s. – nicht signifikant.

Es konnten signifikante Korrelationen zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und der Histon-Deacetylasen *HDAC1* ($p = 0,0095$), *HDAC2* ($p = 0,0143$), *HDAC3* ($p = 0,0034$), *HDAC5* ($p = 0,0411$) und *HDAC8* ($p = 0,0423$) nachgewiesen werden. Wie der Abbildung 3-28 zu entnehmen ist, war der Anstieg von *DEFB1*-mRNA im Biopsiematerial mit einer Steigerung der mRNA von *HDAC1-3* und *HDAC8* verbunden. Im Bezug auf *HDAC5*-mRNA konnte dagegen eine Reduktion der Expression beim gleichzeitigen Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression verzeichnet werden. Zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und *HDAC4*, *6*, *7* sowie *9-11* gab es keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht gezeigt).

3.4.5.3 Effekte von TSA auf die mRNA-Expression von *HDACs* im Zellkulturmodell

Basierend auf den Erkenntnissen, dass (i) im Zellkulturmodell die Behandlung der Zellen mit TSA zu einer Aktivierung der *DEFB1*-mRNA-Expression führt und (ii) im Biopsiematerial die mRNA-Expression einiger *HDACs* mit der Genexpression von *DEFB1* korreliert, wurde der mögliche Einfluss von TSA auf die mRNA-Expression von *HDACs* untersucht. Hierfür wurden die beiden humanen Epithel-Zelllinien A549 und NCI-H727 mit TSA behandelt. Der Effekt von TSA auf die Transkription von *HDAC1-11* wurde in einem Zeitraum von 0,5 bis 48 h (A549) bzw. von 0,5 bis 72 h (NCI-H727) untersucht (Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30).

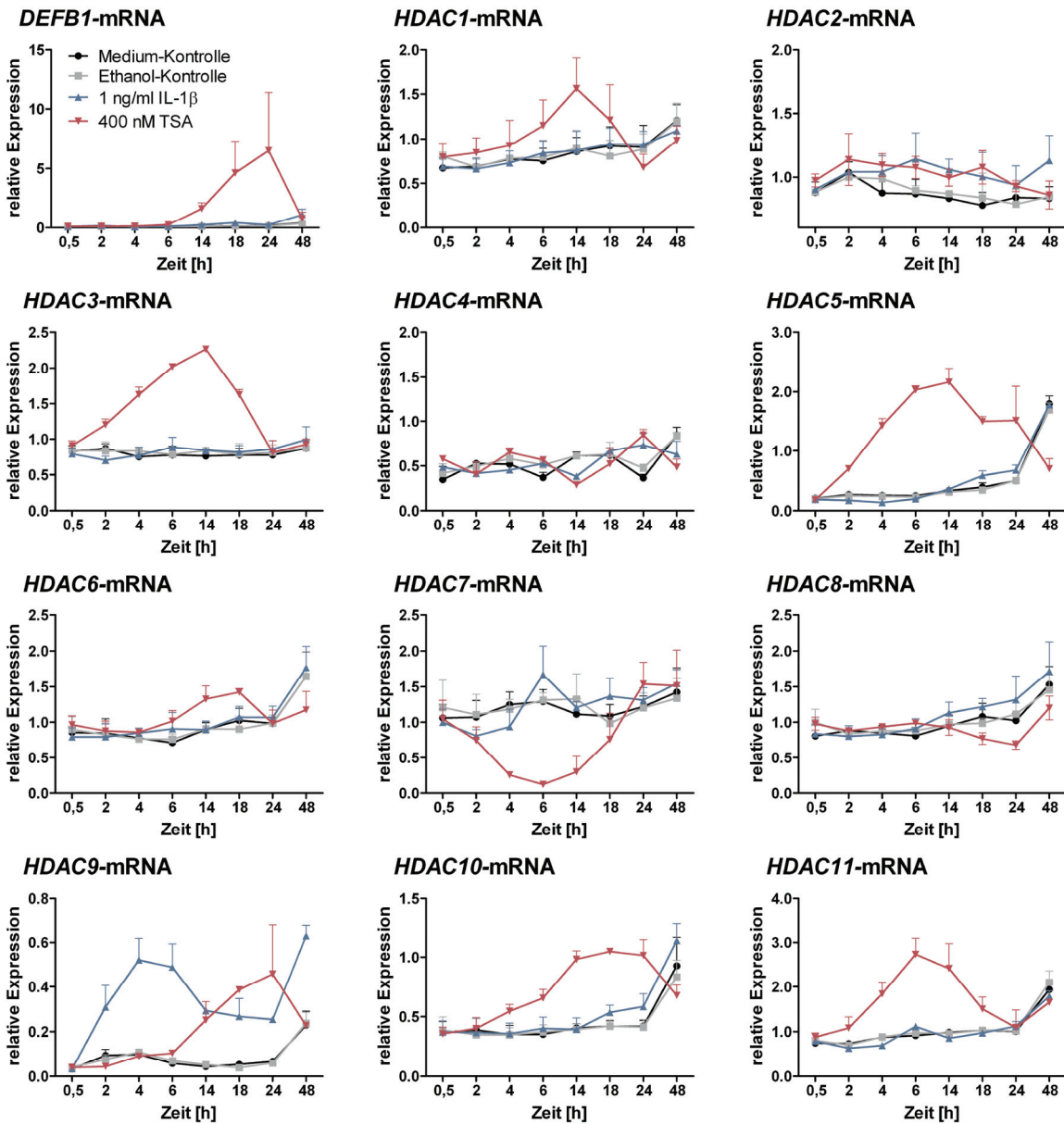


Abbildung 3-29 Effekt von TSA auf die mRNA-Expression von HDACs in A549-Zellen.

A549-Zellen wurden mit 400 μ M TSA und 1 ng/ml IL-1 β über 0,5 bis 48 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit entsprechendem Volumen Medium oder Ethanol versetzt. Die mRNA-Expression von *DEFB1* und *HDAC1-11* wurde relativ zu dem *housekeeping gene* *PBG-D* mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Vergleichsansätze wurden mit entsprechendem Volumen Medium oder Ethanol versetzt. Die Kontrolle der Zellaktivierung wurde anhand der Freisetzung von CXCL8 im Überstand nach der Behandlung mit IL-1 β (A549) und LPS (NCI-H727) überprüft (Daten nicht gezeigt). Um den Effekt des Inhibitors zu überprüfen, wurde parallel die *DEFB1*-mRNA-Expression unter TSA-Behandlung untersucht.

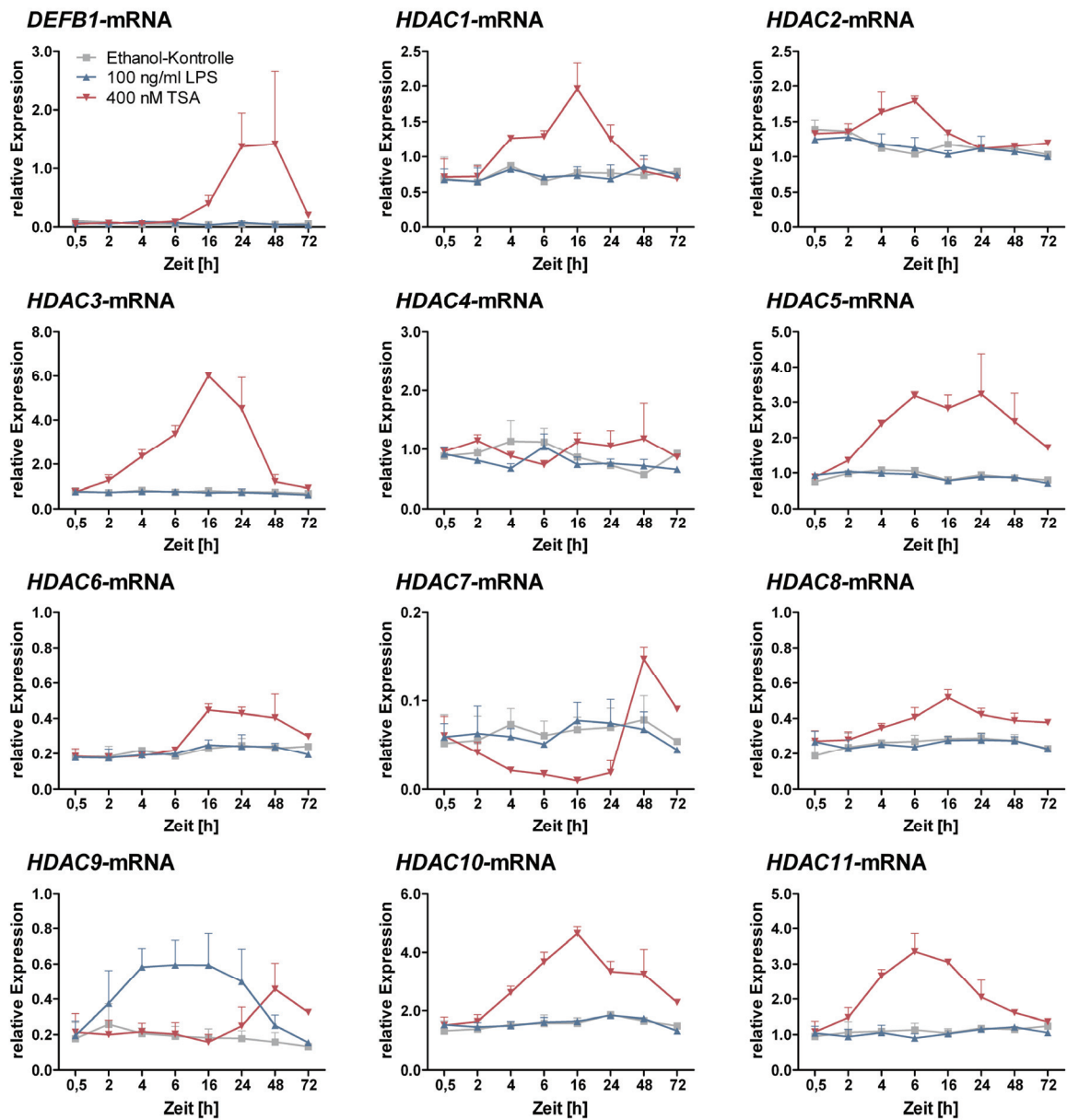


Abbildung 3-30 von TSA auf die mRNA-Expression von HDACs in NCI-H727-Zellen.

A549-Zellen wurden mit 400 μ M TSA und 10 ng/ml LPS über 0,5 bis 72 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit entsprechendem Volumen Ethanol versetzt. Die mRNA-Expression von *DEFB1* und *HDAC1-11* wurde relativ zu dem *housekeeping gene* *PBG-D* mittels quantitativer *Real-time-PCR* bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Dabei konnte in A549-Zellen bereits nach 14 h und in NCI-H727-Zellen nach 16 h ein Anstieg der *DEFB1*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Dieser erreichte nach 24 h in A549-Zellen das Maximum und war nach 48 h wieder auf der Höhe des Kontrollniveaus (Abbildung 3-29). Im Vergleich dazu wurde in NCI-H727-Zellen das Maximum erst zum Zeitpunkt 48 h erreicht. Zum Zeitpunkt 72 h war die *DEFB1*-mRNA-Expression wieder auf dem Kontrollniveau (Abbildung 3-30).

Im Hinblick auf die mRNA-Expression von *HDACs* zeigte die Behandlung der Zellen mit TSA einen unterschiedlichen Einfluss: Es konnte sowohl eine transkriptionelle Aktivierung als auch eine Repression der mRNA-Expression der einzelnen *HDACs* nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Kinetik der Aktivierung bzw. Repression in beiden Zelllinien einen nahezu identischen Verlauf (Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30). So führte die TSA-Behandlung sowohl in A549- als auch in NCI-H727-Zellen zu einem Anstieg der mRNA-Expression von *HDAC1*, *HDAC3*, *HDAC5*, *HDAC10* sowie *HDAC11*. Demgegenüber konnte in beiden Zelllinien eine Repression der *HDAC7*-mRNA-Expression unter TSA-Behandlung verzeichnet werden. Diese konnte in A549-Zellen bereits nach 2 h detektiert werden, erreichte nach 6 h das Minimum und war nach 24 h wieder auf dem Kontrollniveau (Abbildung 3-29). In NCI-H727-Zellen dagegen war die transkriptionelle Repression von *HDAC7* etwas verzögert und lag zum Zeitpunkt 24 h immer noch unter dem Kontrollwert (Abbildung 3-30). Bezüglich der *HDAC2*-mRNA-Expression konnte in beiden Zelllinien unter TSA-Behandlung keine Veränderung der Expression nachgewiesen werden. Für die mRNA-Expression von *HDAC4* und *HDAC8* konnte dagegen nur in NCI-H727-Zellen ein geringer Effekt detektiert werden (Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30).

Mit Ausnahme von *HDAC9* zeigte weder IL-1 β (A549-Zellen) noch LPS (NCI-H727-Zellen) einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der *HDACs*. Im Bezug auf *HDAC9* führte dagegen sowohl IL-1 β (A549-Zellen) noch LPS (NCI-H727-Zellen) zu einer Aktivierung der mRNA-Expression. Dabei wies die IL-1 β -induzierte *HDAC9*-mRNA-Expression einen biphasischen Verlauf auf: sie war bereits nach 2 h der Behandlung detektierbar und erreichte zum Zeitpunkt 4 h das Maximum. Zum Zeitpunkt 48 h war bereits ein zweiter Anstieg mRNA-Expression detektierbar (Abbildung 3-29). Die Behandlung der NCI-H727-Zellen mit LPS führte dagegen zu einer längeren, bis zu 48 h anhaltenden Induktion der *HDAC9*-mRNA-Expression, die zum Zeitpunkt 72 h wieder das Kontrollniveau erreichte (Abbildung 3-30).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der HDAC-Inhibitor TSA nicht nur die HDACs hemmt, sondern auch gleichzeitig an deren transkriptionellen Regulation beteiligt ist. Der Effekt von Mediatoren des angeborenen Immunsystems, IL-1 β und LPS, auf die mRNA-Expression von *HDAC9* lässt eine Bedeutung dieser Histon-Deacetylase in den angeborenen Abwehrmechanismen vermuten.

4 DISKUSSION

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zählt zu den häufigsten und folgenschwersten chronischen Erkrankungen weltweit. Pathogenetisch liegt der COPD eine chronische Entzündungsreaktion der Atemwege zugrunde, die durch Partikel oder Gase ausgelöst und in erster Linie durch Tabakkonsum verursacht wird³. Die Diagnose einer COPD basiert auf der Feststellung einer Atemwegsobstruktion, deren Nachweis durch die Messungen der 1-Sekunden-Kapazität (FEV₁) und der inspiratorischen Vitalkapazität (VC) mittels Spirometrie erfolgt. Wie die entzündlichen Vorgänge bei der COPD, welche vor allem im Bereich der Bronchiolen und der kleinen Bronchien stattfinden, mit der Obstruktion im Detail zusammenhängen, ist noch unklar. Dem angeborenen Immunsystem wird allerdings für die persistierenden Entzündungsreaktionen in den Atemwegen und die überschießende Immunantwort in der Lunge eine zentrale Bedeutung beigemessen¹⁷⁹.

Cytokine stehen im Zentrum des pathophysiologischen Geschehens einer COPD. Infolge eines toxischen Reizes, in den meisten Fällen Zigarettenrauch, kommt es zu einer Aktivierung inflammatorischer Zellen und deren Einwanderung in das bronchopulmonale Kompartiment¹⁷⁹. Insbesondere die von aktivierten Neutrophilen und Alveolarmakrophagen freigesetzten Mediatoren wie TNF- α ¹⁸⁰ und CXCL8¹⁸¹ werden für die Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen und die Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen verantwortlich gemacht. Diese Entzündungsprozesse spiegeln sich im zellulären Profil der BAL-Flüssigkeit wider: Während Alveolarmakrophagen das frühe Stadium einer COPD (leichtgradige COPD, Schweregrad I) dominieren, regulieren Neutrophile die inflammatorische Immunantwort in spätem Stadium der Erkrankung (sehr schwere COPD, Schweregrad IV, Abbildung 3-1). Obwohl die funktionelle Bedeutung von Lymphozyten und Eosinophilen während einer COPD noch nicht eindeutig definiert ist, wird insbesondere Neutrophilen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zugeschrieben¹⁸². Durch vermehrte Freisetzung von Proteasen, Elastasen und Oxidantien bewirken sie für die COPD charakteristische strukturelle und funktionelle Veränderungen in der Lunge, welche in einer irreversiblen Schädigung von Lungengewebe und einer Obstruktion der Atemwegemündungen¹⁷⁹. Letztere wird auch als Ursache für eine verminderte Belastungsfähigkeit von COPD-Patienten (Tabelle 3-1) diskutiert, welche entscheidend sowohl das alltägliche Leben der Patienten als auch die Prognose der COPD beeinflusst.

Obwohl der Tabakkonsum bis heute den am häufigsten untersuchten Risikofaktor einer COPD darstellt, scheinen sowohl genetische als auch erworbene Faktoren bei der Pathogenese eine wichtige Rolle zu spielen¹⁸³. So führt beispielsweise das Rauchen nicht zwangsläufig zur Entwicklung einer COPD. Auch Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keinen

eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Tabakkonsum und dem Schweregrad einer COPD (Tabelle 3-1). Allerdings ist bisher noch nicht bekannt, inwieweit und durch welche Faktoren der Verlust der Lungenfunktion, welcher das wesentliche klinische Merkmal einer COPD darstellt, determiniert wird. Bislang konnte ein genetisch bedingter Einfluss auf die Entwicklung einer COPD nur im Rahmen eines α_1 -Antitrypsinmangels nachgewiesen werden¹⁸⁴. Obwohl dies gegenwärtig die einzige anerkannte genetische Komponente einer COPD darstellt, deuten familiäre Zusammenhänge (wie beispielsweise von Lungenfunktionsdaten bei Kindern und Eltern) auf weitere genetische Faktoren in der Pathogenese einer COPD hin. So konnten in den letzten Jahren durch genomweite Kopplungsanalysen zahlreiche Gen-Bereiche identifiziert werden, die im Zusammenhang mit mehreren phänotypischen Merkmalen einer COPD (u.a. den Parametern der Lungenfunktion wie FEV₁ oder FVC) stehen¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Die FVC (forcierte Vitalkapazität^h) wird von der GOLD-Initiative (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) anstelle von VC zur Definition der Obstruktion verwendet und kann somit mit VC gleichgestellt werden⁹. Dabei zeigen die Kopplungsstudien von Silverman *et al.*^{186,187} beispielsweise eine solche Kopplung von FEV₁, FVC und dem Quotienten FEV₁/FVC mit dem Chromosom 8p, während Palmer *et al.*¹⁸⁵ sogar einen Zusammenhang von FEV₁ mit der Region 23 auf dem Chromosom 8 (8p23) nachweisen konnten. Interessanterweise liegen die Gene von humanen β -Defensinen (u.a. *DEFB1*, *DEFB4*, *DEFB103A* und *DEFB104A*) und α -Defensinen (u.a. *DEFA5* und *DEFA6*) eng benachbart auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 (8p), wo sie in einem Defensin-Gen-Cluster organisiert sind. Eine solche Gen-Lokalisation von Defensinen sowie deren duale Funktionen in den Atemwegen, welche neben direkter antimikrobieller Wirkung auch vielfältige immunmodulatorische Eigenschaften umfassen, haben im Rahmen dieser Arbeit zu der Hypothese geführt, dass sie auch in der Pathogenese der COPD eine bedeutende Rolle spielen können. In diesem Zusammenhang wurden humane AMPs bezüglich ihrer Genexpression in der humanen Lunge und im Hinblick auf eine Modulation beim Fortschreiten einer COPD untersucht.

4.1 COPD ist mit einer veränderten Expression von *DEFB1* assoziiert

In Übereinstimmung mit zahlreichen Literatur-Daten^{15,18,23,51} zeigen auch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die humane Lunge neben einer "physikalischen Barriere" auch ein "chemisches" Abwehrsystem besitzt. Dieses Abwehrsystem besteht aus zwei Mitgliedern der Subgruppe der β -Defensine, dem konstitutiv produzierten *DEFB1* und dem induzierbaren *DEFB4* (Abschnitt 3.2.1), sowie zwei weiteren, bisher wenig charakterisierten

^h Volumen, das von maximaler Einatmung bis zu maximaler Ausatmung forciert ausgeatmet wird

antimikrobiellen Proteinen, S100A7 aus der Familie der S100-Proteine und RNASE7 aus der RNase-A-Superfamilie (Abschnitt 3.3.1).

AMPs stellen eine große Gruppe evolutiv sehr alter Moleküle dar, welche sich möglicherweise noch vor der Aufspaltung von Tieren und Pflanzen vor über einer Milliarde Jahren entwickelt haben⁵⁰. Ihre Konservierung während der Evolution zeigt, wie wichtig diese antimikrobiellen angeborenen Abwehrmechanismen bei der Verteidigung gegen potenzielle Pathogene sind. In ihrer Gesamtheit wirken sie gegen ein breites Spektrum von potenziellen Krankheitserregern und schützen die Lunge vor einer Besiedlung und Infektion. Die Bedeutung dieser AMPs und ihre Relevanz für die vielfältigen klinischen Phänomene einer COPD wurden jedoch bis heute noch nicht eingehend untersucht. Es gibt jedoch zahlreiche Belege, dass humane Defensine bei entzündlichen und infektiösen pulmonalen Erkrankungen wie der Pneumonie oder dem Asthma bronchiale eine Rolle spielen^{167,168}. Zudem fanden Spencer *et al.*¹⁸⁸ in BAL-Flüssigkeiten von Patienten mit einem α_1 -Antitrypsinmangel nicht nur hohe Konzentrationen von HNPs, welche zur Subgruppe der α -Defensine gehören. Vielmehr stellten sie eine starke Korrelation mit verschiedenen Entzündungsmarkern (wie beispielsweise Anzahl von Neutrophilen in den unteren Atemwegen) fest und schlugen daher HNPs als prognostischen Marker für das Fortschreiten und die Schwere dieser Erkrankung vor.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass die COPD mit einer verstärkten Expression von *DEFB1* einhergeht. Dabei wurde nicht nur ein Zusammenhang zwischen der *DEFB1*-Genexpression und der klinisch manifestierten Erkrankung nachgewiesen. Es bestand auch eine signifikante Korrelation zwischen der *DEFB1*-Genexpression und allen untersuchten Parametern der COPD-Diagnostik (körperliche Analysen und Lungenfunktionstests).

DEFB1 bildet mit seiner starken, vorwiegend epithelialen Expression einen der wesentlichen Bestandteile der basalen chemischen Abwehr der Atemwege¹⁸⁹⁻¹⁹². Erste Hinweise auf die Beteiligung von *DEFB1* an der antimikrobiellen Abwehr der humanen Lunge lieferten Goldman *et al.*¹⁹¹ bereits vor über zehn Jahren. In ihrer Studie zeigten sie eine starke Abhängigkeit der antimikrobiellen Wirkung von *DEFB1* von der Salzkonzentration des Mediums und erklärten damit die hohe Anfälligkeit von Patienten mit einer cystischen Fibrose (CF) gegenüber Infektionen mit *P. aeruginosa*. Noch im gleichen Jahr wurde nicht nur die komplette genomische Sequenz des über 7 kb großen *DEFB1*-Gens mit zwei Exons (Exon 1, 128 bp und Exon 2, 234 bp) sowie einem 6962 bp-großen Intron ermittelt. Auch seine chromosomale Lage auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 (8p23.2-p23.1) wurde mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bestimmt¹⁹³. Seit dieser Zeit beschäftigen sich mehrere Studien mit funktionellen Charakterisierungen von *DEFB1*. Zwar konnten bislang noch keine Mutationen im *DEFB1* nachgewiesen werden; jedoch fanden Dörk

*et al.*¹⁹⁴ und Levy *et al.*¹⁸⁹ eine Vielzahl von exprimierten Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*). Während für zwei dieser SNPs im 5'-Bereich des Gens (-1860 T/C) und im Intron (+962G/A) eine positive Assoziation mit dem Auftreten von Asthma bronchiale gezeigt werden konnte¹⁸⁹, wurde für die COPD eine solche Assoziation bis heute nicht nachgewiesen¹⁹⁵. Allerdings berichteten Matsushita *et al.*¹⁶⁹ von einer signifikanten Assoziation zwischen einem bestimmten heterozygoten Phänotyp eines *DEFB1*-Polymorphismus (Valin38/Isoleucin38) und dem Auftreten einer COPD. In diesem Zusammenhang wird das *DEFB1* als ein Kandidaten-Gen für die Entstehung dieser beiden obstruktiven, allerdings sowohl ätiopathogenetisch als auch klinisch völlig unterschiedlichen Erkrankungen diskutiert.

Interessanterweise berichteten Goldman *et al.*¹⁷³ von zwei SNPs (-52G/A und -20G/A) in der 5'-UTR von *DEFB1* mit signifikanter Assoziation für eine Kolonisation der Atemwege von CF-Patienten mit *P. aeruginosa*. Diese beiden SNPs wurden von Matsushita *et al.*¹⁶⁹ ebenfalls untersucht; allerdings konnte dabei keine solche Assoziation mit der COPD nachgewiesen werden. Obwohl COPD-Patienten generell eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakterieller Infektionen zeigen, kommt den Infektionen mit *P. aeruginosa* bei der COPD eine, im Vergleich zu anderen Erregern, eher untergeordnete Rolle zu¹⁷⁴. Dagegen sprechen mehrere Studien für eine kausale Bedeutung von *H. influenzae* (20-30 % der Fälle), *S. pneumoniae* (10-15 %) und *M. catarrhalis* (10-15 %) sowie respiratorischen Viren wie beispielsweise Rhino-Virus (20-25 %) in den akuten Exazerbationen einer COPD¹⁷²⁻¹⁷⁴. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten die genannten Erreger nur in den Atemwegen von AECOPD-Patienten nachgewiesen werden (Tabelle 3-2). Ob dabei eine Assoziation zwischen bestimmten Polymorphismen im *DEFB1* und dem klinischen Verlauf einer COPD besteht, ist bis heute nicht bekannt. Interessanter scheint in diesem Zusammenhang, dass, im Gegensatz zu der Studie von Vankeerberghen *et al.*¹⁹⁶ mit CF-Patienten, für COPD-Patienten im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Korrelation von *DEFB1* mit allen relevanten Parametern der COPD-Diagnostik nachgewiesen werden konnte: 6-Min-Gehtest (Abbildung 3-7), *pack years* (Abbildung 3-8) und Lungenfunktionsparameter FEV₁/VC (Abbildung 3-3), FEV₁ (Abbildung 3-5) sowie RV/TLC, ITGV/TLC und IC/TLC (Abbildung 3-9). Diese Parameter dienen einerseits zum Nachweis einer Obstruktion (FEV₁ und VC) und einer Überblähung der Lunge (ITGV/TLC und RV/TLC)³. Andererseits, nachdem Casanova *et al.*¹⁹⁷ eine Korrelation von IC/TLC mit der Mortalität zeigen konnten, liefern sie zusätzlich Informationen über die Prognose einer COPD. Ob *DEFB1* in die Initiation oder Progression einer COPD involviert ist, wurde bis heute noch nicht eindeutig bewiesen. Allerdings wird eine solche positive Assoziation durch weitere Studien verdeutlicht. Beispielsweise berichteten Hersh *et al.*¹⁹⁵ von einer signifikanten Assoziation zwischen einem bestimmten Haplotyp von *DEFB1* und dem Quotienten FEV₁/FVC bei Patienten mit einer COPD. Die

Tatsache, dass bei CF-Patienten, deren Krankheitsverlauf ebenfalls mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion (Abfall des FEV₁) einhergeht, kein solcher Zusammenhang zwischen *DEFB1* und FEV₁ nachgewiesen werden konnte¹⁹⁸, bekräftigt die Hypothese, dass *DEFB1* ein für die COPD prädisponierendes Gen darstellt. Somit könnte eine frühzeitige Bestimmung von *DEFB1* möglicherweise eine prognostische Rolle in der Verlaufsbeurteilung dieser Erkrankung spielen. Diese Vermutung muss allerdings noch durch weitere Studien bestätigt werden.

In diesem Zusammenhang erscheint ebenfalls interessant, dass eine Assoziation von *DEFB1* mit der COPD nur in Bronchialschleimhautbiopsien nachgewiesen werden konnte. In Zellen der BAL-Flüssigkeit, welche akute Entzündungsprozesse in der Lunge besser widerspiegeln als die "Peripherie" der Atemwege, war dagegen eine entsprechende Abhängigkeit nicht nachweisbar (Abbildung 3-2). Dies spricht dafür, dass nicht das wechselseitige Zusammenspiel zwischen inflammatorischen Zellen und Mediatoren, die sich an dem Entzündungsgeschehen beteiligen, für die gestörte *DEFB1*-Genexpression verantwortlich ist. Vielmehr scheinen hier die, erst im Verlauf der Erkrankung entstandenen, strukturellen und funktionellen Veränderungen von Lungengewebe von Bedeutung zu sein. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit sowie bereits von anderen Gruppen publizierte Daten können zur Unterstützung dieser Hypothese herangezogen werden:

(i) Obwohl mehrere Untersuchungen eine Regulation der *DEFB1*-Expression durch LPS und IFN- γ in Monocyten und DC¹⁹⁹ sowie durch Glukose in humanen Mesangial-Zellen²⁰⁰ zeigen konnten, gilt seine konstitutive und nicht-induzierbare Expression in epithelialen Geweben als allgemein anerkannt¹⁹. Auch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder der direkte Kontakt mit potenziellen Atemwegspathogenen in Zellen der BAL-Flüssigkeit (Abbildung 3-6) noch der Einsatz bakterieller PAMPs, Cytokine oder ganzer Bakterien (Daten nicht gezeigt) in Atemwegsepithel-Zellen einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt auf die mRNA-Expression von *DEFB1* haben. Somit stellt *DEFB1* in diesem Sinne kein "typisches" antimikrobielles Peptid dar, dessen Expression durch entzündliche Vorgänge und Kontakt mit bestimmten Bakterien induziert wird, wie es beispielsweise für *DEFB4* bekannt ist⁷¹⁻⁷⁴.

(ii) Die im Vergleich zu anderen antimikrobiell aktiven Peptiden und Proteinen relativ schwache antibiotische Wirkung von *DEFB1*⁵⁴ lässt neben der epithelialen Abwehr weitergehende Funktionen vermuten. Bereits 1998 zeigten Zucht *et al.*²⁰¹ die cytotoxische Wirkung von *DEFB1* gegenüber Epithelzellen, welches radikale Folgen einer möglichen Überexpression von *DEFB1* in epithelialen Geweben vermuten lässt. Mittlerweile wird *DEFB1* im Zusammenhang mit grundlegenden zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Proliferation und Apoptose diskutiert²⁰²⁻²⁰⁴. Bullard *et al.*²⁰³ berichteten von einer Permeabilisierung von Zellmembranen und Aktivierung von Caspasen nach der Transfektion

der Zellen mit DEFB1 und postulierten für DEFB1 einen mitochondrialen, ATP- und Cytochrom-C-abhängigen Apoptose-Signalweg. Es gibt zunehmende Hinweise dafür, dass bei der COPD im Lungengewebe eine Störung der Balance zwischen Apoptose und Proliferation besteht¹¹. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Apoptose durch DEFB1 ist denkbar. Dabei könnte DEFB1 einerseits die Dysbalance verstärken, andererseits die strukturellen Veränderungen des Lungengewebes und die Zerstörung alveolarer Strukturen in den Atemwegen von COPD-Patienten begünstigen, was einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von DEFB1 und der Entstehung des Lungenemphysems vermuten lässt. Noch im gleichen Jahr der Studie von Bullard *et al.*²⁰³ konnten Bose *et al.*²⁰⁴ den Zelltod durch Nekrose infolge einer DEFB1-induzierten Membranschädigung nachweisen. Im Gegensatz zur Apoptose löst die Nekrose eine lokale Entzündungsreaktion aus und steht in Verbindung mit direkter Schädigung der Zellen und Geweben. Somit zeigt sich, dass *DEFB1* nicht nur für die Pathomechanismen, sondern auch für die klinischen Phänomene einer COPD von Bedeutung sein könnte. Allerdings müssen auch hier weitere Untersuchungen folgen.

Die Daten der im Zusammenhang mit einer COPD untersuchten Gene der AMPs *DEFB4* und *RNASE7* lieferten keine statistisch signifikanten Assoziationen. Es zeigte sich allerdings, dass einzelne Gene durchaus mit einigen wenigen Parametern wie beispielsweise 6-Min-Gehtest (Abbildung 3-7) oder RV/TLC (Abbildung 3-9) korrelieren. Da aber bei diesen Untersuchungen keine signifikanten Zusammenhänge über den gesamten Datensatz nachgewiesen werden konnten, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eher für eine untergeordnete Bedeutung dieser AMPs in der Pathogenese der COPD. Aufgrund seiner besonderen Bedeutung wird auf *S100A7* im nachfolgenden Abschnitt näher eingegangen.

4.2 *S. aureus*, nicht *E. coli*, ist in der Lage, *S100A7* zu induzieren

Das antimikrobiell aktive *S100A7* (syn. Psoriasin) gehört zur Familie der Ca^{2+} -bindenden *S100*-Proteine und wurde bereits im Jahr 1991 aus den Keratinocyten von Psoriasis-Patienten isoliert, ohne dass die Funktion des Proteins geklärt werden konnte²⁰⁵. Mittlerweile ist bekannt, dass *S100A7* einen wichtigen Bestandteil der angeborenen antimikrobiellen Abwehr der gesunden Haut darstellt, welches die Hautoberfläche vor einer *E. coli*-Infektion schützt¹⁰⁸. Die ersten Diskussionen um eine mögliche Funktion von *S100A7* auch in der epithelialen Abwehr der Atemwege wurden durch die Arbeit von Bryborn *et al.*²⁰⁶ eröffnet. Im Jahr 2005 untersuchten sie nasale Lavage-Flüssigkeiten von Patienten mit allergischer Rhinitis und konnten bei diesen eine verminderte Protein-Expression von *S100A7* nachweisen. Sie lieferten damit erste Hinweise darauf, dass entzündliche Erkrankungen der

Atemwege zu einer beeinträchtigten Expression von S100A7 führen können. Erstmals wurde sowohl die mRNA- als auch die Protein-Expression von S100A7 in der humanen Lunge in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Andresen *et al.*, zur Publikation eingereicht), was die Relevanz von S100A7 für die effektive antimikrobielle Abwehr in den Atemwegen bekräftigt. Auch bereits von anderen Gruppen publizierte Daten zeigen inzwischen, dass S100A7 nicht nur im Oralepithel exprimiert wird, sondern auch eine dominante Komponente der antimikrobiellen Abwehr der Atemwege darstellt^{109,207}.

Die intensive fokale Expression von S100A7 bei chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen wie beispielsweise atopische Dermatitis²⁰⁸ und Psoriasis²⁰⁵ hat des Weiteren im Rahmen dieser Arbeit zur Hypothese geführt, dass S100A7 auch in der Lunge von COPD-Patienten eine bedeutende Rolle spielen könnte. Zum Unterstützen dieser Hypothese können Beobachtungen aus mehreren Studien herangezogen werden: (i) Beispielsweise zeigen die Arbeiten von Gläser *et al.*^{108,208} und Petersson *et al.*²⁰⁹, dass nicht nur entzündliche Vorgänge in der Haut, sondern auch Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IFN- γ sowie der Kontakt mit bestimmten Bakterien die Produktion von S100A7 induzieren. Diese Faktoren sind auch bei der COPD von pathogenetischer Relevanz, da sie nicht nur an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt sind, sondern auch zur Gewebedestruktion, Zerstörung alveolarer Strukturen und irreversiblen Schädigung der Lunge beitragen können¹⁷⁹. (ii) Neben seinen chemotaktischen Wirkungen auf CD4-T-Effektorzellen und Neutrophilen²¹⁰ wurde im letzten Jahr die Beteiligung von S100A7 in oxidativen Stoffwechselreaktionen von Neutrophilen nachgewiesen und als eine seiner Hauptfunktionen erkannt²¹¹. Interessanterweise kann S100A7 nicht nur die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise das Superoxid-Anionenradikal O₂⁻ oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch Neutrophile anregen, sondern wird auch selbst durch diese induziert.²¹² Dabei scheint das Ungleichgewicht zwischen einer verstärkten ROS-Produktion und einer Inaktivierung endogener Antioxidantien (sog. oxidativer Stress) auch bei der COPD eine pathogenetische Rolle zu spielen²¹³.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch weder einen Zusammenhang zwischen der Genexpression von S100A7 und der klinisch manifestierten COPD noch eine Korrelation der S100A7-Genexpression mit wesentlichen Parametern der COPD-Diagnostik (Abschnitt 3.3). Auch der induzierbare Charakter von S100A7, welcher in humanen Keratinocyten durch Einsatz unterschiedlicher Entzündungsmediatoren bereits in mehreren Studien gezeigt wurde, konnte in diesen Experimenten nicht bestätigt werden: Weder der Einsatz von Cytokinen (wie beispielsweise TNF- α und IL-1 β) noch die Behandlung der Zellen mit bakteriellen PAMPs (wie beispielsweise LPS und Pam₃CS-K₄) oder ganzen Bakterien (wie beispielsweise das Gram-negative *E. coli* oder das Gram-positive *Bacillus subtilis*) hatte

einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *S100A7* in Atemwegsepithel-Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

Ob die charakteristischen Eigenschaften von *S100A7* wie *E. coli*-Spezifität und Induktion durch entzündliche Vorgänge in der Haut einer ausgeprägten Zell- und Gewebespezifität unterliegen, wurde bis heute noch nicht eingehend untersucht. Allerdings konnten Kulski *et al.*²¹⁴ zeigen, dass *S100A7*, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 1q21 liegt, in einem *S100A7-like*-Gen-Cluster mit mindestens fünf unterschiedlichen *S100A7-like*-Gen-Kopien *S100A7A* (auch "*S100A15*" genannt²¹⁵) sowie *S100A7B-E* organisiert ist. Während es sich bei *S100A7D* und *S100A7E* um Pseudogene handelt, die keine bekannten Funktionen haben, kodieren die ersten drei, *S100A7A-C*, jeweils ein funktionstüchtiges Protein. Dabei könnten diese Gen-Kopien nicht nur eine ausgeprägte Gewebespezifität aufweisen, sondern auch neue Aufgaben erlangen, die mit spezifischen Eigenschaften und Funktionen assoziiert sind. In der humanen Haut konnten beispielsweise alle drei funktionellen Protein-Isoformen nachgewiesen werden, wobei die meisten Analysen, einschließlich der Arbeiten von Gläser *et al.*¹⁰⁸, auf das *S100A7C* zurückgehen^{216,217}. Wolf *et al.*²¹⁶ berichteten zudem über Unterschiede in biologischen Eigenschaften von *S100A7A* und *S100A7C* wie beispielsweise zelltypspezifische Expression, chemotaktische Wirkung und funktionelle Mechanismen, die mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen von entzündlichen Prozessen in der Haut korrelieren. Ob es sich in der humanen Lunge möglicherweise um ein bestimmtes Produkt des *S100A7*-Gen-Clusters handelt, muss noch durch weitere Experimente untersucht werden. Auch weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können zusammen mit den kürzlich von Holland *et al.*²¹⁸ publizierten Daten zur Unterstützung dieser Vermutung herangezogen werden: Während (i) die Studie von Gläser *et al.*¹⁰⁸ nicht nur eine starke *E. coli*-spezifische antibakterielle Wirkung von *S100A7C*, sondern auch die transkriptionelle Aktivierung von *S100A7C* durch *E. coli* in der Haut nachweisen konnte und (ii) Abtin *et al.*²¹⁹ das bakterielle Flagellin als *E. coli*-spezifischen Induktor der *S100A7C*-Genexpression identifiziert hatten, zeigten die *Microarray*-Analysen von Holland *et al.*²¹⁸ die differenzielle Genexpression von *S100A7A* und *S100A7C* im humanen dreidimensionalen Hautmodell (*human living skin equivalent model*). Sie konnten zeigen, dass eine Kolonisation der Zellen mit *S. aureus* über 24 Stunden in einer Induktion der *S100A7A*-Genexpression in diesem Hautmodell resultiert, ohne dabei einen Einfluss auf *S100A7C* zu haben. Interessanterweise konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein starker Zusammenhang zwischen der *S100A7*-mRNA-Expression und dem Nachweis von *S. aureus* und nicht, wie man es erwarten könnte, dem Nachweis von *E. coli* in Zellen der BAL-Flüssigkeit gezeigt werden (Abbildung 3-11).

Des Weiteren berichteten Wolf *et al.*²¹⁵ über das Vorkommen von zwei funktionsfähigen Isoformen des *S100A7A*, einer langen Form *S100A7A_L* und einer kurzen Form *S100A7A_S*.

Dabei werden diese zwar von demselben Gen durch alternatives Spleißen hergestellt, zeichnen sich aber durch unterschiedliche biologische Eigenschaften aus: Während beispielsweise in der Haut beide Isoformen von *S100A7A* durch *E. coli* induziert werden können, zeigt *S. aureus* nur auf die lange Variante *S100A7A_L* eine solche induzierende Wirkung²¹⁷. Möglicherweise handelt es sich in der humanen Lunge um die lange Spleiß-Variante des *S100A7A*-Gens mit leicht veränderten funktionellen Eigenschaften wie eine Induktion durch *S. aureus*, aber nicht durch *E. coli*, welche sich im Laufe der Zeit auf die Anforderungen ihrer Umgebung in der humanen Lunge angepasst haben könnten. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass *S100A7* einen wichtigen Bestandteil der antimikrobiellen angeborenen Abwehr der Lunge darstellt, allerdings in der Pathogenese der COPD eine eher untergeordnete Rolle einnimmt.

4.3 Epigenetische Mechanismen sind an der Aktivierung von *DEFB1* beteiligt

Die Aufklärung der Mechanismen, die zu einer verstärkten Genexpression von *DEFB1* in der Lunge von COPD-Patienten führen, stellte ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Bisher sind Kontroll-Mechanismen der *DEFB1*-Genexpression wenig untersucht. Wie bereits im Abschnitt 4.1 erwähnt, berichten nur einige wenige Studien von der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* beispielsweise durch Cytokine oder bakterielle Zellwand-Komponenten^{199,220}. Nach neuesten Erkenntnissen wird *DEFB1* als ein Kandidat für die Gruppe der Tumorsuppressor-Gene diskutiert, deren Verlust ein allgemeines Charakteristikum vieler Krebserkrankungen ist^{203,221}. Mehrere Untersuchungen zeigen bereits einen Verlust der *DEFB1*-Genaktivität, assoziiert mit einem Rückgang der mRNA- und Protein-Expression im Prostata-, Nieren- und Plattenepithelkarzinom^{222,223}. Mechanismen, die zu einem Verlust bzw. einer Inaktivierung eines Gens führen können, sind vielfältig und werden neben genetischer Instabilität auch durch epigenetische Veränderungen bestimmt¹⁴⁰. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Mechanismen gesucht, die an der Regulation von *DEFB1* in der Lunge von COPD-Patienten beteiligt sind. Für die Untersuchungen der epigenetischen Mechanismen wie auch den Einsatz der pharmakologischen Wirkstoffe *ZdCyt*¹⁷⁷ und *TSA*²²⁴, welche direkt in die epigenetischen Prozesse eingreifen, gibt es eine Reihe von Argumenten: (i) aus Versuchen mit Prostatakarzinom-Zelllinien stammen erste Hinweise über die Rolle von *ZdCyt* in der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1*²²¹; (ii) eine gestörte Expression und beeinträchtigte Aktivität einiger HDACs, welche an der Modulation des epigenetischen Codes beteiligt sind, werden in der Literatur im Zusammenhang mit der COPD diskutiert^{12,13,165,213}; (iii) eine induzierende Wirkung einiger HDAC-Inhibitoren konnte bereits für das zweite Mitglied der β -Defensin-Familie, *DEFB4*, in humanen Kolorektalkrebs-Zelllinien gezeigt werden²²⁵.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass epigenetische Kontroll-Mechanismen an der Regulation der *DEFB1*-Genexpression beteiligt sind: Mittels ChIP-Analysen konnte eine Korrelation zwischen der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* und dem Aufbau eines aktiven "Histon-Codes" im 5'-Bereich des Gens in Zellen der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden. Während kein Zusammenhang zwischen der CpG-Methylierung im *DEFB1*-Gen und dessen Expression im Biopsiematerial von COPD-Patienten festgestellt werden konnte, zeigte eine allgemeine Inhibierung der DNA-Methylierung durch Einsatz eines DMT-Inhibitors (ZdCyt) im Zellkulturmodell hingegen einen starken Einfluss auf die *DEFB1*-Expression. Durch Verwendung eines HDAC-Inhibitors (TSA) konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Acetylierung bei der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* ebenfalls eine Rolle spielt.

Wie bereits erwähnt, wird *DEFB1* insbesondere im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen als ein potenzielles Tumorsuppressor-Gen diskutiert^{203,221}. Dabei stellen das veränderte Muster der CpG-Methylierung und globale Hypomethylierungen im Genom die spezifischen Eigenschaften von Krebszellen dar^{140,226}. Es wird allgemein angenommen, dass diese Veränderungen die epigenetische Grundlage der Krebsentstehung darstellen und mit einer fehlerhaften Genexpression einhergehen. Darüber können beispielsweise Gene mit Tumorsuppressor-Funktionen abgeschaltet werden¹³⁹. In diesem Zusammenhang wurde das Muster der CpG-Methylierung von *DEFB1* bisher nur an humanen Prostatatumoren und verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Allerdings konnte dabei kein Zusammenhang zwischen der *DEFB1*-Genexpression und der CpG-Methylierung im *DEFB1*-Promotorbereich nachgewiesen werden²²¹. Sowohl diese Studie als auch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abbildung 3-13) sprechen gegen eine direkte Rolle der CpG-Methylierung in der Regulation der Genexpression von *DEFB1* in der Lunge der COPD-Patienten.

Die Beteiligung der DNA-Methylierung in der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* konnte jedoch durch den Einsatz der demethylierenden Substanz ZdCyt in der Zellkultur nachgewiesen werden. ZdCyt gehört zur Klasse der Azanucleotid-Inhibitoren, deren klinische Bedeutung seit der Erstbeschreibung im Jahr 1964 bis heute in einer Vielzahl klinischer Studien getestet wurde^{227,228}. Bereits seit Mai 2006 ist ZdCyt zur Therapie Myelodysplastischer Syndrome zugelassen (klinischer Name Decitabin)²²⁹. Dabei handelt es sich um ein Cytidin-Analog, das nach seinem Einbau in die neue synthetisierte DNA durch Ausbildung kovalenter Bindungen mit DMTs die Aktivität dieser Enzyme irreversibel hemmt¹⁷⁷. Die Inaktivierung von DMTs verhindert die Methylierung von Cytosin und führt im Rahmen der Replikation zu hemimethylierter DNA und schließlich zum Verlust der Methylierung. Sun *et al.*²²¹ berichteten von der Aktivierung der *DEFB1*-mRNA-Expression in verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien nach Behandlung der Zellen mit ZdCyt, welches

auch in Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In diesen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Zdcyt sowohl in A549- als auch in NCI-H727-Zellen eine Aktivierung der *DEFB1*-mRNA-Expression bewirkt (Abbildung 3-14). Auch bezüglich der CpG-Methylierung innerhalb des *DEFB1*-Gens wurden diese beiden Zelllinien untersucht und der Methylierungsstatus mittels Bisulfit-Sequenzierung ermittelt. Obwohl sowohl in A549- als auch in NCI-H727-Zellen ein Rückgang der CpG-Methylierung unter Zdcyt-Behandlung verzeichnet werden konnte, war jedoch auch hier kein Zusammenhang zwischen der Genexpression und dem Muster der CpG-Methylierung im *DEFB1* erkennbar (Abbildung 3-16). Da ähnliche Ergebnisse von Sun *et al.*²²¹ gezeigt werden konnten, scheinen die genannten Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung der DNA-Methylierung an der Aktivierung der *DEFB1*-Genexpression zu bestätigen, welche dann vermutlich indirekt vermittelt wird. Diese Vermutung wird auch durch den Einsatz eines weiteren Inhibitors, TSA, unterstützt, welcher zwar eine Aktivierung der *DEFB1*-mRNA-Expression in beiden Zelllinien bewirkt, aber keinen Einfluss auf die CpG-Methylierung im *DEFB1* hat (Abbildung 3-18). Auch beim TSA handelt es sich um einen epigenetischen Wirkstoff, der bereits 1976 aus *Streptomyces hydroscopius* isoliert und anfangs nur als fungistatisches Antibiotikum beschrieben wurde²³⁰. Erst knapp 20 Jahre später konnte TSA als potenter Inhibitor von humanen HDACs der Klassen I und II identifiziert werden²³¹. Als kompetitiver Inhibitor bindet TSA direkt in der Bindungstasche des aktiven Zentrums von HDACs und führt zu einer reversiblen Hemmung ihrer Enzymaktivität²³². Dabei wird eine gezielte Änderung der Acetylierung sowohl von Histonen als auch von weiteren zellulären Proteinen wie Transkriptionsfaktoren oder Chaperonen als entscheidender Schritt der epigenetischen Genregulation diskutiert²³³.

Die Rolle von HDAC-Inhibitoren in der Regulation von AMPs und insbesondere von Defensinen ist gegenwärtig noch wenig untersucht. Erst im Jahr 2008 konnte eine induzierende Wirkung zweier solcher Inhibitoren, Sulforaphan und Butyrat, auf die Expression von *DEFB4* gezeigt werden²²⁵. Im gleichen Jahr untersuchten Schrauber *et al.*²³⁴ die Wirkung von Butyrat auf die Genexpression von *DEFB1* in Keratinocyten, Kolonkarzinom- und Monocyten-Zelllinien, konnten allerdings keinen Effekt nachweisen. Beim Butyrat handelt es sich um eine kurzkettige Fettsäure, die wie TSA HDACs der Klassen I und II inhibiert²³². Im Gegensatz dazu ließ sich die *DEFB1*-mRNA-Expression durch den Einsatz von TSA, welcher zur Klasse der Hydroxamsäuren gehört, sowohl in A549- als auch in NCI-H727-Zellen induzieren (Abbildung 3-17). Diese Differenzen lassen sich einerseits durch Verwendung unterschiedlicher zellulärer Systeme und andererseits durch Einsatz unterschiedlicher Strukturklassen der Inhibitoren erklären. Obwohl über die biologische Wirkung solcher Inhibitoren gegenwärtig noch sehr wenig bekannt ist, können zwei mögliche Mechanismen der TSA-Wirkung postuliert werden:

Zum einen ist es möglich, dass TSA durch die Hemmung der HDACs das Entfernen der Acetylgruppen von Histonen verhindert und somit zu einer Hyperacetylierung dieser Proteine führt. Dies wird mit einer Öffnung der Chromatinstruktur und Erhöhung der DNA-Zugänglichkeit in Verbindung gebracht; möglicherweise dadurch, dass die zusätzliche Acetyl-Gruppe eine positive Ladung am Lysin auslöscht und somit die Interaktionen zwischen DNA und Histonen beeinflusst¹⁴⁶. Eine solche Rolle der Acetylierung wird in der Literatur häufig als "Ladungs-Hypothese" beschrieben, da hier die Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen im Chromatin im Vordergrund stehen¹⁵³. Die Erhöhung der Gesamt-Acetylierung des Histons H3 bzw. dessen Acetylierung am Lysin 9, die in der Zellkultur unter TSA-Behandlung zu verzeichnen waren, stellt einen wichtigen Ansatzpunkt für diese Hypothese dar (Abbildung 3-19). Diese wird zudem durch die starke Korrelation zwischen der Genexpression und der Gesamt-Acetylierung von H3 in einigen Genabschnitten von *DEFB1* in Zellen der BAL-Flüssigkeit bekräftigt (Abbildung 3-20).

Des Weiteren sind Beispiele bekannt, in denen HDACs nicht direkt, sondern erst in Form von Protein-Komplexen an bestimmte Transkriptionsfaktoren binden und somit deren biologische Funktionen vermitteln^{153,154}. Somit basiert der zweite mögliche Mechanismus auf der Fähigkeit von TSA, durch die Hemmung von HDACs die biologischen Eigenschaften dieser Komplexe wie Protein-Protein-Interaktionen, DNA-Erkennung und DNA-Bindung oder auch deren Stabilität zu verändern. So bildet HDAC1 beispielsweise mit mSin3A (*SIN3 homolog A*) einen Repressor-Komplex, welcher Wechselwirkungen mit zahlreichen Bindungsproteinen wie TRIM28 (*tripartite motif-containing 28*, syn. TIF1 β /KAP1) und PFDN5 (*prefoldin subunit 5*, syn. MM-1) eingeht und indirekt die Inaktivierung des Gen-Kontrollproteins MYC vermittelt²³⁵⁻²³⁷. Satou *et al.*²³⁶ berichteten zudem von der aktivierenden Wirkung von TSA auf die transkriptionellen Eigenschaften von MYC, was einen HDAC-abhängigen und TSA-sensitiven Mechanismus der MYC-Aktivierung vermuten lässt. Der Transkriptionsfaktor MYC ist an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt, welche grundlegende zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Zellteilung, Zellüberleben und Zelldifferenzierung steuern²³⁸. Interessanterweise wird MYC bisher als einziger Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit der Aktivierung von *DEFB1* diskutiert^{203,239}. So zeigen die Studien von Hassig *et al.*²⁴⁰ und Sekhavat *et al.*²³³, dass weder eine gezielte Mutagenese im katalytischen Zentrum von HDAC1 noch eine Hemmung ihrer Enzym-Aktivität durch TSA zu einer Freisetzung von HDAC1 aus dem mSin3A-Repressor-Komplex führt. In diesem Zusammenhang ist ein Mechanismus denkbar, wonach die Hemmung von HDAC1 durch TSA die Freisetzung von MYC aus dem mSin3A-Repressor-Komplex vermittelt und somit an der Aktivierung von MYC beteiligt ist. Dies könnte dann in der verstärkten Transkription von *DEFB1* resultieren. Hierfür gibt es in der Literatur eine Reihe von Argumenten, die durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls unterstützt werden:

(i) Bereits vor über 25 Jahren konnte von Prendergast *et al.*²⁴¹ gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung die Bindung von MYC an seine E-Box-(CACGTG) oder eine alternative E-Box-like-Konsensus-Sequenz stört und somit die Transkription MYC-abhängiger Gene hemmt. Damit könnte die indirekte demethylierende Wirkung von ZdCyt auf die transkriptionelle Aktivität von *DEFB1* erklärt werden: Der Verlust der DNA-Methylierung könnte die Bindung von MYC an seine Erkennungs-Sequenz begünstigen und somit eine transkriptionelle Aktivierung MYC-abhängiger Gene, möglicherweise auch *DEFB1*, indirekt vermitteln.

(ii) Untersuchungen der letzten Jahre belegen zudem, dass bestimmte Histon-Modifikationen stark miteinander und mit dem Ausmaß der Bindung von MYC im Promotorbereich von MYC-Zielgenen korrelieren^{242,243}. So weisen beispielsweise hochaffine MYC-Promotoren ein selektives Muster von H3/H4-Acetylierungen (wie beispielsweise H3K9-Acetyl) sowie H3K4-Mono-, Di- und Tri-Methylierungen auf^{243,244}. Diese stehen in Zusammenhang mit aktiven Transkriptionsvorgängen und werden deshalb als aktive "Chromatin-Marker" bezeichnet^{139,147}. Die höchste Korrelation konnte dabei für die Tri-Methylierung des Histons H4 am Lysin-4 (H3K4me₃) nachgewiesen werden²⁴³. Auch ChIP-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigen in Zellen der BAL-Flüssigkeit eine starke signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und H3K4me₃ im 5'-Bereich des Gens (Abbildung 3-23).

(iii) Des Weiteren ist bekannt, dass das Genaktivator-Protein MYC nicht nur selbst an das "aktive" Chromatin bindet, sondern auch direkt weitere Histon-Modifizierungen vermittelt²⁴². MYC rekrutiert eine Vielzahl von HATs wie beispielsweise GCN5 (*general control of amino-acid-synthesis protein-5*) oder p300/CBP (*p300/CREB-binding protein*) und reguliert so die Acetylierung der Histone H3 und H4 im umgebenden Chromatin²⁴⁵. Martinato *et al.*²⁴² zeigten zudem eine Korrelation zwischen den MYC-vermittelten H3/H4-Acetylierungen und der Aktivierung der mRNA-Expression von MYC-Zielgenen. Auch ChIP-Analysen der vorliegenden Arbeit belegen in Zellen der BAL-Flüssigkeit eine starke signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und H3-Acetyl in der kodierenden Region von Exon 1 und dem Intronbereich des Gens (Abschnitt 3.4.4.2). Das Fehlen einer solchen Korrelation für H3K9-Acetyl könnte dabei durch die Substrat-Spezifität und -Selektivität der HATs erklärt werden. Erst im Jahr 2007 berichteten Secombe *et al.*²⁴⁶ von der Assoziation von MYC mit einer H3K4me₃-spezifischen Demethylase. Kurze Zeit später konnte auch eine Bindung von MYC an den H3K4me₃-Methyl-Transferasekomplex gezeigt werden²⁴². Das bedeutet, dass MYC nicht nur den Acetylierungsstatus der Histone bestimmt, sondern wahrscheinlich auch an der Regulation von H3K4me₃ beteiligt ist. Damit könnte nicht nur eine starke Korrelation zwischen H3K4me₃ und der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit erklärt werden (Abbildung 3-23); vielmehr wäre es auch eine Erklärung für

den Anstieg von H3K4me₃ im gesamten Gen-Abschnitt von *DEFB1*, der unter Einfluss von ZdCyt und TSA in der Zellkultur zu verzeichnen war (Abbildung 3-22).

(iv) Durch computergestützte Analysen wurden von Sherman *et al.*²⁴⁷ mehrere E-Box-like-Konsensus-Sequenzen im 5'-Bereich von *DEFB1* identifiziert und als putative MYC-Bindungsstellen beschrieben. Sherman und Froy²³⁹ haben zudem durch Einführen von Mutationen in diese Sequenzen deren funktionelle Rolle in der Regulation von *DEFB1* bewiesen. Durch ChIP-Analysen konnte 2009 in unserer Arbeitsgruppe erstmals eine direkte Bindung von MYC in mehreren Promotorbereichen von *DEFB1* unter TSA-Behandlung nachgewiesen werden (Kimberley Kallsen, persönliche Mitteilung).

Dagegen ist bis heute noch nicht bekannt, ob MYC neben H3K4me₃ auch mit anderen Methylierungs-Markern wie H3K9me₂, H3K9me₃ sowie H4K20me₃ in Zusammenhang steht. Diese werden generell als stabile Marker des konstitutiven/fakultativen Heterochromatins beschrieben und mit der epigenetischen Inaktivierung und dem langfristigen Abschalten der Genexpression in Verbindung gebracht^{147,150,151}. Neuere Untersuchungen belegen allerdings eine dynamische Natur dieser Methylierungs-Marker: Chang *et al.*²⁴⁸ berichteten vom Zusammenhang zwischen H3K9me₂ und periodischen transkriptionellen Veränderungen während der T-Zell-Entwicklung und T_{Helfer2}-Differenzierung. Andere wiederum zeigten eine Assoziation von H3K9me₃ mit aktiven Transkriptions-Vorgängen und den Phasen der RNA-Elongation^{249,250}. Auch ChIP-Analysen dieser Arbeit zeigen einen Anstieg von H3K9me₃ im *DEFB1*-Promotor nach der Aktivierung der *DEFB1*-mRNA-Expression mit TSA und ZdCyt in der Zellkultur (Abbildung 3-22). Sie untermauern die Hypothese, dass H3K9me₃ nicht nur mit der Repression und Gen-Inaktivierung in Verbindung steht, sondern auch mit aktiven Transkriptionsvorgängen assoziiert sein kann. Signifikante Korrelationen zwischen H3K9me₂, H3K9me₃ sowie H4K20me₃ und der *DEFB1*-mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit (Abschnitt 3.4.4.4) sprechen ebenfalls für die einzigartige, bivalente Rolle dieser Modifikation in der Genregulation. Möglicherweise stellen sie einen eigenen dynamischen Regulationsmechanismus von *DEFB1* dar, welcher einem ständigen Einfluss aus der "Umwelt" unterliegt und damit durch eine Vielzahl von Faktoren geprägt wird. Um diese Vermutungen zu bestätigen, sind auch hier noch weiterführende Untersuchungen erforderlich.

Aber könnte man mit dieser Hypothese auch die gestörte Genexpression von *DEFB1* in der Lunge von COPD-Patienten erklären? Auch in diesem Fall gibt es mehrere Berührungspunkte zwischen einer derartigen Art der Genregulation von *DEFB1* und der COPD: Immer häufiger wird die COPD in der Literatur als "epigenetische Krankheit" diskutiert^{13,165,213}. Ito *et al.*¹⁶⁶ berichteten über eine verminderte Aktivität von HDACs in der Lunge von COPD-Patienten. Dabei stellten sie nicht nur einen Funktionsverlust von HDACs

fest, sondern konnten gleichzeitig sowohl einen Rückgang der mRNA-Expression von *HDAC2*, *3*, *5* und *8* als auch des HDAC2-Proteins nachweisen. Da das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung durch die enzymatischen Aktivitäten von HATs und HDACs aufrechterhalten wird, kann eine Dysregulation dieses Gleichgewichts einen Einfluss auf die Regulation spezifischer Gene nehmen. Dabei wird angenommen, dass niedrige Enzymaktivitäten die Produktion inflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise CXCL8 in der Lunge von COPD-Patienten verstärken und somit nicht nur den Entzündungsprozess unterstützen, sondern auch zur Chronifizierung der Erkrankung beitragen^{166,213}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten allerdings die bereits von Ito *et al.*¹⁶⁶ publizierten Daten nicht bestätigen, was möglicherweise auf unterschiedliches Material zurückzuführen ist: Während Ito *et al.*¹⁶⁶ ihre Analysen der Genexpression von HDACs mit Lungengewebe und Alveolarmakrophagen durchgeführt hatten, wurden in dieser Arbeit Bronchialschleimhautbiopsien verwendet. Dabei war weder eine verminderte *HDAC*-mRNA-Expression (*HDAC1-11*) bei COPD-Patienten noch ein Zusammenhang dieser Expression mit den Parametern der Lungenfunktion wie FEV₁ und VC nachweisbar. Dagegen konnte ein Anstieg der *HDAC1*-mRNA-Expression bei COPD-Patienten verzeichnet werden, welche allerdings weder mit FEV₁ und VC noch dem Quotienten FEV₁/VC korrelierte (Abbildung 3-27). Ein Zusammenhang zwischen einer gestörten Expression von *HDAC1* und der COPD wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Möglicherweise stellt die verstärkte transkriptionelle Aktivierung von *HDAC1* im Biopsiematerial der COPD-Patienten eine Art Rückkopplungsmechanismus dar, welcher dem ständigen proteolytischen Abbau von HDACs während einer COPD entgegenwirkt. Dass ein solcher Zusammenhang zwischen der Hemmung der Enzym-Aktivität und der Aktivierung der mRNA-Expression einiger HDACs besteht, zeigen zum einen Ergebnisse dieser Arbeit (Abschnitt 3.4.5.3). Zum anderen wird dieser durch die Studie von Dangond und Gullans²⁵¹ unterstützt: Sie berichteten von einer Aktivierung der mRNA-Expression aller drei von ihnen untersuchten HDACs (*HDAC1-3*) unter TSA-Behandlung und postulierten einen derartigen kompensatorischen "feedback"-Kontroll-Mechanismus der *HDAC*-Genregulation. Interessanterweise zeigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht nur eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *DEFB1* und *HDAC1*. Eine entsprechende Abhängigkeit war ebenfalls zwischen *DEFB1* und der mRNA-Expression von *HDAC2*, *3*, *5* und *8* nachweisbar (Abbildung 3-28), welche von Ito *et al.*¹⁶⁶ im Zusammenhang mit der COPD diskutiert wurden. Ob eine funktionelle Beziehung zwischen der Expression dieser HDACs und *DEFB1* besteht, bleibt allerdings noch unklar. Über die Mechanismen der Enzym-Inaktivierung und dem nachfolgenden proteolytischen Abbau von HDACs in der COPD wird in der Literatur intensiv diskutiert:

(i) So konnte bereits gezeigt werden, dass der Funktionsverlust einiger HDACs auf dem massiven oxidativen Stress in der Lunge der COPD-Patienten beruht, welcher zu einer verstärkten Bildung hochreaktiver Oxidantien wie beispielsweise das Superoxid-Anionenradikal O_2^- oder H_2O_2 , einer Überaktivierung der NO-Synthase und einer gesteigerten NO-Produktion führt²¹³. Dabei belegen die Studien von Ito *et al.*²⁵² und Moodie *et al.*²⁵³, dass die Funktion von HDACs direkt durch Oxidantien wie H_2O_2 oder kovalente Enzym-Modifizierungen wie beispielsweise S-Nitrosylierung beeinträchtigt werden kann.

(ii) Insbesondere im Fall von HDAC1 ist bekannt, dass es sich dabei um ein Phosphoprotein handelt, welches in drei Isoformen vorkommt, die sich durch unterschiedliche biologische Eigenschaften wie Protein-Protein-Interaktionen und enzymatische Aktivität auszeichnen^{254,255}. Während die Phosphorylierungen am Ser⁴²¹ und Ser⁴²³ (sog. basale oder konstitutive Phosphorylierung) für die enzymatische Aktivität von HDAC1 und die Bildung des mSin3a-Repressor-Komplexes unerlässlich sind, führen sowohl eine Dephosphorylierung als auch eine Hyperphosphorylierung zum Verlust ihrer Aktivität und anschließender proteosomaler Degradierung^{213,254}. Auch zeigten Galasinski *et al.*²⁵⁴, dass eine HDAC1-Hyperphosphorylierung mit einer Beeinträchtigung der Protein-Protein-Interaktionen im mSin3a-Repressor-Komplex einhergeht. Dies resultiert in der Freisetzung der einzelnen Komponenten des Komplexes, Veränderungen der zellulären Lokalisation und dem Verlust der HDAC-Aktivität.

(iii) Während die von Takahashi *et al.*²⁵⁶ publizierten Daten zeigen, dass oxidativer Stress auch zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität von Casein-Kinase-2 (CK2) führt, berichteten Tsai *et al.*²⁵⁷ von der Beteiligung der CK2 in der Phosphorylierung von HDAC1 und Regulation ihrer Aktivität.

Diese Erkenntnisse ergeben im Hinblick auf die Regulation der *DEFB1*-Genexpression in der Lunge von COPD-Patienten folgende Möglichkeiten: Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Oxidantien und Antioxidantien könnte zur Aktivierung von Proteinkinasen wie beispielsweise CK2 führen, was in einer Hyperphosphorylierung von HDAC1 und Verlust ihrer enzymatischen Aktivität resultiert. Dies geht mit einer Beeinträchtigung der Protein-Protein-Interaktionen im mSin3a-Repressor-Komplex einher und könnte dann zu einer Freisetzung von MYC aus dem Komplex führen. Der verstärkte proteolytische Abbau von HDACs und eine verminderte HDAC-Aktivität, was beides spezifisch für die COPD zu sein scheint, könnte zusätzlich die Freisetzung von MYC unterstützen. Auch die Wirkung pharmakologischer Wirkstoffe wie ZdCyt und TSA könnte damit erklärt werden. Sie steuern die Aktivität von *DEFB1* weniger unmittelbar, sondern entweder durch die Veränderung der Bindungseigenschaften von MYC an die DNA (beispielsweise durch die Demethylierung der DNA) oder durch Freisetzung von MYC aus dem mSin3A-Repressor-Komplex (beispielsweise durch die Hemmung der HDAC1-Aktivität). Dies würde zu einer Aktivierung

von MYC führen, welches im Promotorbereich von *DEFB1* bindet und durch Rekrutierung spezifischer HATs und HMTs den Aufbau eines aktiven "Histon-Codes" vermittelt. Die Änderung des epigenetischen Codes könnte dann in einer verstärkten Transkription von *DEFB1* in der Lunge von COPD-Patienten resultieren.

4.4 Fazit

Der Wissensfortschritt der letzten Jahre hat tiefgreifende Einblicke in die komplexen Pathomechanismen der COPD geliefert. Die Bedeutung der angeborenen antimikrobiellen Abwehr der Atemwege und ihre Relevanz für die vielfältigen klinischen Phänomene einer COPD wurden dabei jedoch vernachlässigt. Bei zusammenfassender Betrachtung bekräftigen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse die Hypothese, dass *DEFB1* in die molekulare Maschinerie der COPD-Pathogenese eingebunden ist. Der präzise Zusammenhang zwischen der Genexpression von *DEFB1* und der klinisch manifestierten Erkrankung und auch die starke Korrelation mit wesentlichen Parametern der COPD-Diagnostik lassen *DEFB1* als einen möglichen prognostischen Marker für das Fortschreiten und die Schwere dieser Erkrankung diskutieren. Auch epigenetische Regulatoren spielen im Rahmen der Pathogenese der COPD eine wichtige Rolle; deren Funktion ist bis heute allerdings noch weitgehend ungeklärt. Derzeit sind einige wenige HDAC-Inhibitoren und demethylierende Substanzen allein oder in Kombination zugelassen oder befinden sich noch in klinischer Erprobung. Die ersten Einblicke in die epigenetischen Kontroll-Mechanismen der *DEFB1*-Genexpression in dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse und regulatorische Zusammenhänge in dieser molekularen Maschinerie und bieten viele Ansatzpunkte für weiterführende Studien. Das genaue Verständnis dieser funktionellen Zusammenhänge stellt die Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden und Therapiestrategien dar.

REFERENZEN

1. MITCHELL,R.S. & FILLEY,G.F. CHRONIC OBSTRUCTIVE BRONCHOPULMONARY DISEASE. I. CLINICAL FEATURES. *Am. Rev. Respir. Dis.* **89**, 360-371 (1964).
2. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev. Respir. Dis.* **136**, 225-244 (1987).
3. Vogelmeier,C. *et al.* [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* **61**, e1-40 (2007).
4. Hogg,J.C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **364**, 709-721 (2004).
5. Anthonisen,N.R. The British hypothesis revisited. *Eur Respir J* **23**, 657-658 (2004).
6. MacNee,W. Acute exacerbations of COPD. *Swiss. Med. Wkly.* **133**, 247-257 (2003).
7. MacIntyre,N. & Huang,Y.C. Acute exacerbations and respiratory failure in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am Thorac. Soc.* **5**, 530-535 (2008).
8. Anzueto,A., Sethi,S. & Martinez,F.J. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am Thorac. Soc.* **4**, 554-564 (2007).
9. Rabe,K.F. *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **176**, 532-555 (2007).
10. Barnes,P.J., Shapiro,S.D. & Pauwels,R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur. Respir. J* **22**, 672-688 (2003).
11. Demedts,I.K., Demoor,T., Bracke,K.R., Joos,G.F. & Brusselle,G.G. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir. Res.* **7**, 53 (2006).
12. Barnes,P.J. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest* **129**, 151-155 (2006).
13. Mroz,R.M., Noparlik,J., Chyczewska,E., Braszko,J.J. & Holownia,A. Molecular basis of chronic inflammation in lung diseases: new therapeutic approach. *J Physiol Pharmacol.* **58 Suppl 5**, 453-460 (2007).
14. Bhavsar,P., Ahmad,T. & Adcock,I.M. The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *J Allergy Clin. Immunol.* **121**, 580-584 (2008).
15. Bals,R. & Hiemstra,P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* **23**, 327-333 (2004).
16. Knowles,M.R. & Boucher,R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest* **109**, 571-577 (2002).
17. Diamond,G., Legarda,D. & Ryan,L.K. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.* **173**, 27-38 (2000).
18. Martin,T.R. & Frevert,C.W. Innate immunity in the lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 403-411 (2005).

19. Laube,D.M., Yim,S., Ryan,L.K., Kisich,K.O. & Diamond,G. Antimicrobial peptides in the airway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**, 153-182 (2006).
20. Cole,A.M., Dewan,P. & Ganz,T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect. Immun.* **67**, 3267-3275 (1999).
21. Weldon,S., McGarry,N., Taggart,C.C. & McElvaney,N.G. The role of secretory leucoprotease inhibitor in the resolution of inflammatory responses. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 273-276 (2007).
22. Zaas,A.K. & Schwartz,D.A. Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 195-202 (2005).
23. Kato,A. & Schleimer,R.P. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 711-720 (2007).
24. Takahashi,H., Sano,H., Chiba,H. & Kuroki,Y. Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases. *Curr. Pharm. Des* **12**, 589-598 (2006).
25. Hermans,C. & Bernard,A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **159**, 646-678 (1999).
26. He,X., Han,B. & Liu,M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **292**, L1039-L1049 (2007).
27. Haagsman,H.P., Hogenkamp,A., van Eijk,M. & Veldhuizen,E.J. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology.* **93**, 288-294 (2008).
28. Anderson,K.V., Bokla,L. & Nusslein-Volhard,C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-798 (1985).
29. Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M. & Hoffmann,J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
30. Kawai,T. & Akira,S. TLR signaling. *Cell Death. Differ.* **13**, 816-825 (2006).
31. Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
32. Kaisho,T. & Akira,S. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 979-987 (2006).
33. Poltorak,A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
34. Hoshino,K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749-3752 (1999).
35. Takeuchi,O. *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451 (1999).
36. Kaparakis,M., Philpott,D.J. & Ferrero,R.L. Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 495-502 (2007).
37. Girardin,S.E. *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**, 8869-8872 (2003).
38. Chamailard,M. *et al.* An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**, 702-707 (2003).

39. Lee, M.S. & Kim, Y.J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 447-480 (2007).
40. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511 (2004).
41. Delbridge, L.M. & O'Riordan, M.X. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 10-16 (2007).
42. Kabelitz, D. & Medzhitov, R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
43. Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K. & Takada, H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* **44**, 3100-3111 (2007).
44. Uehara, A. & Takada, H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *J. Dent. Res.* **87**, 682-686 (2008).
45. Froy, O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol.* **7**, 1387-1397 (2005).
46. Menendez, A. & Brett, F.B. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 385-391 (2007).
47. Alexander Fleming. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* **93**, 306-317 (1922).
48. Yamasaki, K. & Gallo, R.L. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur. J. Dermatol.* **18**, 11-21 (2008).
49. Brown, K.L. & Hancock, R.E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 24-30 (2006).
50. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395 (2002).
51. Hiemstra, P.S. The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp. Lung Res.* **33**, 537-542 (2007).
52. Ganz, T. *et al.* Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest* **76**, 1427-1435 (1985).
53. Selsted, M.E., Harwig, S.S., Ganz, T., Schilling, J.W. & Lehrer, R.I. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest* **76**, 1436-1439 (1985).
54. Wong, J.H., Xia, L. & Ng, T.B. A review of defensins of diverse origins. *Curr. Protein Pept. Sci* **8**, 446-459 (2007).
55. Ganz, T. Antimicrobial polypeptides. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 34-38 (2004).
56. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 710-720 (2003).
57. Lehrer, R.I. Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 727-738 (2004).
58. Gabay, J.E. & Almeida, R.P. Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 97-102 (1993).
59. Ganz, T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **55**, 568-571 (1987).

60. Ihi,T., Nakazato,M., Mukae,H. & Matsukura,S. Elevated concentrations of human neutrophil peptides in plasma, blood, and body fluids from patients with infections. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 1134-1140 (1997).
61. Ashitani,J. *et al.* High concentrations of alpha-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Life Sci* **75**, 1123-1134 (2004).
62. Frye,M. *et al.* Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells. *J. Clin. Pathol.* **53**, 770-773 (2000).
63. Bensch,K.W., Raida,M., Magert,H.J., Schulz-Knappe,P. & Forssmann,W.G. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331-335 (1995).
64. Zhao,C., Wang,I. & Lehrer,R.I. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* **396**, 319-322 (1996).
65. Harder,J., Bartels,J., Christophers,E. & Schroder,J.M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861 (1997).
66. Harder,J., Bartels,J., Christophers,E. & Schroder,J.M. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**, 5707-5713 (2001).
67. Bals,R. *et al.* Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest* **102**, 874-880 (1998).
68. Hiratsuka,T. *et al.* Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax* **58**, 425-430 (2003).
69. Singh,P.K. *et al.* Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 14961-14966 (1998).
70. Ishimoto,H. *et al.* Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur. Respir. J.* **27**, 253-260 (2006).
71. Harder,J. *et al.* Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 714-721 (2000).
72. MacRedmond,R., Greene,C., Taggart,C.C., McElvaney,N. & O'Neill,S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir Res.* **6**, 116 (2005).
73. Hertz,C.J. *et al.* Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol.* **171**, 6820-6826 (2003).
74. Kao,C.Y. *et al.* IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J. Immunol.* **173**, 3482-3491 (2004).
75. Garcia,J.R. *et al.* 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**, 257-264 (2001).
76. Garcia,J.R. *et al.* Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819-1821 (2001).
77. Menendez,A. & Brett,F.B. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 385-391 (2007).

78. Klotman, M.E. & Chang, T.L. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 447-456 (2006).
79. Aerts, A.M., Francois, I.E., Cammue, B.P. & Thevissen, K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 2069-2079 (2008).
80. Selsted, M.E. & Ouellette, A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* **6**, 551-557 (2005).
81. Hancock, R.E. & Rozek, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 143-149 (2002).
82. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R.E. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491-511 (2006).
83. Lehrer, R.I. *et al.* Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest* **84**, 553-561 (1989).
84. Shimoda, M., Ohki, K., Shimamoto, Y. & Kohashi, O. Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **63**, 2886-2891 (1995).
85. Lichtenstein, A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *J. Clin. Invest* **88**, 93-100 (1991).
86. Fujii, G., Selsted, M.E. & Eisenberg, D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* **2**, 1301-1312 (1993).
87. Gera, J.F. & Lichtenstein, A. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cell Immunol.* **138**, 108-120 (1991).
88. Powers, J.P. & Hancock, R.E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691 (2003).
89. Feng, Z. *et al.* Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J. Dent. Res.* **84**, 445-450 (2005).
90. Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W. & Edgerton, M. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 154-161 (2007).
91. Vylkova, S., Sun, J.N. & Edgerton, M. The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. *Purinergic. Signal.* **3**, 91-97 (2007).
92. Daher, K.A., Selsted, M.E. & Lehrer, R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* **60**, 1068-1074 (1986).
93. Kota, S. *et al.* Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus. *J. Biol. Chem.* **283**, 22417-22429 (2008).
94. Niyonsaba, F., Ogawa, H. & Nagaoka, I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* **111**, 273-281 (2004).
95. Yang, D. *et al.* Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528 (1999).
96. Yang, D., Chen, Q., Chertov, O. & Oppenheim, J.J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 9-14 (2000).

97. Niyonsaba,F., Someya,A., Hirata,M., Ogawa,H. & Nagaoka,I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1066-1075 (2001).
98. Chen,X. *et al.* Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur. J. Immunol.* **37**, 434-444 (2007).
99. Aarbiou,J. *et al.* Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 167-174 (2002).
100. Aarbiou,J. *et al.* Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 193-201 (2004).
101. Harder,J., Glaser,R. & Schroder,J.M. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin. Res.* **13**, 317-338 (2007).
102. Moore,B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 739-744 (1965).
103. Santamaria-Kisiel,L., Rintala-Dempsey,A.C. & Shaw,G.S. Calcium-dependent and - independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. J.* **396**, 201-214 (2006).
104. Zimmer,D.B., Cornwall,E.H., Landar,A. & Song,W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.* **37**, 417-429 (1995).
105. Eckert,R.L. *et al.* S100 proteins in the epidermis. *J. Invest Dermatol.* **123**, 23-33 (2004).
106. Steinbakk,M. *et al.* Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* **336**, 763-765 (1990).
107. Gottsch,J.D., Eisinger,S.W., Liu,S.H. & Scott,A.L. Calgranulin C has filariacidal and filariastatic activity. *Infect. Immun.* **67**, 6631-6636 (1999).
108. Glaser,R. *et al.* Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nat. Immunol.* **6**, 57-64 (2005).
109. Eberhard,J. *et al.* The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human beta-defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators: a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* **23**, 21-28 (2008).
110. Walter Jones. THE ACTION OF BOILED PANCREAS EXTRACT ON YEAST NUCLEIC ACID. *Am J Physiol* **52**, 203-207 (1920).
111. Dubos,R.J. & Thompson,R.H.S. THE DECOMPOSITION OF YEAST NUCLEIC ACID BY A HEAT-RESISTANT ENZYME. *J. Biol. Chem.* **124**, 501-510 (1938).
112. Rosenberg,H.F. & Domachowske,J.B. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* **70**, 691-698 (2001).
113. Lehrer,R.I. *et al.* Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol* **142**, 4428-4434 (1989).
114. Hooper,L.V., Stappenbeck,T.S., Hong,C.V. & Gordon,J.I. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* **4**, 269-273 (2003).
115. Harder,J. & Schroder,J.M. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* **277**, 46779-46784 (2002).
116. Zhang,J., Dyer,K.D. & Rosenberg,H.F. Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* **31**, 602-607 (2003).

117. Huang, Y.C. *et al.* The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 4626-4633 (2007).
118. Rudolph, B. *et al.* Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3194-3196 (2006).
119. Kornberg, R.D. & Lorch, Y. Chromatin rules. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 986-988 (2007).
120. Van Speybroeck, L. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **981**, 61-81 (2002).
121. Mahner, M. & Bunge, M.A. *Philosophische Grundlagen der Biologie.*, pp. 271-300 (Springer, 2000).
122. Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**, 396-398 (2007).
123. Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. & Shilatifard, A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* **23**, 781-783 (2009).
124. Esteller, M. & Almouzni, G. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. *EMBO Rep.* **6**, 624-628 (2005).
125. Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635-638 (2007).
126. Becker, P.B. Gene regulation: a finger on the mark. *Nature* **442**, 31-32 (2006).
127. Kiefer, J.C. Epigenetics in development. *Dev. Dyn.* **236**, 1144-1156 (2007).
128. Grewal, S.I. & Elgin, S.C. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**, 399-406 (2007).
129. Johnson, B. & Coghill, D. RESEARCHES ON PYRIMIDINES. C111. THE DISCOVERY OF 5-METHYL-CYTOSINE IN TUBERCULINIC ACID, THE NUCLEIC ACID OF THE TUBERCLE BACILLUS 1. *Journal of the American Chemical Society* **47**, 2838-2844 (1925).
130. HOTCHKISS, R.D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* **175**, 315-332 (1948).
131. WYATT, G.R. Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochem. J* **48**, 581-584 (1951).
132. Riggs, A.D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**, 9-25 (1975).
133. Holliday, R. & Pugh, J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226-232 (1975).
134. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21 (2002).
135. Bestor, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol Genet.* **9**, 2395-2402 (2000).
136. Grandjean, V., Yaman, R., Cuzin, F. & Rassoulzadegan, M. Inheritance of an epigenetic mark: the CpG DNA methyltransferase 1 is required for de novo establishment of a complex pattern of non-CpG methylation. *PLoS. ONE.* **2**, e1136 (2007).
137. Illingworth, R. *et al.* A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS. Biol* **6**, e22 (2008).

138. Zhao,Z. & Han,L. CpG islands: Algorithms and applications in methylation studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009).
139. Delcuve,G.P., Rastegar,M. & Davie,J.R. Epigenetic control. *J Cell Physiol* **219**, 243-250 (2009).
140. Miranda,T.B. & Jones,P.A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* **213**, 384-390 (2007).
141. ALLFREY,V.G., FAULKNER,R. & MIRSKY,A.E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **51**, 786-794 (1964).
142. Brownell,J.E. *et al.* Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851 (1996).
143. Rea,S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599 (2000).
144. Strahl,B.D. & Allis,C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45 (2000).
145. Bhaumik,S.R., Smith,E. & Shilatifard,A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1008-1016 (2007).
146. Li,B., Carey,M. & Workman,J.L. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719 (2007).
147. Berger,S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412 (2007).
148. Peterson,C.L. & Laniel,M.A. Histones and histone modifications. *Curr. Biol* **14**, R546-R551 (2004).
149. Latham,J.A. & Dent,S.Y. Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1017-1024 (2007).
150. Lachner,M. & Jenuwein,T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol* **14**, 286-298 (2002).
151. Jenuwein,T. & Allis,C.D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080 (2001).
152. Taunton,J., Hassig,C.A. & Schreiber,S.L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411 (1996).
153. Zhang,Y., Fang,H., Jiao,J. & Xu,W. The structure and function of histone deacetylases: the target for anti-cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* **15**, 2840-2849 (2008).
154. Haberland,M., Montgomery,R.L. & Olson,E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev. Genet.* **10**, 32-42 (2009).
155. Yang,W.M., Inouye,C., Zeng,Y., Bearss,D. & Seto,E. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global repressor RPD3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12845-12850 (1996).
156. Yang,W.M., Yao,Y.L., Sun,J.M., Davie,J.R. & Seto,E. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem.* **272**, 28001-28007 (1997).

157. Hu,E. *et al.* Cloning and Characterization of a Novel Human Class I Histone Deacetylase That Functions as a Transcription Repressor. *J. Biol. Chem.* **275**, 15254-15264 (2000).
158. Fischle,W. *et al.* A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem.* **274**, 11713-11720 (1999).
159. Grozinger,C.M., Hassig,C.A. & Schreiber,S.L. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **96**, 4868-4873 (1999).
160. Kao,H.Y., Downes,M., Ordentlich,P. & Evans,R.M. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* **14**, 55-66 (2000).
161. Zhou,X., Marks,P.A., Rifkind,R.A. & Richon,V.M. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **98**, 10572-10577 (2001).
162. Tong,J.J., Liu,J., Bertos,N.R. & Yang,X.J. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1114-1123 (2002).
163. Gao,L., Cueto,M.A., Asselbergs,F. & Atadja,P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* **277**, 25748-25755 (2002).
164. Gray,S.G. & Dangond,F. Rationale for the use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic modality in multiple sclerosis. *Epigenetics.* **1**, 67-75 (2006).
165. Adcock,I.M., Ford,P., Ito,K. & Barnes,P.J. Epigenetics and airways disease. *Respir. Res.* **7**, 21 (2006).
166. Ito,K. *et al.* Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J Med.* **352**, 1967-1976 (2005).
167. Beisswenger,C. & Bals,R. Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem. Immunol. Allergy* **86**, 55-71 (2005).
168. Herr,C., Shaykhiev,R. & Bals,R. The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **7**, 1449-1461 (2007).
169. Matsushita,I. *et al.* Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 17-22 (2002).
170. Haussinger,K. *et al.* [Recommendations for quality standards in bronchoscopy]. *Pneumologie* **58**, 344-356 (2004).
171. Bullwinkel,J. *et al.* Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* **206**, 624-635 (2006).
172. McManus,T.E. *et al.* Respiratory viral infection in exacerbations of COPD. *Respir Med.* **102**, 1575-1580 (2008).
173. Rohde,G. *et al.* Inflammatory response in acute viral exacerbations of COPD. *Infection* **36**, 427-433 (2008).
174. Sethi,S. & Murphy,T.F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J Med.* **359**, 2355-2365 (2008).
175. Rice,P., Longden,I. & Bleasby,A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* **16**, 276-277 (2000).

176. Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261-282 (1987).
177. Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-5495 (2002).
178. Richon, V.M. & O'Brien, J.P. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **8**, 662-664 (2002).
179. Barnes, P.J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* **56**, 515-548 (2004).
180. Mukhopadhyay, S., Hoidal, J.R. & Mukherjee, T.K. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res.* **7**, 125 (2006).
181. Di Stefano, A., Capelli, A. & Donner, C.F. Role of interleukin-8 in the pathogenesis and treatment of COPD. *Chest* **126**, 676-678 (2004).
182. Hiemstra, P.S., van Wetering, S. & Stolk, J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* **12**, 1200-1208 (1998).
183. Wood, A.M. & Stockley, R.A. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* **7**, 130 (2006).
184. Stoller, J.K. & Aboussouan, L.S. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* **365**, 2225-2236 (2005).
185. Palmer, L.J. *et al.* Genome-wide linkage analysis of bronchodilator responsiveness and post-bronchodilator spirometric phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1199-1210 (2003).
186. Silverman, E.K. *et al.* Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum. Genet.* **70**, 1229-1239 (2002).
187. Silverman, E.K. *et al.* Genome-wide linkage analysis of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 623-632 (2002).
188. Spencer, L.T. *et al.* Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L514-L520 (2004).
189. Levy, H. *et al.* Association of defensin beta-1 gene polymorphisms with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 252-258 (2005).
190. McCray, P.B., Jr. & Bentley, L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**, 343-349 (1997).
191. Goldman, M.J. *et al.* Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560 (1997).
192. Lee, S.H., Lim, H.H., Lee, H.M. & Choi, J.O. Expression of human beta-defensin 1 mRNA in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.* **120**, 58-61 (2000).
193. Liu, L., Zhao, C., Heng, H.H. & Ganz, T. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* **43**, 316-320 (1997).
194. Dork, T. & Stuhmann, M. Polymorphisms of the human beta-defensin-1 gene. *Mol Cell Probes* **12**, 171-173 (1998).

195. Hersh,C.P. *et al.* Genetic linkage and association analysis of COPD-related traits on chromosome 8p. *COPD* **3**, 189-194 (2006).
196. Vankeerberghen,A. *et al.* Distribution of human [beta]-defensin polymorphisms in various control and cystic fibrosis populations. *Genomics* **85**, 574-581 (2005).
197. Casanova,C. *et al.* Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **171**, 591-597 (2005).
198. Dauletbaev,N. *et al.* Expression of human beta defensin (HBD-1 and HBD-2) mRNA in nasal epithelia of adult cystic fibrosis patients, healthy individuals, and individuals with acute cold. *Respiration* **69**, 46-51 (2002).
199. Duits,L.A., Ravensbergen,B., Rademaker,M., Hiemstra,P.S. & Nibbering,P.H. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **106**, 517-525 (2002).
200. Malik,A.N. & Al Kafaji,G. Glucose regulation of beta-defensin-1 mRNA in human renal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 318-323 (2007).
201. Zucht,H.D. *et al.* Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med. Res.* **3**, 315-323 (1998).
202. Wenghoefer,M. *et al.* Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours. *BMC. Cancer* **8**, 290 (2008).
203. Bullard,R.S. *et al.* Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. *Mol Immunol* **45**, 839-848 (2008).
204. Bose,S.K., Gibson,W., Bullard,R.S. & Donald,C.D. PAX2 oncogene negatively regulates the expression of the host defense peptide human beta defensin-1 in prostate cancer. *Mol Immunol* **46**, 1140-1148 (2009).
205. Madsen,P. *et al.* Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J. Invest Dermatol.* **97**, 701-712 (1991).
206. Bryborn,M., Adner,M. & Cardell,L.O. Psoriasin, one of several new proteins identified in nasal lavage fluid from allergic and non-allergic individuals using 2-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Respir Res.* **6**, 118 (2005).
207. Meyer,J.E. *et al.* Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. *Mucosal. Immunol* **1**, 239-243 (2008).
208. Glaser,R. *et al.* The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J. Invest Dermatol.* **129**, 641-649 (2009).
209. Petersson,S., Bylander,A., Yhr,M. & Enerback,C. S100A7 (Psoriasin), highly expressed in ductal carcinoma in situ (DCIS), is regulated by IFN-gamma in mammary epithelial cells. *BMC. Cancer* **7**, 205 (2007).
210. Jinquan,T. *et al.* Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J. Invest Dermatol.* **107**, 5-10 (1996).
211. Bryborn,M., Hallden,C., Sall,T., Adner,M. & Cardell,L.O. Comprehensive evaluation of genetic variation in S100A7 suggests an association with the occurrence of allergic rhinitis. *Respir Res.* **9**, 29 (2008).
212. Carlsson,H. *et al.* Psoriasin (S100A7) and calgranulin-B (S100A9) induction is dependent on reactive oxygen species and is downregulated by Bcl-2 and antioxidants. *Cancer Biol Ther.* **4**, 998-1005 (2005).

213. Rajendrasozhan,S. *et al.* Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid. Redox. Signal.* **10**, 799-811 (2008).
214. Kulski,J.K., Lim,C.P., Dunn,D.S. & Bellgard,M. Genomic and phylogenetic analysis of the S100A7 (Psoriasin) gene duplications within the region of the S100 gene cluster on human chromosome 1q21. *J Mol Evol.* **56**, 397-406 (2003).
215. Wolf,R. *et al.* Molecular cloning and characterization of alternatively spliced mRNA isoforms from psoriatic skin encoding a novel member of the S100 family. *FASEB J* **17**, 1969-1971 (2003).
216. Wolf,R. *et al.* Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J Immunol* **181**, 1499-1506 (2008).
217. Buchau,A.S. *et al.* S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by E. coli through Toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol.* **127**, 2596-2604 (2007).
218. Holland,D.B., Bojar,R.A., Farrar,M.D. & Holland,K.T. Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by Staphylococcus epidermidis or Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 149-155 (2009).
219. Abtin,A. *et al.* Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to Escherichia coli. *FASEB J* **22**, 2168-2176 (2008).
220. Zhu,B.D., Feng,Y., Huang,N., Wu,Q. & Wang,B.Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 907-912 (2003).
221. Sun,C.Q. *et al.* Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **66**, 8542-8549 (2006).
222. Wenghoefer,M. *et al.* Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac. Surg.* **37**, 660-663 (2008).
223. Donald,C.D. *et al.* Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* **83**, 501-505 (2003).
224. Hodawadekar,S.C. & Marmorstein,R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* **26**, 5528-5540 (2007).
225. Schwab,M. *et al.* The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Immunology* **125**, 241-251 (2008).
226. Laird,P.W. Cancer epigenetics. *Hum. Mol Genet.* **14 Spec No 1**, R65-R76 (2005).
227. Sorm,F., Piskala,A., Cihak,A. & Vesely,J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* **20**, 202-203 (1964).
228. Sorm,F. & Vesely,J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* **15**, 339-343 (1968).
229. Atallah,E. & Garcia-Manero,G. Treatment strategies in myelodysplastic syndromes. *Cancer Invest* **26**, 208-216 (2008).

230. Tsuji,N., Kobayashi,M., Nagashima,K., Wakisaka,Y. & Koizumi,K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot. (Tokyo)* **29**, 1-6 (1976).
231. Yoshida,M., Kijima,M., Akita,M. & Beppu,T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* **265**, 17174-17179 (1990).
232. Smith,K.T. & Workman,J.L. Histone deacetylase inhibitors: Anticancer compounds. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 21-25 (2009).
233. Sekhavat,A., Sun,J.M. & Davie,J.R. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. *Biochem. Cell Biol* **85**, 751-758 (2007).
234. Schaubert,J., Dorschner,R.A., Yamasaki,K., Brouha,B. & Gallo,R.L. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* **118**, 509-519 (2006).
235. Kimura,Y. *et al.* MM-1 facilitates degradation of c-Myc by recruiting proteasome and a novel ubiquitin E3 ligase. *Int J Oncol.* **31**, 829-836 (2007).
236. Satou,A., Taira,T., Iguchi-Arigo,S.M. & Ariga,H. A novel transrepression pathway of c-Myc. Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein. *J Biol Chem.* **276**, 46562-46567 (2001).
237. Hagio,Y. *et al.* Distinct localizations and repression activities of MM-1 isoforms toward c-Myc. *J Cell Biochem.* **97**, 145-155 (2006).
238. Koch,H.B. *et al.* Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle* **6**, 205-217 (2007).
239. Sherman,H. & Froy,O. Expression of human beta-defensin 1 is regulated via c-Myc and the biological clock. *Mol. Immunol.* **45**, 3163-3167 (2008).
240. Hassig,C.A. *et al.* A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 3519-3524 (1998).
241. Prendergast,G.C., Lawe,D. & Ziff,E.B. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **65**, 395-407 (1991).
242. Martinato,F., Cesaroni,M., Amati,B. & Guccione,E. Analysis of Myc-induced histone modifications on target chromatin. *PLoS. ONE.* **3**, e3650 (2008).
243. Guccione,E. *et al.* Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* **8**, 764-770 (2006).
244. Fernandez,P.C. *et al.* Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* **17**, 1115-1129 (2003).
245. Cole,M.D. & Cowling,V.H. Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat Rev. Mol Cell Biol* **9**, 810-815 (2008).
246. Secombe,J., Li,L., Carlos,L. & Eisenman,R.N. The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. *Genes Dev.* **21**, 537-551 (2007).
247. Sherman,H., Chapnik,N. & Froy,O. Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Mol. Immunol.* **43**, 1617-1623 (2006).

248. Chang,S. & Aune,T.M. Dynamic changes in histone-methylation 'marks' across the locus encoding interferon-gamma during the differentiation of T helper type 2 cells. *Nat. Immunol.* **8**, 723-731 (2007).
249. Vakoc,C.R., Mandat,S.A., Olenchock,B.A. & Blobel,G.A. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**, 381-391 (2005).
250. Wiencke,J.K., Zheng,S., Morrison,Z. & Yeh,R.F. Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. *Oncogene* **27**, 2412-2421 (2008).
251. Dangond,F. & Gullans,S.R. Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 833-837 (1998).
252. Ito,K. *et al.* Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J.* **15**, 1110-1112 (2001).
253. Moodie,F.M. *et al.* Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 04-1506fje (2004).
254. Galasinski,S.C., Resing,K.A., Goodrich,J.A. & Ahn,N.G. Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem.* **277**, 19618-19626 (2002).
255. Pflum,M.K., Tong,J.K., Lane,W.S. & Schreiber,S.L. Histone Deacetylase 1 Phosphorylation Promotes Enzymatic Activity and Complex Formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 47733-47741 (2001).
256. Takahashi,M. *et al.* Oxidative stress-induced phosphorylation, degradation and aggregation of alpha-synuclein are linked to upregulated CK2 and cathepsin D. *Eur J Neurosci.* **26**, 863-874 (2007).
257. Tsai,S.C. & Seto,E. Regulation of Histone Deacetylase 2 by Protein Kinase CK2. *J. Biol. Chem.* **277**, 31826-31833 (2002).

ZUSAMMENFASSUNG

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) ist eine Volkskrankheit. Bisher ist jedoch unklar, inwieweit und durch welche Parameter der Verlust der Lungenfunktion, welcher das wesentliche klinische Merkmal der COPD darstellt, determiniert ist. Genomweite Kopplungsstudien haben hierfür relevante Regionen mit einer Kopplung auf dem Chromosom 8p identifiziert, in der die humanen Defensin-Gene innerhalb eines Gen-Clusters vorliegen. Für das Gen des humanen *Defensin, beta 1 (DEFB1)* konnte ein Allel mit einer signifikanten Assoziation zur COPD nachgewiesen werden. Die Bedeutung von *DEFB1* und seine klinische Relevanz für die vielfältigen Phänomene der COPD-Pathogenese wurden bisher jedoch nicht eingehend untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die COPD mit einer gesteigerten Expression von *DEFB1* in der Lunge einhergeht. Des Weiteren wurde eine signifikante Korrelation der *DEFB1*-Expression in Bronchialschleimhautbiopsien mit allen relevanten Parametern der COPD-Diagnostik einschließlich der allgemeinen Leistungsfähigkeit der Patienten wie 6-Min-Gehtest, Zigarettenkonsum und Lungenfunktionstests nachgewiesen. Da diese Parameter Informationen über die Prognose einer COPD liefern, stellt die *DEFB1*-Expression auch einen potentiellen prognostischen Marker für das Fortschreiten dieser Erkrankung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Mechanismen gesucht, die an der Regulation von *DEFB1* in der Lunge von COPD-Patienten beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass eine Störung der epigenetischen Regulationsvorgänge bei der Pathogenese der COPD eine Rolle spielen könnte. Während kein Zusammenhang zwischen der CpG-Methylierung im *DEFB1*-Gen und dessen Expression im Biopsiematerial von COPD-Patienten festgestellt werden konnte, zeigte eine allgemeine Inhibierung der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-Desoxycytidin im Zellkulturmodell hingegen einen starken Einfluss auf die *DEFB1*-Expression. Durch Verwendung des Histon-Deacetylase-Inhibitors Trichostatin A konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung bei der transkriptionellen Aktivierung von *DEFB1* ebenfalls eine Rolle spielt. Chromatinimmunpräzipitations-Analysen mit Zellen der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der *DEFB1*-Expression und dem Aufbau eines aktiven "Histon-Codes" und deuten ebenfalls auf eine wichtige Rolle von kovalenten Histon-Modifikationen im *DEFB1* und damit der epigenetischen Regulation bei der COPD hin. Insgesamt bekräftigen diese Daten die Hypothese, dass *DEFB1* in die molekulare Maschinerie der COPD-Pathogenese eingebunden ist. Die ersten Einblicke in die epigenetischen Kontroll-Mechanismen der *DEFB1*-Regulation liefern neue Erkenntnisse über funktionelle Zusammenhänge, die auf ein besseres Verständnis der komplexen Pathomechanismen der COPD hoffen lassen und somit zur Entwicklung neuer innovativer Therapien beitragen könnten.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a widespread disease. However, the key factors determining the decline in lung function, which is the most important clinical parameter of COPD, are not yet clear. Genome-wide linkage analyses provide evidence for significant linkage to airway obstruction susceptibility loci on chromosome 8p, the location of the human defensin gene cluster. Moreover, a genetic variation in the human *defensin, beta 1 (DEFB1)* gene was found to be associated with COPD. However, the role of *DEFB1* and its clinical relevance in diverse phenomena of COPD pathogenesis has not been extensively studied so far. The results of this dissertation demonstrate a significant increase of *DEFB1* expression in the lung of COPD patients. Furthermore, a significant correlation could be detected between *DEFB1* gene expression in biopsies of the bronchial mucosa and the relevant diagnostic parameter for COPD including exercise capacity as measured by the six-minute-walk test, cigarette smoking and lung function tests. Since these parameters are used to predict the outcome of COPD, *DEFB1* gene expression may thus be considered as a new potential predictive marker for the outcome of COPD patients. Mechanisms involved in the regulation of *DEFB1* gene expression in the lung of COPD patients were also studied, showing that a dysfunction of the epigenetic regulation could play a role in the pathogenesis of COPD. Whereas bisulfite sequencing analysis of the bronchial mucosa revealed no differences in the methylation state of *DEFB1* between COPD patients and healthy controls, an inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in cell lines resulted in a remarkable induction of *DEFB1* gene expression. Additionally, treatment of the cells with the deacetylases inhibitor trichostatin A revealed a role for acetylation in the transcriptional activation of *DEFB1*. Finally, chromatin immunoprecipitation assays with bronchoalveolar lavage fluid cells showed that *DEFB1* activation was associated with the establishment of an active "histone code" suggesting the important role of covalent histone modifications in the regulation of *DEFB1* expression. In conclusion, these data support the hypothesis that *DEFB1* is associated with pathological changes characteristic for COPD. The first insight into epigenetic control mechanisms of *DEFB1* regulation provides new knowledge about their functional contexts, which hopefully will lead to a better understanding of the complex pathomechanisms of COPD and thus may contribute to developing new innovative therapies.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5mCpG	5'-Methyl-CpG
AECOPD	akute Exazerbation einer COPD
AMP	antimikrobielles Peptid
ANG	Angiogenin, <i>ribonuclease Rnase A family, 5</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCR6	CC-Chemokin-Rezeptor-6
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CF	cystische Fibrose
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
cm	Zentimeter
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CpG	Cytosin innerhalb der Sequenz 5'-Cytosin-Guanin-3'
CXCL8	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i> , syn. <i>Human Interleukin 8</i>
DC	dendritische Zelle
DEFA5	<i>defensin, alpha 5</i> , syn. HD-5
DEFA6	<i>defensin, alpha 6</i> , syn. HD-6
DEFB1	<i>defensin, beta 1</i> , syn. HBD1
DEFB103A	<i>defensin, beta 103A</i> , syn. HBD-3
DEFB104A	<i>defensin, beta 104A</i> , syn. hBD-4
DEFB4	<i>defensin, beta 4</i> , syn. HBD-2
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pneumologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	DNA-Methyltransferase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMBOSS	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FEV ₁	1-Sekunden-Kapazität, syn. Forciertes Einsekundenvolumen
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FVC	forcierte Vitalkapazität

FZB	Forschungszentrum Borstel
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN5	<i>general control of amino-acid-synthesis protein-5</i>
h	Stunde
H	Histon
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H3K14-Acetyl	Acetylierung des Histons H3 am Lysin-14
H3K4me ₂	Di-Methylierungen am Lysin-4
H3K4me ₃	Tri-Methylierungen am Lysin-4
H3K9-Acetyl	Acetylierung des Histons H3 am Lysin-9
H3K9me ₂	Di-Methylierungen des Histons H3 am Lysin-9
H3K9me ₃	Tri-Methylierungen des Histons H3 am Lysin-9
HAT	Histon-Methyltransferase
Hda1	<i>histone deacetylases A1</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HMT	Histon-Methyltransferase
HNP	<i>human neutrophil peptide</i>
HP1	Heterochromatin-Protein-1, <i>heterochromatin protein 1</i>
IC	inspiratorische Kapazität
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITGV	intrathorakales Gasvolumen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
LINE-1	<i>long interspersed nuclear element 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	männlich
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MECP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
Mg ₂ SO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mSin3A	<i>SIN3 homolog A</i>
MYC	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> , syn. C-Myc
N	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat

Na ₂ HPO ₄	D-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
p300/CBP	<i>p300/CREB-binding protein</i>
Pam ₃ C-SK ₄	<i>N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-propyl]-(R)-cysteiny-(lysyl)3-lysine</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBG-D	<i>porphobilinogen deaminase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFDN5	<i>prefoldin subunit 5</i> , syn. MM-1
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTX3	<i>Pentraxin 3</i>
RNA	Ribonucleinsäure
Rnase	Ribonuclease
RNASE7	<i>ribonuclease, Rnase A family, 7</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPD3	<i>reduced potassium dependency 3</i>
RV	Residualvolumen
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus (MRSA, Methicillin-resistent)</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
S100	<i>soluble in 100 % ammonium sulfate</i>
S100A7	<i>S100 calcium binding protein A7</i> , syn. Psoriasin
S1-Abschnitt	498 bp großer Abschnitt mit acht CpG-Dinucleotiden
S2-Abschnitt	389 bp großer Abschnitt mit sieben CpG-Dinucleotiden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
Sir2	<i>silent information regulator 2</i>
SIRT	Sirtuine
SLPI	<i>secretory leukoprotease inhibitor</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnucleotid-Polymorphismus
sog.	sogenannte, -er, -es
SP	Surfactant-Protein
TLC	Totale Lungenkapazität
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TRIM28	<i>tripartite motif-containing 28</i> , syn. TIF1 β /KAP1
TSA	Trichostatin A
u.a.	unter anderem

UTR	untranslatierte Region
VC	inspiratorische Vitalkapazität
vgl.	vergleiche
W	weiblich
w/v	<i>weight/volume</i>
ZdCyt	5-Aza-2'-desoxycytidin
β_2 -M	β_2 -Mikroglobulin
μ M	Mikromol

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3-1 Analyse der zellulären Zusammensetzung der BAL-Flüssigkeit in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege.....	33
Abbildung 3-2 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit der COPD...	36
Abbildung 3-3 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von der Obstruktion der Atemwege.....	37
Abbildung 3-4 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von der AECOPD.	38
Abbildung 3-5 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von der 1-Sekunden-Kapazität FEV ₁	40
Abbildung 3-6 Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i>	41
Abbildung 3-7 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von der Belastungsfähigkeit.	42
Abbildung 3-8 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit vom Tabakkonsum.....	43
Abbildung 3-9 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> und <i>DEFB4</i> in Abhängigkeit von Parametern der Lungenfunktion.....	44
Abbildung 3-10 Analyse der mRNA-Expression von <i>RNASE7</i> und <i>S100A7</i> in Abhängigkeit von der Diagnose der COPD.	46
Abbildung 3-11 Einfluss von Mikroorganismen auf die mRNA-Expression von <i>RNASE7</i> und <i>S100A7</i>	47
Abbildung 3-12 Analyse von CpG-Inseln im <i>DEFB1</i> mittels "EMBOSS cpgplot @ EBI".	49
Abbildung 3-13 Analyse der CpG-Methylierung im <i>DEFB1</i> nach Bisulfit-Behandlung im Biopsiematerial.	51
Abbildung 3-14 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> nach ZdCyt-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.	53
Abbildung 3-15 Konzentrationsabhängigkeit der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression von ZdCyt.	54
Abbildung 3-16 Analyse der CpG-Methylierung von <i>DEFB1</i> nach ZdCyt-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.	56
Abbildung 3-17 Analyse der mRNA-Expression von <i>DEFB1</i> nach TSA-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.	58
Abbildung 3-18 Analyse der CpG-Methylierung von <i>DEFB1</i> nach TSA-Behandlung in A549- und NCI-H727-Zellen.	59
Abbildung 3-19 Analyse der Histon-Acetylierung von <i>DEFB1</i> nach Behandlung mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen.....	61
Abbildung 3-20 Analyse von H3-Acetyl in Abhängigkeit von der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.	63
Abbildung 3-21 Analyse von H3K9-Acetyl in Abhängigkeit von der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.	64
Abbildung 3-22 Analyse der Histon-Methylierung von <i>DEFB1</i> nach Behandlung mit ZdCyt und TSA in NCI-H727-Zellen.....	65
Abbildung 3-23 Analyse von H3K4me ₃ in Abhängigkeit von der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.	67
Abbildung 3-24 Analyse von H3K9me ₂ in Abhängigkeit von der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.	68

Abbildung 3-25 Analyse von H3K9me ₃ in Abhängigkeit von der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.....	69
Abbildung 3-26 Analyse von H4K20me ₃ in Abhängigkeit von der <i>DEFB1</i> -mRNA-Expression in Zellen der BAL-Flüssigkeit.....	70
Abbildung 3-27 Analyse der mRNA-Expression von <i>HDAC1</i> in Abhängigkeit von der COPD und Parametern der Lungenfunktion.	72
Abbildung 3-28 Korrelation zwischen der mRNA-Expression von <i>HDACs</i> und <i>DEFB1</i> im Biopsiematerial.	73
Abbildung 3-29 Effekt von TSA auf die mRNA-Expression von <i>HDACs</i> in A549-Zellen.	74
Abbildung 3-30 von TSA auf die mRNA-Expression von <i>HDACs</i> in NCI-H727-Zellen.	75

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1 Verwendete Primer.....	19
Tabelle 2-2 Verwendete <i>LightCycler</i> -Programme.....	26
Tabelle 3-1 Auswahl körperlicher und klinischer Parameter der Studienteilnehmer.	31
Tabelle 3-2 Nachgewiesene Mikroorganismen im Biopsiematerial und in Zellen der BAL-Flüssigkeit der Studienteilnehmer.	34

VERÖFFENTLICHUNGEN

ORIGINALPUBLIKATIONEN

Andresen,E., Bullwinkel,J., Lange,C. & Heine,H. Promotor methylation status is changed with altered DEFB1 gene expression in COPD. **(Abstract)** *Wiener Klinische Wochenschrift* **120**, 38 (2008)

Andresen,E., Lange,C., Strodthoff, D., Goldmann,T., Fischer,D., Sahny,H., Brandscheid,D. & Heine,H. S100A7/psoriasin expression in patients with COPD: upregulation upon microbial challenge **(Submitted)**

AUSGEWÄHLTE ABSTRACTS

Andresen,E., Goldmann,T., Vollmer,E., Lange,C. & Heine,H. (2006) Deregulated expression of antimicrobial peptides in COPD. 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology - 16th European Congress of Immunology, Paris

Andresen,E., Lange,C. & Heine,H. (2007) The role of antimicrobial peptides in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). 2nd Internatl. Symposium SFB617 (in Cooperation with the German Academy of Sciences Leopoldia), Kiel

Andresen,E., Bullwinkel,J., Lange,C. & Heine,H. (2009) Molecular basis of increased Defensin Beta-1 gene expression in the lung of COPD patients. 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Mannheim

AUSGEWÄHLTE VORTRÄGE

- | | |
|-----------|--|
| 09 / 2007 | 37 th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg
<i>Epigenetic regulation of defensin gene expression in lung epithelial cells and COPD.</i> |
| 11 / 2007 | 30. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel
<i>Epigenetic characterisation of the hBD-1 gene in COPD using ChIP and bisulfite sequencing analysis.</i> |
| 04 / 2008 | 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Lübeck
<i>Epigenetic regulation of defensin gene expression in lung epithelial cells and COPD.</i> |
| 09 / 2008 | Joint Annual Meeting of Immunology, Wien
<i>Promotor methylation status is changed with altered DEFB1 gene expression in COPD.</i> |
| 10 / 2008 | 18 th ERS Annual Congress, Berlin
<i>Epigenetic changes are associated with altered DEFB1 gene expression in COPD.</i> |

CURRICULUM VITAE

ELLEN ANDRESEN

geborene Jordan, am 15.09.1977 in Serpuchow, Russland
deutsche Staatsangehörigkeit

Rotdornweg 4
22846 Norderstedt

Tel: +(49) - 176 – 61000489
E-mail: Ellen.Andresen@web.de

Forschungszentrum Borstel

Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
Angeborene Immunität (Gruppenleiter PD Dr. Holger Heine)

Parkallee 22
23845 Borstel

Tel: +(49) - 4537 - 188 788
Fax: +(49) - 4537 - 188 697
E-mail: eandres@fz-borstel.de
URL: www.fz-borstel.de

PROMOTION

seit 07 / 2006

Promotion am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für
Medizin und Biowissenschaften

BILDUNG

11 / 2005 – 06 / 2006

Diplomarbeit am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum
für Medizin und Biowissenschaften
Titel: Die Rolle antimikrobieller Peptide in *Chronic Obstructive
Pulmonary Disease* (COPD)
Note: 1,4

10 / 2001 – 06 / 2006

Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel
Abschluss: Diplom-Biochemikerin
Note: 1,52

07 / 1999 – 09 / 2001

Eingliederungsmaßnahmen in die Bundesrepublik Deutschland
(u.a. diverse Sprachkurse zum Erlernen der deutschen Sprache)

11 / 07 / 1999

Einreise in die Bundesrepublik Deutschland

09 / 1994 – 06 / 1999

Studium der Biologie (inklusive Diplomarbeit) an der Staatlichen
Universität Tomsk, Russland;
Abschlüsse (jeweils mit Auszeichnung):
06 / 1998 Bakkalaureus für Biologie
06 / 1999 Diplom-Biologin
anerkannte Gesamtnote: 1,3

09 / 1984 – 08 / 1994

Allgemeinbildende Schule in Tomsk, Russland
Abschluss: Hochschulzugangsberechtigung

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

07 / 1998 – 06 / 1999
(studienbegleitend)

Laborant-Forscherin am Forschungsinstitut der medizinischen
Genetik in Tomsk, Russland

DANKSAGUNG

Es war eine inspirierende und lehrreiche Zeit, die ich während meiner Promotion erlebte. Dafür möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herr **PD Dr. Holger Heine** für das entgegengebrachte Vertrauen, die inspirierenden Diskussionen, eine immer offene Tür und die attraktive Betreuung während der gesamten Zeit. Danke für die hervorragende und harmonische Arbeitsatmosphäre und die tolle Stimmung in Deiner Gruppe, wo man sich so wohl fühlt, dass man sie nicht missen möchte, und die man nicht so schnell wieder finden wird!

Ein ganz spezieller und großer Dank geht außerdem an Herrn **PD Dr. Christoph Lange** für die Betreuung dieser Arbeit von der klinischen Seite und die mir stets gewährte vielfältige Unterstützung sowie ein angenehmes Arbeitsklima in unserer Zusammenarbeit bei allen klinischen Fragen.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine lieben Kollegen, die sich so viel Zeit genommen und meine Dissertation in einem noch unvollendeten Zustand mit vollem Tempo gelesen haben: **Dr. Thomas Scholzen, Dr. Sabine Riekenberg, Dr. Katja Farhat, Dr. Jörn Bullwinkel** und Frau **Christine Warmbold**. Eure kritische Anmerkungen und Kommentare waren ausnahmslos hilfreich! Ganz besonderer Dank gilt Frau **Ina Goroncy** für ihre Hilfe bei allen praktischen Fragen und jegliche Unterstützung im Labor aber auch bei den praktischen Grundlagen im Autohandwerk. Für die exzellente technische Unterstützung aber auch für viele schöne Stunden im Labor möchte ich mich bei Frau **Katrin Sprenger** ganz herzlich bedanken. Besonderer Dank gilt auch den Mädels **Karina Stein** und **Kristina Röschmann**, die nicht nur das Labor mit mir teilten, sondern auch Freud und Leid insbesondere während der letzten Zeit. Meiner lieben Diplomandin **Kim Kallsen** möchte ich sowohl für die Durchsicht einiger Auszüge aus meiner Dissertation als auch für ihre wertvolle Arbeit und ihre "Pflegeleichtigkeit" danken. Frau **Dr. Jennifer Debarry** danke ich ganz herzlich für die kreativen Diskussionen, Ideen und Unterstützungen sowie all die schöne Abende, die wir in Hannover verbracht haben. Nicht zuletzt gilt mein Dank auch Frau **Carola Schneider** und Herrn **Suhad Al-Badri** für ihre wertvolle Hilfe im Labor. Allen meinen nicht namentlich genannten (auch ehemaligen) KollegInnen und Azubis möchte ich für die vielfältige Unterstützung, erstklassige Arbeitsatmosphäre, tolle Stimmung und lustige Zeit nicht nur bei der Arbeit, sondern auch bei allen unseren Unternehmungen ganz besonders danken!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau **Lenka Krabbe** und Frau **Andrea Glaewe** für die ständige Hilfe und Zusammenarbeit bei allen klinischen Fragen. Auch bei allen weiteren Kollegen der Arbeitsgruppe Klinische Infektiologie möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Des Weiteren danke ich Frau **Simone Ross** aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Pneumologie für die Durchführung von HemaColor-Schnellfärbung und Zelldifferenzierung der BAL-Flüssigkeiten.

Ganz besonderer Dank gilt den besten Eltern, **Alevtina** und **Karl Jordan**, die ein Kind sich nur wünschen kann!

Und meinem lieben **Frank** für all Deine liebevolle Unterstützung, Deine Aufmunterungen und Deine Motivation. Und immer für mich da zu sein! Es ist schön, Dich an meiner Seite zu wissen! **Danke für alles!!!**

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt. Auszüge dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht bzw. sind bereits veröffentlicht.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Kiel noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kiel, 20. Mai 2009

Ellen Andresen