

# INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anja Mayer

aus Stuttgart

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# „Basale Immunmechanismen des Atemwegsepithels“

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Bartenschlager  
Prof. Dr. Alexander Dalpke

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1 Das angeborene Immunsystem .....	4
2.2 Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems .....	5
2.3 Toll-like Rezeptoren.....	6
2.3.1 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren.....	8
2.4 Dendritische Zellen .....	9
2.5 Das adaptive Immunsystem .....	11
2.5.1 T-Zellen.....	11
2.6 Epithelzellen als einfache Immunzellen .....	12
2.6.1 Antimikrobielle Substanzen .....	13
2.7 Organspezifische Regulation des angeborenen Immunsystems.....	14
2.7.1 TLR Aktivierung und Regulation an mukosalen Oberflächen.....	14
2.7.2 Homöostatische Inhibition von Makrophagen und Dendritischen Zellen an epithelialen Grenzflächen.....	16
2.8 Wissenschaftliche Fragestellung.....	19
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Geräte .....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterial .....	21
3.1.3 Kits .....	22
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien.....	22
3.1.5 Puffer und Lösungen .....	25
3.1.6 Primer für quantitative „real time“-RT-PCR.....	27
3.1.7 Vektoren und rekombinante Plasmide.....	29
3.1.8 Marker .....	29
3.1.9 Enzyme.....	29

3.1.10	Antikörper .....	29
3.1.11	Stimulanzen.....	31
3.1.12	Wachstumsmedien.....	33
3.1.13	Zellen.....	34
3.1.14	Mauslinien.....	36
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>36</b>
3.2.1	Kultivierung und Aufreinigung eukaryoter Zellen.....	36
3.2.2	Kultivierung prokaryoter Zellen.....	40
3.2.3	Zellstimulation .....	40
3.2.4	Gewinnung von Zellüberständen.....	41
3.2.5	Immunhistochemie .....	41
3.2.6	Transepithelialer Widerstand .....	42
3.2.7	Zytokinnachweis mittels ELISA .....	42
3.2.8	MTT Test.....	43
3.2.9	Durchflusszytometrie .....	43
3.2.10	RNA-Aufreinigung.....	45
3.2.11	cDNA-Synthese.....	45
3.2.12	“Real time”-RT-PCR.....	45
3.2.13	Klonierung von humanem CD36 .....	46
3.2.14	Plasmidpräparation.....	47
3.2.15	BCA Proteinbestimmung .....	47
3.2.16	Western Blot.....	48
3.2.17	Transfektionsexperimente .....	49
3.2.18	Gemischte Leukozyten Kultur.....	49
3.2.19	DC unabhängige T-Zell Aktivierung.....	50
3.2.20	Genomweite Expressionsanalysen mit DNA-Microarrays.....	50
3.2.21	Statistische Auswertungen .....	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Humane bronchiale Epithelzellen exprimieren funktionale Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>Liganden-abhängige Unterschiede in der Aktivierung von TLR2 .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b>Hyporesponsivität bronchialer Epithelzellen gegenüber <i>gram-positiven</i> Bakterien .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Niedrige oder fehlende Expression von TLR2 und CD36 in bronchialen Epithelzellen ....</b>	<b>58</b>
4.4.1	Das Expressionsniveau von TLR2 und die Abwesenheit des Korezeptors CD36 regulieren die Sensitivität von bronchialen Epithelzellen gegenüber verschiedenen TLR2 Liganden .....	58
4.4.2	Der fehlende Korezeptor CD36 und das niedrige Expressionsniveau von TLR2 sind ursächlich für die Hyporesponsivität auf verschiedene TLR2 Liganden.....	60

4.4.3	Regulation der TLR2 Expression durch TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ .....	61
<b>4.5</b>	<b>Genomweite Expressionsanalyse von BEAS-2B Zellen .....</b>	<b>62</b>
4.5.1	Kernantwort von bronchialen Epithelzellen auf verschiedene Modellpathogene .....	63
4.5.2	Pathogen-spezifische Expressionsmuster .....	64
<b>4.6</b>	<b>Bestätigung der Mircorarray Analyse mittels quantitativer „real time“-PCR.....</b>	<b>67</b>
4.6.1	Expression gleichartig regulierter Gene .....	67
4.6.2	Expression pathogen-spezifischer Gene.....	68
<b>4.7</b>	<b>Homöostase im Mikromilieu „Bronchiale Grenzfläche“ .....</b>	<b>69</b>
4.7.1	Homöostatische Inhibition professioneller Immunzellen durch bronchiale Epithelzellen..	70
4.7.2	Dauer der Konditionierung von Epithelzell-Überstand ist entscheidend für die Inhibitionseffizienz.....	71
4.7.3	Abhängigkeit der Inhibition von der Konzentration des Epithelzell-Überstandes .....	71
4.7.4	Die Inhibition professioneller Immunzellen ist spezifisch für Epithelzellen .....	72
4.7.5	Charakterisierung funktioneller Veränderungen professioneller Immunzellen in Anwesenheit von epithelialelem Überstand .....	74
4.7.6	Phagozytotische Aktivität von Monozyten ist durch Epithelzellen nicht beeinflusst .....	75
4.7.7	Einfluss von epithelialelem Überstand auf die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf professionellen Immunzellen.....	76
4.7.8	Epithelzell-Überstand inhibiert die DC-abhängige Induktion von T-Zell-Proliferation .....	77
4.7.9	T-Zellen werden durch Epithelzell-Überstand unmittelbar gehemmt.....	79
<b>4.8</b>	<b>Partielle Charakterisierung des inhibitorischen Prinzips von epithelialelem Überstand .....</b>	<b>80</b>
4.8.1	Überprüfung der Sensitivität gegenüber Hitze .....	80
4.8.2	Expression und Proteinsekretion bekannter inhibitorischer Zytokine.....	81
4.8.3	Die inhibitorische Wirkung von Epithelzellen auf Monozyten ist nicht durch TGF- $\beta$ vermittelt .....	82
4.8.4	Partieller Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Proliferation von T-Zellen .....	83
<b>4.9</b>	<b>Isolation und Kultur primärer muriner trachealer Epithelzellen.....</b>	<b>84</b>
4.9.1	Immunhistochemische Charakterisierung .....	85
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
<b>5.1</b>	<b>Epithelzellen als basale Immunzellen.....</b>	<b>88</b>
5.1.1	Expression von Mustererkennungsrezeptoren auf Epithelzellen.....	89
5.1.2	Rezeptorregulation als grundlegender Mechanismus zur Vermeidung unkontrollierter Entzündung und epithelialer Dysfunktion.....	91
5.1.3	Infektions-Transkriptom in Epithelzellen.....	95
<b>5.2</b>	<b>Mikromilieu „Bronchiale Grenzfläche“.....</b>	<b>98</b>
5.2.1	Homöostatische Inhibition professioneller Immunzellen durch bronchiale Epithelzellen	100
5.2.2	Einfluss von Epithelzellen auf die funktionellen Eigenschaften antigen-präsentierender Zellen.....	101

5.2.3	Einfluss von Epithelzellen auf T-Zellen.....	103
<b>5.3</b>	<b>Partielle Charakterisierung des inhibitorischen Prinzipes in Epithelzell-Überstand.....</b>	<b>104</b>
5.3.1	Einfluss des in bronchialem Epithelzellüberstand enthaltenen TGF- $\beta$ auf ... Monozyten und T-Zellen.....	105
<b>5.4</b>	<b>Etablierung der Isolation und Kultur muriner trachealer Epithelzellen .....</b>	<b>106</b>
<b>5.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>126</b>
<b>7.1</b>	<b>Analyse der Genexpressionsdaten .....</b>	<b>126</b>
<b>7.2</b>	<b>Veröffentlichungen und Präsentationen .....</b>	<b>139</b>
7.2.1	Veröffentlichungen.....	139
7.2.2	Präsentationen .....	139
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>140</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A20/TNFAIP3	Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3
Aqua dest	Aqua destillata
APC	Antigen presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
APC	Allophycocyanin
BMDDC	Bone marrow derived dendritic cell
bp	Base-pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCL	Chemokine, CC motif, ligand
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cps	Counts per second
$c_t$	Threshold cycle
CXCL	Chemokine, CXC motif, Ligand
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
DefB	$\beta$ -Defensin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desocytiribonikleinsäure (-acid)
dNTP	Mix aus Desoxynukleotidtriphosphaten
ds	Double-stranded (doppelsträngig)
DUSP	Dual specificity phosphatases
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FcR	Fc Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FSC	Forward scatter
fw	Forward
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor
h	Stunden
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IU	International units
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine rich repeat
LTA	Lipoteichoic acid
Mal	MyD88-adaptor-like protein
MALP-2	Macrophage activating lipopeptide
MAMP	Microbe-associated molecular pattern
Mda-5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MHC	MHC major histocompatibility complex
min	Minute
MLR	Mixed leukocyte reaction
MMP	Matrix Metalloprotease
MOI	Multiplicity of infection
MRC	Mannose receptor
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein
NaF	Natriumfluorid
n.d.	Nicht detektiert
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B (eukaryotischer Transkriptionsfaktor)
NOD	Nucleotide oligomerization domain protein
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	R-Phycoerythrin
PGRP	Peptidoglycan recognition protein
PolyI:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferative activated receptor $\gamma$
PRR	Pattern recognition receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
qPCR	Quantitative „real time“-polymerase chain reaction
rE	Relative Expression
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotations per minute
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
rv	Reverse
SD	Standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
sec	Sekunde
SPF	Specific pathogen free
SSC	Sideward scatter

ss	Single-stranded (einzelsträngig)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T <sub>H1/H2/H17</sub>	T-Helferzelle Typ 1/2/17
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TICAM	Toll-like receptor adaptor molecule
TIR	Toll/Interleukin 1 receptor
TLR	Toll like receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TNFAIP3/A20	Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3
Tollip	Toll interacting protein
TRAM	Translocation associated membrane protein
TRIF	TIR domain containing protein inducing IFN- $\beta$
TSLP	Thymic stromal lymphopoeitin
U	Unit
UV	Ultraviolett
ü.N.	Über Nacht
vol/vol	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
well	Vertiefung
z.B.	Zum Beispiel
ZO	Zonula occludens

# 1 Zusammenfassung

Bronchiale Epithelzellen bilden die erste Barriere gegen luftgetragene Infektionserreger. Sie tragen maßgeblich zur mukosalen Immunität bei. Aufgrund des Luftstroms kommen mukosale Oberflächen regelmäßig mit pathogenen sowie auch apathogenen Mikroben in Kontakt. Daher muss die Erkennung von Erregern strikt reguliert werden, um permanente, überschießende Aktivierung zu vermeiden.

Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkennen konservierte mikrobielle Strukturen und aktivieren Zellen des angeborenen Immunsystems. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass bronchiale Epithelzellen ebenfalls TLR1-6 und TLR9 exprimieren und sich damit eines bekannten Prinzips des angeborenen Immunsystems bedienen, um Infektionserreger zu eliminieren. Es wurde allerdings beobachtet, dass die Stimulation von TLR2 durch den Liganden Lipoteichonsäure nur marginal war. Zudem wurde beobachtet, dass bronchiale Epithelzellen nur sehr schwach mit *gram-positiven* Bakterien stimuliert werden konnten, wohingegen *gram-negative* Bakterien aktivierend wirkten. Als zugrunde liegender Mechanismus für die Hyporesponsivität konnte die niedrige Expression von TLR2 und die fehlende Expression des Korezeptors CD36 identifiziert werden. Die Transfektion mit beiden Rezeptoren stellte die Responsivität gegenüber allen TLR2 Liganden und *Staphylococcus aureus* wieder her.

Eine genomweite Expressionsanalyse bestätigte die Hyporesponsivität gegenüber *Staphylococcus aureus*, wohingegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Respiratory-Syncytial-Virus (RSV)* sowohl eine gemeinsame Antwort, als auch eine Pathogen-spezifische Antwort induzieren konnten. Diese Daten zeigen, dass die Regulation des Expressionsniveaus von TLR2 eine wichtige Stellgröße darstellt, um in nicht-sterilen Kompartimenten eine unkontrollierte Entzündungsreaktion und epitheliale Dysfunktion zu vermeiden.

Im Weiteren wurde das Zusammenspiel zwischen Epithelzellen und professionellen Immunzellen untersucht, um die Hypothese zu testen, dass ein organspezifisches Mikromilieu Immunantworten reguliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kokultur von Dendritischen Zellen (DCs) oder Monozyten mit BEAS-2B Zellen, einer bronchialen Epithelzelllinie, in einer reduzierten IL-12 und TNF Freisetzung resultierte. Die Stimulation von DCs oder Monozyten in Anwesenheit von Epithelzell-konditioniertem Überstand oder in einem Transwellansatz führte ebenfalls zur Inhibition der Zytokinfreisetzung. Die Befunde zeigen, dass bronchiale Epithelzellen lösliche Faktoren sezernieren, welche DCs und Monozyten hemmen. Diese Beobachtungen konnten mit murinen primären, trachealen Epithelzellen und knochenmarksgenerierten DCs (BMDDCs) verifiziert werden. Weiterhin hatte der lösliche Faktor, der konstitutiv von Epithelzellen sezerniert wird, Einfluss auf die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle auf BMDDCs. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von CD40 und CD86 inhibiert wurde, wohingegen der Überstand CD80 leicht induzierte. Außerdem war die DC-vermittelte T-Zellproliferation in Anwesenheit von Epithelzell-Überstand reduziert. Zusätzlich konnte ein direkter Einfluss des Epithelzell-konditionierten Überstandes auf T-Lymphozyten beobachtet werden. Ein inhibitorisch wirkenden Faktor im epithelialen Überstand wurde als TGF- $\beta$  identifiziert. Die Inhibition der Zytokinfreisetzung in Monozyten war mittels blockierender Antikörper nicht auf die Wirkung von TGF- $\beta$  zurückzuführen, jedoch spielte TGF- $\beta$  bei der reduzierten T-Zellproliferation eine Rolle.

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass bronchiale Epithelzellen als basale Immunzellen betrachtet werden können, die aktiv in die Erkennung mikrobieller Erreger involviert sind. Zusätzlich bilden bronchiale Epithelzellen ein Mikromilieu, welches professionelle Immunzellen so verändert, dass unkontrollierte Aktivierung verhindert und Homöostase in der Lunge gewährleistet wird.

# 1 Summary

Bronchial epithelial cells (BEC) represent the first line of defence against invading airborne pathogens. They are important contributors to innate mucosal immunity. Mucosal surfaces are prone to contact with pathogenic as well as non-pathogenic microbes and therefore immune recognition principles have to be tightly controlled to avoid uncontrolled permanent activation.

Toll-like receptors (TLRs) have been shown to recognize conserved microbial patterns and to mediate inducible activation of innate immunity. Within this work it is demonstrated that bronchial epithelial cells express functional TLR1-6 and 9 and thus make use of a common principle of professional innate immune cells. While it was observed that TLR2 ligands dependent on heterodimeric signaling either with TLR1 or TLR6 were functional, other ligands like lipoteichoic acid were not. Additionally it was found that bronchial epithelial cells could be stimulated only marginally by *gram-positive* bacteria bearing known TLR2 ligands whereas *gram-negative* bacteria were easily recognized. This correlated with low expression of TLR2 and the missing expression of the co-receptor CD36. Transgenic expression of both receptors restored responsiveness to the complete set of TLR2 ligands and *Staphylococcus aureus*.

Further gene-array experiments confirmed hyporesponsiveness to the latter bacterium whereas *Pseudomonas aeruginosa* and *respiratory syncytial virus (RSV)* induced common as well as pathogen-specific sets of genes. The findings indicate that bronchial epithelium regulates its sensitivity to recognize microbes by managing receptor expression levels. This could serve the special needs of controlled microbial recognition in mucosal compartments.

It was further investigated whether BEC and professional immune cells interacted with each other, to test the hypothesis that organ-specific microenvironment regulated immune responses.

It was shown that co-culturing of dendritic cells or monocytes with BEAS-2B (a bronchial epithelial cell line) resulted in the reduction of IL-12 and TNF- $\alpha$  secretion. The inhibition of the cytokine release was also observed when DCs or monocytes were cultured with supernatants from BEAS-2B or stimulated in a transwell-system. This identifies a soluble factor as underlying principle. The results could be verified by using murine primary tracheal epithelial cells and bone-marrow derived DCs (BMDDCs). Furthermore, this soluble factor that is constitutively released by BECs was responsible for changes in the BMDDCs phenotype with a clear reduction of CD40 and CD86, whereas CD80 was slightly enhanced. Finally, DC mediated induction of proliferation in a mixed leukocyte reaction (MLR) with T cells was reduced in the presence of BECs. Also, a direct effect of BEC on T cells could be observed. Using neutralizing antibodies it could be shown that TGF- $\beta$  played a role for BEC mediated inhibition. Whereas TGF- $\beta$  was dispensable for the inhibiting effects of BEC on monocytes, TGF- $\beta$  was involved in the inhibitory effects on T cell proliferation.

The results indicate that BEC serve as simple immune cells being able to actively recognize invading pathogens. BEC also create a non-inflammatory milieu that educates professional immune cells to maintain homeostasis in the lung. Thus BEC contribute to a local microenvironment that modulates professional immune cells to adapt for local requirements, especially within non-sterile compartments.

## 2 Einleitung

Der oxidative Zellstoffwechsel erfordert einen permanenten Gasaustausch zwischen Organismus und Umgebung. Die Lunge von Wirbeltieren ist das zentrale Organ für die Luftatmung. Phylogenetisch entstand sie bei Wirbeltieren als Einstülpung der Körperwand mit einem fein verzweigten System von Atmungswegen, bestehend aus den Bronchien und Bronchiolen sowie den Alveolen, in denen der eigentliche Gasaustausch stattfindet. Die luftführenden Bronchien sind mit einem mehrreihigen, hochprismatischen Flimmerepithel ausgekleidet, während zu den Alveolen hin ein einschichtiges Epithel überwiegt. Beim Menschen beträgt die respiratorische Oberfläche ca.  $100 \text{ m}^2$ , die täglich mit bis zu 10.000 Litern Luft in Kontakt kommt. Dies bedingt einen regelhaften Kontakt mit luftgetragenen apathogenen und fakultativ pathogenen Keimen. Der initiale Kontakt zwischen Mikroorganismen und Wirt findet im Allgemeinen auf inneren und äußeren Körperoberflächen statt. Luftgetragene Keime kommen durch die Inhalation zunächst mit den Epithelzellen der Bronchien in Kontakt, welche die erste physikalische Abwehrbarriere darstellen. Sogenannte „tight junctions“ (dichte Zellverbindungen der Epithelien) und die mukoziliäre Reinigung bilden eine wirksame mechanische Barriere gegen Keime. Zusätzlich ist das Atemwegsepithel in der Lage, antimikrobielle Substanzen und Entzündungsmediatoren zu sezernieren, die eine chemische Barriere bilden.

Der Kontakt zwischen Mikroorganismus und Wirt kann am bronchialen Epithel verschiedene Konsequenzen haben (Bals, 2000):

1. Eindringende Keime ohne ausgeprägte Virulenzfaktoren werden durch die mukoziliäre Reinigung oder durch chemische Faktoren eliminiert, ohne dass das angeborene oder das adaptive Immunsystems beteiligt sind.
2. Der Erreger aktiviert das angeborene Immunsystem. Es werden Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Sekretion von antimikrobiellen Substanzen und die Bildung von Entzündungsmediatoren induziert. Chemotaktische Substanzen führen dazu, dass weitere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems an den Ort der Entzündung gelockt werden. Das führt schließlich zur Elimination des Erregers, wobei das angeborene Immunsystem das Wachstum des Keims soweit verlangsamt, bis eine ausreichend starke adaptive Antwort den Keim eliminiert.
3. Der Keim entkommt dem angeborenen und adaptiven Immunsystem, was zusammen mit einer starken Entzündungsreaktion den Tod des Wirtes zur Folge haben kann.
4. Mikroorganismen mit speziellen physiologischen Adaptionen können die Atemwege für lange Zeit kolonisieren, ohne dass es zur Aktivierung des Immunsystems und dadurch zur Elimination des Keimes kommt.

Durchdringt ein Keim die Epithelzellbarriere, so kommt es zur Aktivierung des Immunsystems. Als Immunsystem wird die Gesamtheit an Zellen, Geweben und Molekülen bezeichnet, die für die Abwehr von Infektionen zuständig sind. Die Aufgabe des Immunsystems ist es, vor Mikroorganismen,

Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Die Wirtsabwehr besteht aus zwei funktionell und phylogenetisch unterschiedlichen Komponenten: das angeborene, unspezifische Immunsystem und das adaptive, spezifische oder auch erworbene Immunsystem.

## 2.1 Das angeborene Immunsystem

Die entwicklungsgeschichtlich älteren Abwehrfunktionen des angeborenen Immunsystems sind schnell aktivierbar oder konstitutiv vorhanden und bei allen Pflanzen, Wirbellosen und Wirbeltieren verbreitet. Das angeborene Immunsystem hat spezielle Erkennungsmechanismen entwickelt, um Infektionserreger zu detektieren und zu eliminieren. Für die Infektionsabwehr induziert das angeborene Immunsystem eine Entzündungsreaktion. Außerdem stellt das angeborene Immunsystem Effektorleistungen für das adaptive Immunsystem zur Verfügung. Hierbei spielt insbesondere die Präsentation von Antigenen eine Rolle, welche zur Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist. Das adaptive Immunsystem ist an der Elimination von Pathogenen in der späten Infektionsphase beteiligt. Hierbei kooperiert es mit dem adaptiven Immunsystem (z.B. Makrophagenaktivierung durch T-Lymphozyten mittels  $\text{IFN-}\gamma$ ; Phagozytose von Bakterien, welche mit Antikörpern opsonisiert wurden).

Das angeborene Immunsystem lässt sich in unterschiedliche Bestandteile unterteilen. Zum angeborenen Immunsystem gehört die Barrierefunktion von Epithelien (Haut, Respirationstrakt und Gastrointestinaltrakt), die durch mechanische und chemische Abwehrfunktionen den Eintritt von Bakterien verhindern. Des Weiteren gibt es eine Reihe löslicher Faktoren, welche Abwehrfunktionen erfüllen. Dazu gehören Lysozym, die Magensäure, von Schleimhäuten sezernierte antimikrobielle Substanzen wie Defensine und Akut-Phase Proteine wie MBL (Mannose-bindendes Lektin) und CRP (C-reaktives Protein), welche opsonisierende Wirkung haben. Ein weiterer humoraler Bestandteil ist das Komplement-System (Abbas and Lichtman, 2004). Dieses besteht aus einer Kaskade von proteolytischen Enzymen, die nach sequentieller Aktivierung zur Opsonisierung und Lyse von Mikroorganismen führen. Zusätzlich gibt es noch eine Vielzahl von löslichen Proteinen, sogenannten Zytokinen, die als Entzündungsmediatoren fungieren und die Kommunikation zwischen Leukozyten oder Leukozyten und anderen Zellen ermöglichen oder direkte Effektorfunktionen ausüben. Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und natürliche Killer-Zellen (Abbas and Lichtman, 2004). Der Kontakt mit Mikroorganismen aktiviert das angeborene Immunsystem und führt zu einer Entzündungsreaktion. Dabei kommt es zum Zusammenspiel humoraler und zellulärer Effektormechanismen und zur direkten und unspezifischen Abwehr des eindringenden Erregers. Zu den dabei aktivierten Abwehrreaktionen gehören die Sekretion von Opsoninen und von Sauerstoff- und Stickoxidradikalen, außerdem die Phagozytose und anschließende intrazelluläre Elimination der Mikroorganismen. Zusätzlich dienen antigen-präsentierende Zellen wie z.B. Dendritische Zellen dazu, Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Durch Aufnahme des Erregers und anschließende Prozessierung und Präsentation des

Antigens, sowie der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen werden T-Lymphozyten aktiviert und die adaptive Immunantwort eingeleitet.

## 2.2 Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems

Im Gegensatz zu dem großen Repertoire von rekombinierten („rearrangierten“) Rezeptoren des adaptiven Immunsystems erkennt das angeborene Immunsystem Mikroorganismen über eine limitierte Anzahl Keimbahn-kodierter Mustererkennungsrezeptoren (PRR-pattern recognition receptors). Diese erkennen konservierte mikrobielle Strukturen (PAMPs-pathogen associated molecular patterns), die von unterschiedlichen Pathogenklassen (Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten) oder Subgruppen wie *gram-positive* und *gram-negative* Bakterien exprimiert werden, jedoch nie hochspezifisch für eine Spezies sind. Dieses Konzept von PRRs und PAMPs wurde erstmals von dem Immunologen Charles A. Janeway formuliert (Janeway, 1989; Janeway, 1993; Medzhitov and Janeway, 1997). Oft sind PAMP-Strukturen essentiell für das Überleben und die Infektiosität der Mikroorganismen, daher können mikrobielle Erreger dem angeborenen Immunsystem nicht durch Mutation oder Elimination dieser Strukturen entgehen. Molekulare Muster (PAMPs) befinden sich sowohl auf apathogenen als auch auf pathogenen Keimen. Da die gleichen immunstimulatorischen molekularen Muster, die als Liganden für Mustererkennungsrezeptoren fungieren auf kommensalen und pathogenen Bakterien exprimiert werden, wurde das Konzept der PAMPs zu MAMPs (microbe associated molecular patterns) erweitert (Sansonetti, 2006; Mackey and McFall, 2006). Das soll verdeutlichen, dass die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems nicht zwischen pathogenen und apathogenen Mikroorganismen unterscheiden können. Vielmehr sind dafür weitere Mechanismen (z.B. Lokalisation) notwendig. PRRs sind vor allem auf Effektorzellen des angeborenen Immunsystems z.B. auf Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert, welche zuerst mit den Mikroorganismen in Kontakt kommen (Akira et al., 2001). Inzwischen sind eine Vielzahl an Mustererkennungsrezeptoren und die dazu gehörenden molekularen Muster bekannt, welche in Tabelle 2-1 aufgelistet sind. Das Repertoire umfasst sowohl extrazelluläre, membranständige Rezeptoren als auch sezernierte Proteine und zytosolische Rezeptoren, die bakterielle, virale und parasitäre Bestandteile innerhalb der Zelle im Zytosol erfassen (Delbridge and O'Riordan, 2007). Den membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLRs) wurde in den letzten Jahren eine besondere Rolle bei der Pathogenabwehr zugeschrieben.

Tabelle 2-1 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems: PRRs und PAMPs

PRR	PAMPs	Organismus
<b>Extrazelluläre PRR</b>		
CD14/LBP	LPS	gram-negative Bakterien
CD36	Lipopeptide, Lipoteichonsäure, oxLDL	Bakterielle Membranen, endogen
CRP	Phosphorylcholin	Bakterielle Membranen
fMLP-Rezeptor	N-formyl-Methionin	Bakterielles Protein
β-Glukan Rezeptor	Zymosan	Hefen, Pilze
Mannose Rezeptor	Mannose-haltige Glykane	Bakterien
MBL	Mannose-haltige Glykane	Bakterien
PGRP	Peptidoglykan	Bakterien
PTX3		Aspergillus
Scavenger Rezeptor	erkennen poly-anionische Makromoleküle und modifiziertes LDL (oxidiert und acetyliert)	
TLRs	bakterielle Zellwandbestandteile, bakterielle DNA und Proteine, virale RNA, DNA	Bakterien, Viren, Parasiten
<b>Intrazelluläre PRR</b>		
NOD1	meso-DAP-haltiges Muramyl-dipeptid (MDP)	Bakterien
NOD2	Muramyl-dipeptid (MDP)	Bakterien
NALP1	<i>Bacillus anthracis</i> lethal Toxin (LeTx)	<i>B. anthracis</i>
NALP3	bakterielle RNA, MDP, ATP, Harnsäurekristalle	Bakterien, nicht-bakterielle „Danger-Signale“
NAIP5	Flagellin	<i>L. pneumophila</i> , <i>S. typhimurium</i>
IPAF	Flagellin	<i>L. pneumophila</i> , <i>S. typhimurium</i>
RIG-I	dsRNA	Viren
MDA-5	dsRNA	Viren
dsRNA-PK	dsRNA	Viren

TLR: Toll-like Rezeptoren modifiziert nach (Akira et al., 2006), Intrazelluläre PRR modifiziert nach (Delbridge and O’Riordan, 2007)

LBP: LPS (lipopolysaccharide) binding protein, oxLDL: oxidized low density lipoprotein, CRP: C-reaktives Protein, fMLP: N-formyl-methionin peptide, MBL: mannan-binding lectin, PGRP: peptidoglycan recognition protein, PTX: pentraxin, TLR: toll-like receptors, NOD: nucleotide binding oligomerization domain, NALP: NACHT Domain-, leucine rich repeat-, and PYD-containing protein, NAIP: neuronal apoptosis inhibitor proteins, IPAF: ICE protease-activating factor, RIG: retinoic acid inducible gene, MDA: melanoma differentiation associated gene, dsRNA-PK: double-stranded RNA dependent protein kinase.

## 2.3 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind evolutionär konservierte Glykoproteine, die ihren Namen von dem Toll-Protein ableiten, dem eine essentielle Rolle in der dorso-ventralen Achsenbildung bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zugeschrieben wurde (Hashimoto et al., 1988). Später wurde erkannt, dass Toll-Mutanten in *Drosophila melanogaster* suszeptibel für Pilzinfektionen waren, was auf eine fehlende Induktion des antifungalen Proteins Drosomycin zurückzuführen war (Lemaitre et al., 1996; Hoffmann, 2003). Es konnten dann auch humane Toll-homologe Proteine kloniert werden, welche als Toll-like Rezeptoren bezeichnet wurden (Medzhitov et al., 1997). Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von konservierten mikrobiellen Strukturen (PAMPs) im angeborenen Immunsystem zeigte sich, als 1998 beschrieben wurde, dass eine Mutation im Toll-like Rezeptor 4 zu einem Verlust der Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS; ein wichtiger Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien) führte (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999). Bis heute sind im Menschen zehn Toll-like Rezeptoren (TLR1-10) bekannt und in der Maus zwölf (TLR1-7; TLR9-13). TLRs sind integrale Typ-I Transmembranproteine, die durch extrazelluläre Leucin-reiche Wiederholungsmotive (LRR-leucine-rich repeats) und eine zytoplasmatische Signaldomäne, die

homolog zu der des IL-1-Rezeptors ist (TIR-Domäne-Toll/IL-1R homology domain), charakterisiert sind. Die TLRs 1, 3, 4, 5 und 6 sind an der Zelloberfläche lokalisiert. TLR 3, 7, 8 und 9 befinden sich im Endosom bzw. im Lysosom. Basierend auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz können TLRs in fünf Unterfamilien gruppiert werden, die jeweils ähnliche molekulare Strukturen (PAMPs/MAMPs) erkennen können (Takeda et al., 2003): TLR1, TLR2 und TLR6 erkennen Lipopeptide, wohingegen TLR7, TLR8 und TLR9 Nukleinsäuren erkennen. TLR4 erkennt ein weites Spektrum an exogenen und endogenen Liganden. TLR5 und TLR3 erkennen jeweils nur ein kleines Repertoire. Für TLR5 wurde bislang einzig Flagellin (ein bakterielles Protein; Bestandteil der bakteriellen Flagellen) als Ligand beschrieben, für TLR3 doppelsträngige RNA. In Tabelle 2-2 sind die Liganden für die entsprechenden TLRs aufgeführt. Es zeigte sich, dass neben exogenen Liganden auch endogene Liganden zu existieren scheinen. Die Erkennung endogener, bei Zellzerstörung im Rahmen einer Infektion auftretender, Liganden hätte zur Folge, dass das Konzept von PRRs und PAMPs (Janeway, 1989), modifiziert oder erweitert werden müsste. Diese Erweiterung, dass das angeborene Immunsystem nicht primär zwischen Fremd und Selbst unterscheidet, sondern auf exogenen und endogenen Gefahrensignalen hin reagiert, wurde von Polly Matzinger 2002 formuliert (Matzinger, 2002). Inzwischen sind eine Reihe von molekularen Gefahrensignalen identifiziert, die als endogene Liganden (DAMPs – danger associated molecular patterns) an TLRs binden können (Seong and Matzinger, 2004; Akira et al., 2006). TLR2 detektiert ein weites Spektrum von bakteriellen Liganden, was durch die funktionelle Beteiligung von mehreren Rezeptoren und Korezeptoren ermöglicht wird. Es wurde gezeigt, dass TLR1 und TLR6 obligatorisch an der Erkennung bakterieller Lipopeptide beteiligt sind (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002; Ozinsky et al., 2000). Für die Erkennung von Pilzbestandteilen wurde eine funktionelle Kooperation von TLR2 und Dektin-1 beschrieben (Brown et al., 2003). Bei der Erkennung von LPS sind ebenfalls mehrere Moleküle beteiligt. Neben TLR4 gehören dazu LBP, CD14 und MD2 (Jack et al., 1997; Haziot et al., 1996; Shimazu et al., 1999). Zudem tragen pathogene Erreger oft mehrere molekulare Muster, über die sie verschiedene TLRs stimulieren können, sodass Pathogenerkennung über mehrere TLRs erfolgen kann. *Gram-negative* Bakterien tragen sowohl den Liganden für TLR4 (LPS), für NOD1 (DAP) als auch für TLR9 (DNA). Toll-like Rezeptoren werden auf verschiedenen Immunzellen exprimiert wie Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen und speziellen T-Zellpopulationen. Auch auf Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, kardialen Myozyten und Epithelzellen sind TLRs exprimiert (Akira et al., 2001). Die Stimulation von TLRs in Makrophagen und DCs führt zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, erhöhter Expression kostimulatorischer Moleküle, vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen, zur Phagozytose, Antigenprozessierung und Antigenpräsentation und schließlich zur Elimination des Keimes. Die Rolle von TLRs auf Nicht-Immunzellen ist gesondert unter (2.7.1) beschrieben.

Tabelle 2-2 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

TLR	PAMPs	Organismus
TLR 1	Kooperation mit TLR2 Triacylierte Lipopeptide	Bakterien und Mykobakterien
TLR 2	Kooperation mit TLR1 oder TLR6 atypische Lipopolysaccharide Bakterien Glykolipide Glykophosphatidylinositol Anker Hämagglutinin Lipoarabinomannan Lipoproteine/ Lipopeptide Lipoteichonsäure Peptidoglykan* Porine Zymosan*	<i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, Mykobakterien <i>Treponema maltophilum</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> Masernvirus Mykobakterien verschiedene Bakterien gram-positive Bakterien gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien <i>Neisseria</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLR 3	dsRNA polyI:C	Viren synthetisch
TLR 4	Fibrinogen* hsp60 hsp70 Virale-Proteine* Hyaluronsäure-Fragmente* Lipopolysaccharide Polysaccharidfragmente von Heparansulfat Taxol	endogen <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> endogen RSV, MMTV endogen gram-negative Bakterien endogen Pflanzen
TLR 5	Flagellin	verschiedene Bakterien
TLR 6	Kooperation mit TLR2 Diacylierte Lipopeptide, MALP-2 Zymosan	Mykoplasmen <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLR 7	Bropirimine Imidazoquinoline Loxoribine ssRNA	Synthetische Komponente Synthetische Komponente Synthetische Komponente Viren
TLR 8 <sup>1)</sup>	Imidazoquinoline ssRNA	Synthetische Komponente Viren
TLR 9	bakterielle DNA (CpG-DNA) CpG-Oligodesoxy nukleotide Hemozin* virale DNA	Bakterien Synthetische Komponente Plasmodium Viren
TLR 10 <sup>2)</sup>	?	?
TLR 11 <sup>3)</sup>	Profilin-ähnliches Molekül ?	<i>Toxoplasma gondii</i> uropathogene <i>E. coli</i>
TLR 12 <sup>3)</sup>	?	?
TLR 13 <sup>3)</sup>	?	?

MALP-2: „macrophage activation lipoprotein-2“ aus Mykoplasmen, ds: doppelsträngig, hsp: heat-shock protein, MMTV: mouse mammary-tumor virus, RSV: respiratory-syncytial-virus, <sup>1)</sup> Pseudogen in der Maus, <sup>2)</sup> nur human beschrieben, <sup>3)</sup> nur in der Maus beschrieben, \*umstrittene Literaturlage, modifiziert nach (Akira et al., 2006).

### 2.3.1 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren

Die Aktivierung von TLRs durch einen Liganden führt zu einer Signalkaskade, die letztlich zur Induktion von Genen führt, welche eine anti-mikrobielle Wirtsabwehr bedingen. Nach der Aktivierung der TLRs kommt es zu Dimerisierung (im Falle von TLR2 zu Heterodimeren mit TLR1 und TLR6 (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002; Ozinsky et al., 2000); für TLR4 wurden Homodimere beschrieben (Zhang et al., 2002)). Das induziert vermutlich eine Konformationsänderung (Gay et al., 2006), welche die Bindung von Adaptorproteinen an die TIR-Domäne ermöglicht. Bislang sind fünf Adaptorproteine bekannt, wobei MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) von besonderer Bedeutung ist (Hemmi et al., 2002; Hayashi et al., 2001; Takeuchi et al., 2000; Hacker et al., 2000). Weitere Adaptormoleküle sind TIRAP/Mal (TIR domain containing adaptor/MyD88-adaptor-like protein) (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2002), TRIF/TICAM1 (TIR domain

containing protein inducing IFN- $\beta$ /TIR containing adaptor molecule 1) (Oshiumi et al., 2003; Hoebe et al., 2003a), TRAM/TICAM2 (TRIF-related adaptor molecule/TIR containing adaptor molecule 2) (Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) und SARM (sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein (O'Neill and Bowie, 2007)). Die Stimulation unterschiedlicher TLRs durch verschiedene Liganden induziert unterschiedliche Antwortprofile, welche sich durch die unterschiedliche Nutzung der fünf Adaptormoleküle erklären lassen. MyD88 ist entscheidend für die Signaltransduktion aller TLRs mit Ausnahme von TLR3. TLR3 benutzt ausschließlich TRIF als Adaptorprotein. Die Signalweiterleitung über TRIF wird häufig als MyD88-unabhängiger Signalweg bezeichnet. TLR4 kann sowohl den MyD88-abhängigen, als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg nutzen. Die Stimulation von TLRs, die ausschließlich MyD88 benutzen, führt dazu, dass MyD88 und TIRAP (nur im Falle von TLR2 und TLR4), die selbst eine TIR-Domäne enthalten, an die TIR-Domäne des Rezeptors rekrutiert werden. Dann formiert sich ein Komplex aus IRAKs (IRAK-1 und IRAK-4 binden über homophile Interaktionen der Death-Domäne) und TRAF6. Das führt zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen (p38, JNK/SAPK und ERK) und zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes. Durch IKK-induzierte Phosphorylierung und Degradierung von I $\kappa$ B wird NF $\kappa$ B freigesetzt. NF $\kappa$ B-Dimere und MAP-Kinasen abhängige Transkriptionsfaktoren (AP-1) translozieren in den Nukleus und bewirken dort die Transkription von Genen, die in die Entzündungsreaktion involviert sind (proinflammatorische Zytokine). Die Aktivierung des TRIF-abhängigen Signalweges führt zu einer Interaktion von TRIF mit RIP1 (receptor-interacting protein 1), was dann TANK (TRIF-family-member-associated NF $\kappa$ B activator) und TBK1 (TRIF-family-member-associated NF $\kappa$ B activator binding kinase 1) aktiviert. Daraus resultiert eine Phosphorylierung von IRF-3. Phosphoryliertes IRF-3 transloziert in den Kern und führt zur Gentranskription von IFN- $\beta$  und IFN-induzierten Genen (Akira et al., 2006).

## 2.4 Dendritische Zellen

Der initiale Kontakt zwischen Mikroorganismen und Wirt findet auf den Grenzflächen zwischen Körperinnerem und belebter Umwelt, den Epithelien statt. Überwinden luftgetragene Keime zunächst die Epithelzell-Barriere in den Bronchien, so treffen sie auf spezialisierte Immunzellen wie Dendritische Zellen (DCs), welche Antigene aufnehmen und diese zu den sekundären Lymphorganen transportieren können. Dendritische Zellen bilden die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität, indem sie mit ihren Mustererkennungsrezeptoren mikrobielle Erreger detektieren und anschließend das adaptive Immunsystem über Antigenpräsentation aktivieren können. Nach erfolgtem Antigenkontakt werden DCs aktiviert, reifen und wandern in die regionalen Lymphknoten ein, in denen sie dann als reife antigenpräsentierenden Zellen (APCs) naive T-Zellen aktivieren. Reife DCs vollziehen keine Phagozytose mehr, regulierten aber MHC Klasse I und Klasse II Moleküle hoch, die für die Antigenpräsentation zuständig sind (antigenabhängiges Signal) und vom T-Zellrezeptor erkannt werden. Zusätzlich exprimieren sie vermehrt kostimulatorische Oberflächenmoleküle (CD40, CD80 und CD86), die das Sekundärsignal für eine vollständige Aktivierung naiver T-Zellen liefern

(kostimulatorisches Signal). Eine weitere Funktion Dendritischer Zellen ist die Sekretion von Zytokinen wie z. B. IL-12, welche einen Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen haben. T-Helferzellen 1 (T<sub>H1</sub>-Zellen) sind in der Lage, über Sekretion von Interferon- $\gamma$  Makrophagen zu aktivieren. T-Helferzellen 2 (T<sub>H2</sub>-Zellen) wirken dagegen über die Aktivierung von B-Zellen an der humoralen Immunantwort mit (Kapsenberg, 2003). Dendritische Zellen können in verschiedene Subklassen mit unterschiedlichen phänotypischen und funktionellen Charakteristika unterteilt werden. Im humanen und murinen System sind mindestens drei Subklassen charakterisiert worden: myeloide (mDCs), plasmazytoide (pDCs) und lymphoide DCs, die sich anhand ihrer Oberflächenmarker und des TLR-Besatzes deutlich unterscheiden. Allerdings ist über humane, lymphoide DCs bislang wenig bekannt. Humane pDCs exprimieren TLR7 und TLR9, wohingegen humane mDCs TLR1-6, TLR8 und keinen TLR9 exprimieren (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Über die Expression von TLR7 auf humanen DCs existiert eine konträre Literaturlage. In manchen Studien wurde beschrieben, dass TLR7 auf pDCs und mDCs exprimiert wird (Krug et al., 2001; Ito et al., 2002), wohingegen andere berichten, dass TLR7 ausschließlich auf pDCs zu finden ist (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001). Murine mDCs exprimieren TLR1-7 und TLR9. Für murine pDCs ist eine Expression von TLR7 und TLR9 beschrieben worden. Myeloide DCs sezernieren vor allem IL-12, während plasmazytoide DCs nach Viruskontakt Typ-I Interferone produzieren (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

Der Aktivierungsstatus und das Umgebungsmilieu von DCs sind entscheidend für die Ausbildung von T-Zellantworten. Eine lang anhaltende Stimulation von DCs über TLRs führt zu einer Induktion von T<sub>H2</sub>-Differenzierung über „exhausted DCs“ (Langenkamp et al., 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Antigenaufnahme von DCs ohne TLR Stimulation nicht zu einer ausreichenden T-Zellaktivierung führt (Blander and Medzhitov, 2006). Unreife DCs, die Antigen präsentieren ohne aber kostimulatorische Moleküle zu exprimieren („tolerogene DCs“) sollen die Induktion regulatorischer T-Zellen bedingen (Mahnke et al., 2002; Mahnke and Enk, 2005). Dendritische Zellen, die in Kontakt mit mukosalen Epithelzellen kamen, wurden als „noninflammatory DCs“ beschrieben, die keine T<sub>H1</sub>-Antwort nach Exposition mit einem intrazellulären Erregers (*S. typhimurium*) induzieren konnten. Diese Epithelzell-konditionierten DCs sezernierten IL-6 und IL-10, waren jedoch nicht mehr in der Lage IL-12 zu bilden. Als Mechanismus konnte dabei die Sekretion von TSLP durch Darmepithelzellen identifiziert werden. Die Darmhomöostase wird durch permanente Induktion einer T<sub>H2</sub>-Antwort aufrechterhalten. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen einer Fehlregulation der TSLP-Expression und der Ausbildung der chronischen Darmentzündung Morbus Crohn hergestellt werden (Rimoldi et al., 2005). Dendritische Zellen, die durch intestinales Epithel konditioniert wurden zeigten auch einen veränderten Phänotyp bezüglich der Expression kostimulatorischer Moleküle und eine verminderte T-Zellaktivierung (Butler et al., 2006). Das Mikromilieu, das auf DCs wirkt, scheint somit eine wichtige Rolle bei der DC-vermittelten adaptiven Immunantwort zu spielen.

## 2.5 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive oder spezifische Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem durch die hochspezifische Erkennung eines Antigens durch B- und T-Lymphozyten und die Ausbildung von immunologischem Gedächtnis. Die Spezifität für eine große Anzahl verschiedener Antigene wird durch somatische Rekombination, klonale Selektion und Hypermutation gewährleistet. Somatische Rekombination bedingt die Expression unterschiedlicher Rezeptoren mit differenter Antigenspezifität in individuellen Lymphozyten. Zur Gewährleistung der Erkennung der Vielfalt unterschiedlicher Pathogene ist ein ausreichend großes Repertoire verschiedener Lymphozyten notwendig. Nach Antigenkontakt proliferiert und differenziert sich eine antigenspezifisch aktivierte T-Zelle, sodass eine spezifische Immunantwort mittels klonaler Expansion gewährleistet wird. Durch somatische Hypermutation kann eine weitere Affinitätssteigerung im adaptiven Immunsystem erreicht werden (Kedl et al., 2003).

### 2.5.1 T-Zellen

Es können mindestens drei T-Zellpopulationen unterschieden werden: CD4 positive Helfer-T-Zellen Typ 1/2/17 (Weaver et al., 2006), CD8 positive zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Die Reifung der T-Zellen erfolgt im Thymus. Nur T-Zellen, welche Antigen erkennen, an MHC-Moleküle mit mittlerer Affinität binden und keine Autoantigene erkennen, reifen aus und gelangen als periphere, naive T-Zellen in die Zirkulation. Bindet eine CD4/CD8 (Korezeptoren für den T-Zellrezeptor, welche eine Bindung zwischen T-Zellen und APCs verstärken) doppelpositive Prä-T-Zelle während der Positiv-Selektion im Thymus an MHC-I, so behält diese CD8 und differenziert sich zur zytotoxischen T-Zelle. Wird während dieses Selektionsschrittes MHC-II erkannt, so behält diese T-Zelle CD4 und wird zur T-Helferzelle.  $T_{H1}$ -Zellen sind später für die funktionelle Reifung von zytotoxischen T-Zellen und für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene verantwortlich, da sie  $IFN-\gamma$  produzieren, welches ein wesentlicher Faktor für die Aktivierung von Makrophagen ist.  $T_{H2}$ -Zellen kontrollieren die Differenzierung von B-Zellen in antikörpersezernierende Plasmazellen. Die biologische Bedeutung von zytotoxischen T-Zellen liegt darin, Zielzellen nach Antigenkontakt (MHC-I vermittelt) zu lysieren. Das spielt vor allem für die Infektionsabwehr von Viren, intrazellulären Bakterien und Protozoen, sowie bei der Transplantatabstoßung eine Rolle.

Die Aktivierung von T-Lymphozyten benötigt zwei Signale. Das Primärsignal erhält die T-Zelle durch die Antigenpräsentation einer APC über den MHC-I/-II-Komplex, der mit dem T-Zell Rezeptor interagiert (antigenabhängiges Signal). Das Sekundärsignal wird über kostimulatorische Moleküle auf der APC vermittelt (CD80/CD86), die mit CD28 interagieren, was letztlich die T-Zelle zur Proliferation anregt (kostimulatorisches Signal). Nach Antigenkontakt kommt es zu einer Differenzierung der T-Helferzellen in zwei unterschiedliche Subpopulationen, der  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ -Zellen (Mosmann and Coffman, 1989; Murphy and Reiner, 2002; Jankovic et al., 2001). Verschiedene Antigene (Bakterien, Pilze, Protozoen oder Pollen) kommen zuerst mit unterschiedlichen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Granulozyten oder natürlichen Killerzellen, in

Kontakt. Die Antigenverarbeitung dieser Zellen erzeugt ein Zytokinmilieu, welches die Polarisierung zu einer  $T_{H1}$  oder  $T_{H2}$  Differenzierung entscheidend beeinflusst.  $T_{H1}$  Zellen sezernieren vor allem IL-2, TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  und führen über eine Makrophagenaktivierung zu der Eliminierung von intrazellulären Erregern. Zusätzlich können  $T_{H1}$ -Zellen zytotoxische T-Zellen aktivieren.  $T_{H2}$ -Zellen aktivieren über die Sekretion von IL-4 und IL-5 B-Zellen zur Produktion von antigenspezifischen Antikörpern.

Ein weiteres Differenzierungsprogramm unabhängig vom  $T_{H1}/T_{H2}$  Schema ist die Differenzierung von IL-17 produzierenden T-Zellen ( $T_{H17}$ ), die in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis involviert sind (Cua et al., 2003; Nakae et al., 2002; Kolls and Linden, 2004). IL-17 bewirkt eine verstärkte Granulopoese, die Chemoattraktion von Neutrophilen sowie die verstärkte Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub> und Matrixmetalloproteinasen. Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-17 die Barrierefunktion von Epithelzellen durch Stimulation der „Tight junction“ Bildung und Mukusekretion fördert (Chen et al., 2003; Kinugasa et al., 2000). Für die *de novo* Differenzierung von IL-17 produzierenden T-Zellen aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind TGF- $\beta$  und IL-6 aus DCs essentiell. IL-1 und TNF- $\alpha$  wirken synergistisch. IL-23 ist für das Überleben dieser Zellen essentiell (Veldhoen et al., 2006; Veldhoen and Stockinger, 2006). Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen, die in der Lage sind, die Aktivierung von anderen T-Zellen zu unterdrücken. Die Rolle des Transkriptionsfaktors FOXP3 (forkhead box P3) für die Entwicklung von  $T_{reg}$  zeigt sich in Tiermodellen, in denen Mutationen von FOXP3 zur Entwicklung von Autoimmun- und Lymphoproliferativen Erkrankungen führte. Ein Verlust der  $T_{reg}$  Population durch eine spontane Mutation in FOXP3 (scurfy-Mutation) führte zum Tod der Mäuse nach 3 bis 4 Wochen (Brunkow et al., 2001). Im Menschen konnte ein Zusammenhang einer Mutation in FOXP3, dem Verlust von funktionalen  $T_{reg}$  und der Entwicklung von IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopahty and enteropathy, X-linked syndrome) hergestellt werden (Bennett et al., 2001).  $T_{reg}$  sind essentiell für die Kontrolle von Immunantworten. Es werden in der Literatur zwei unterschiedliche Suppressionsmechanismen diskutiert. Zum einen gibt es Hinweise für eine kontaktabhängige Suppression, zum anderen wird eine Inhibition über immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  diskutiert (Bluestone and Abbas, 2003; Shevach, 2006). Dabei kann zwischen natürlich auftretenden  $T_{regs}$  und adaptiven oder induzierten  $T_{regs}$  unterschieden werden. Natürlich auftretende regulatorische T-Zellen reifen im Thymus und inhibieren die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. *In vitro* erfolgt die Suppression über einen Zellkontakt abhängigen, Zytokin (IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ ) unabhängigen Mechanismus (Shevach et al., 2006). Adaptive regulatorische T-Zellen werden in den peripheren Lymphorganen induziert und inhibieren über immunsuppressive Zytokine (Bluestone and Abbas, 2003).

## 2.6 Epithelzellen als einfache Immunzellen

Epithelien sind Grenzflächen, die alle inneren und äußeren Körperoberflächen von mehrzelligen Organismen bedecken. Dazu gehören vor allem die Haut, der Gastrointestinaltrakt und der

Respirationstrakt. Zunächst wurden dem Epithel zwei Schutzfunktionen zugeschrieben: eine physikalische, mechanische Barrierefunktion und eine Funktion als chemische Barriere, um den Eintritt von Keimen zu verhindern. Bestandteil der physikalischen Barriere sind sogenannte „tight junctions“ (zonula occludens). Diese sind Zell-Zell Verbindungen, welche benachbarte Epithelzellen so abdichten, dass keine gelösten Stoffe zwischen dem Luftraum der Lunge und dem Körpergewebe per Diffusion übertreten können. Neben der Keimabwehr durch „tight junctions“ und mukoziliärer Reinigung sind Epithelzellen des Respirationstraktes in der Lage, antimikrobielle Substanzen und Entzündungsmediatoren (chemische Barriere) zu sezernieren, denen eine besondere Bedeutung bei der Abwehr von Infektionen zukommt.

### 2.6.1 Antimikrobielle Substanzen

Lösliche Substanzen in der Atemwegsflüssigkeit spielen eine wichtige Rolle in der Immunität der Lunge. Dazu gehören Lysozym, Laktoferrin, sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>, secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI), Immunglobulin A und G, ebenso Surfactant-Proteine (SP-A und SP-D) und antimikrobielle Peptide wie Defensine und LL-37/CAP-18 (Martin and Frevert, 2005; Diamond et al., 2000). Lysozym kann bakterielle Membranen lysieren, indem es die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetyl-D-Muramin-Säure und N-Acetyl-Glucosamin im Peptidoglykangerüst spaltet. Laktoferrin besitzt die Eigenschaft, Eisen zu binden und kompetiert so mit Keimen um das verfügbare Eisen. Die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> setzt vermehrt Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Arachidonsäure frei. SLPI schützt das Gewebe gegen die Wirkung von Neutrophiler Elastase am Ort der Entzündung. SP-A und SP-D fungieren als zusätzliche Opsonine und fördern somit die Phagozytose von Erregern durch ortsständige Alveolarmakrophagen.

Antimikrobielle Peptide wirken gegen Bakterien und Pilze. Es gibt zwei Kategorien antimikrobieller Peptide: Kathelizidine und Defensine. Defensine sind amphiphatische Peptide mit kationischen Ladungen und hydrophoben Aminosäuren, die an unterschiedlichen Bereichen des Moleküls lokalisiert sind. Das ermöglicht eine Insertion in mikrobielle Membranen, die aus negativ geladenen Phospholipiden und hydrophoben Fettsäuren aufgebaut sind (Ganz, 2003; Selsted and Ouellette, 2005). Viele dieser Abwehrfunktionen sind in Epithelzellen konstitutiv aktiv.

Neuere Forschungsergebnisse deuten an, dass Epithelzellen darüber hinaus in der Lage sind, nach Pathogenkontakt Abwehrfunktionen zu induzieren. Dies bedingt, dass auch in Epithelien Mechanismen der Fremd/Selbsterkennung existieren müssen. In der Tat zeigte sich, dass Epithelzellen auf eine Stimulation hin Entzündungsmediatoren sezernieren (Martin and Frevert, 2005). Dazu gehört vor allem die Sekretion von Chemokinen (IL-8, MCP-1, CCL20, RANTES, und viele weitere Chemokine der CXCL/CCL-Familie) und von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6 und GM-CSF), welche professionelle Immunzellen an den Ort der Inflammation rekrutieren. Eine besondere Rolle bei der Fremd/Selbsterkennung in Epithelzellen, ebenso wie in DCs und Makrophagen, spielen die Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), wobei den TLRs die größte Bedeutung zugeschrieben wird.

## 2.7 Organspezifische Regulation des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem ist von großer Bedeutung für die Integrität eines mehrzelligen Organismus. Die physiologische Funktion des Immunsystems besteht darin, den Wirt vor Infektionen oder maligner Entartung zu schützen und bereits etablierte Infektionen zu eradizieren. Daher muss das Immunsystem in der Lage sein, zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ zu unterscheiden, was spezielle Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) gewährleisten. Das angeborene Immunsystem mit seinen PRRs erkennt molekulare, mikrobielle Strukturen (PAMPs), die jedoch nicht ausschließlich auf Pathogenen zu finden sind und daher inzwischen auch als MAMPs (microbe associated molecular patterns) bezeichnet werden (Sansonetti, 2006). Folglich ist das angeborene Immunsystem nicht in der Lage, zwischen residenter bzw. kommensaler Flora und pathogenen Erregern zu unterscheiden. Die Stimulation von TLRs führt zu einer Entzündungsreaktion, die auch das adaptive Immunsystem aktiviert, was letztlich zu einer Elimination des Erregers führt. Das ist eine protektive Reaktion in Organen, die primär als steril anzusehen sind (wie die Milz oder das Blut). In Organen, die mit einer kommensalen Flora besiedelt sind (Darm oder Haut) oder in denen regelmäßiger Kontakt mit Mikroben stattfindet (Lunge), müssen Kontrollmechanismen entwickelt werden, um chronische Entzündungsprozesse, welche in Folge Dysfunktion und Zerstörung der Epithelzellbarriere bewirken, zu verhindern und um Homöostase zu gewährleisten (Raz, 2007). Um diese organspezifische Homöostase zu erhalten, sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden.

Erstens ist durch den permanenten Kontakt mit Mikroben der Schwellenwert für die Aktivierung der TLRs je nach Organ unterschiedlich (Cross, 2002). Zweitens ist das Expressionsmuster und Expressionsniveau von PRRs zwischen Organen unterschiedlich (Smythies et al., 2005). Drittens sind TLRs nicht nur auf professionellen Immunzellen exprimiert, sondern auch auf anderen Zelltypen, wie z.B. Epithelzellen (Hertz et al., 2003; Pivarcsi et al., 2003). Dies ermöglicht eine Reaktion von Nicht-Immunzellen auf infektiöse Mikroorganismen und schafft die Voraussetzung für eine Pathogen-adaptierte Anpassung lokaler Prozesse durch organspezifische Zellen. Viertens existieren unterschiedliche Expressionsmuster von Molekülen, denen negativ-regulatorische Funktionen zugeschrieben wurden (Han and Ulevitch, 2005). Schließlich modulieren verschiedene lösliche Faktoren wie TGF- $\beta$  (Lunge und Darm) und IL-10 (Darm) die Funktionen von TLRs (Raz, 2007). Diese Mechanismen sind im Folgenden genauer beschrieben.

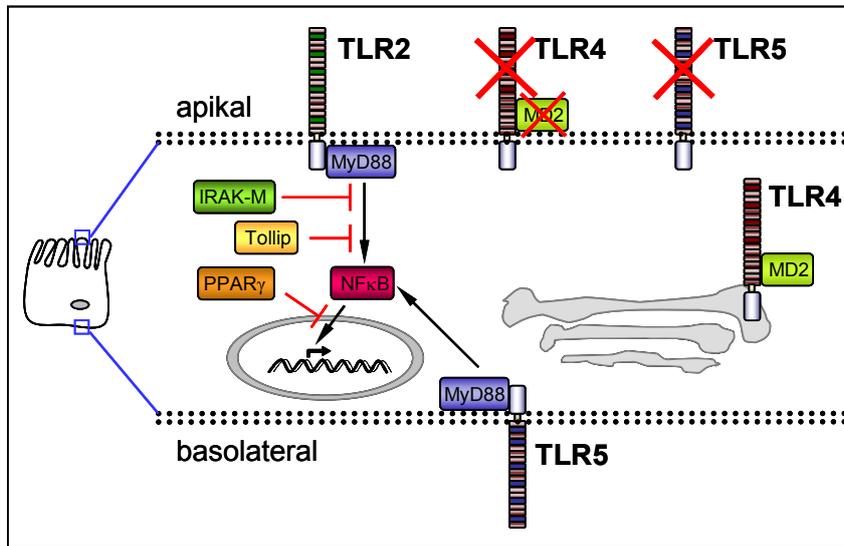
### 2.7.1 TLR Aktivierung und Regulation an mukosalen Oberflächen

Neben der Expression auf verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs), B-Zellen und T-Zellpopulationen werden TLRs auch auf Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes (Hornef et al., 2002; Zhang et al., 2004) und des Respirationstraktes (Sha et al., 2004; Greene and McElvaney, 2005; Basu and Fenton, 2004) exprimiert. Die TLR-Regulation an mukosalen Oberflächen wurde vor allem im Darm untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TLR4 nicht an der Oberfläche, sondern intrazellulär exprimiert wird (Hornef et al., 2003). Die Korezeptoren CD14 und MD2, die für die LPS Erkennung notwendig sind, werden ebenfalls nicht auf intestinalen

Epithelzellen exprimiert (Abreu et al., 2001), was eine permanente Entzündungsreaktion, induziert durch die Erkennung kommensaler Mikroorganismen, verhindert. Weiter wurde beschrieben, dass die Sensitivität von TLR4 kurz nach der Geburt, während der bakteriellen Besiedelung des Darmes, durch Kontakt mit LPS herunterreguliert wird (Lotz et al., 2006). Im respiratorischen Epithel wurde für TLR4 ebenfalls eine intrazelluläre Kompartimentalisierung gezeigt (Guillot et al., 2004). Für TLR5 wurde beschrieben, dass dieser im intestinalen Epithel basolateral und nicht apikal exprimiert wird (Gewirtz et al., 2001). Somit ist gewährleistet, dass keine Erkennung des Flagellins kommensaler *E. coli* Bakterien stattfindet, Flagellin von invasiven, das Epithel durchdringende, Salmonellen dagegen detektiert werden kann. Unabhängig von der Lokalisation der Toll-like Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der Erkennung („Schwelle“) über die Stärke der Rezeptorexpression reguliert werden kann (Lotz et al., 2006). Zudem kann eine Regulation über die Expression von Korezeptoren wie CD14 und CD36 erfolgen (Hoebe et al., 2005). Eine Reihe von inhibitorischen Molekülen wie SIGIRR (Xiao et al., 2007; O'Neill, 2003), Tollip (Burns et al., 2000; Zhang and Ghosh, 2002), IRAK-M (Kobayashi et al., 2002) oder A20 (Saitoh et al., 2005) scheinen in Epithelzellen ebenfalls von Bedeutung zu sein (Han and Ulevitch, 2005). Als weiterer regulatorischer Mechanismus für eine Aufrechterhaltung von Homöostase im Darm wurde eine Entkoppelung von NF $\kappa$ B Aktivierung und daraus resultierender Gentranskription über die Induktion von PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma ist ein Transkriptionsfaktor, der mit der Rel-A Untereinheit von NF $\kappa$ B interagiert) durch kommensale Bakterien im Darm beschrieben (Kelly et al., 2004). Die Regulation von Toll-like Rezeptoren im intestinalen Epithel ist in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt.

Kürzlich wurde in Atemwegsepithelzellen beschrieben, dass auf Chromatinebene die Rezeptorexpression und Sensitivität über eine Methylierung des TLR2 Promotors verändert werden kann (Shuto et al., 2006). Zusätzlich zeigte sich, dass bei chronischen Entzündungsreaktionen im Rahmen der Zystischen Fibrose die Methylierungsmuster im TLR2 Promotorbereich verändert waren, was eine erhöhte TLR2 Sensitivität zur Folge hatte. Chronische Entzündungsprozesse sind somit in der Lage, Pathogenerkennungsmechanismen in Epithelzellen dahingehend zu verändern, dass die epitheliale „Toleranz“ bzw. Homöostase aufgehoben wird. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine TLR Stimulation über endogene Liganden die Epithelzellintegrität erhält und zur Homöostase beiträgt. So wurde beschrieben, dass in der Lunge Abbauprodukte von Hyaluronsäure (eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix), die bei Entzündungsprozessen und Gewebeerstörung entstehen, von TLR4 und TLR2 auf Makrophagen erkannt werden und zur Zytokinfreisetzung führen. Polymere von Hyaluronsäure hingegen liefern ein protektives Signal für Epithelzellen, welches letztlich die Epithelhomöostase und Integrität erhält (Noble and Jiang, 2006; Jiang et al., 2005). Ein weiteres Beispiel für die Rolle von TLRs in der Erhaltung von Epithelintegrität und Homöostase im Darm zeigt, dass dafür die Erkennung der kommensalen Bakterienflora im Darm essentiell ist. So starben MyD88 knock-out Tiere (das zentrale Adaptorprotein der TLR Signalgebung) an DSS-induzierter Kolitis (Modell einer nicht-infektiösen Entzündung), wohingegen Wildtypmäuse

überleben. Die erhöhte Sterblichkeit war in dem Verlust der Epithelhomöostase begründet, was auf die fehlende Erkennung der kommensalen Bakterienflora zurückzuführen war, die einen protektiven Einfluss auf das Epithel hatte (Rakoff-Nahoum et al., 2004).



**Abbildung 2-1 TLR Regulation im intestinalen Epithel**

In intestinalen Epithelzellen sind verschiedene Mechanismen zur Regulation von TLR-vermittelter Erkennung von Mikroorganismen beschrieben worden: Die intrazelluläre Expression von TLR4, fehlende MD2 Expression an der Oberfläche, basolaterale Expression von TLR5 und die Expression von inhibitorischen Molekülen wie IRAK-M, PPAR $\gamma$  und Tollip.

### 2.7.2 Homöostatische Inhibition von Makrophagen und Dendritischen Zellen an epithelialen Grenzflächen

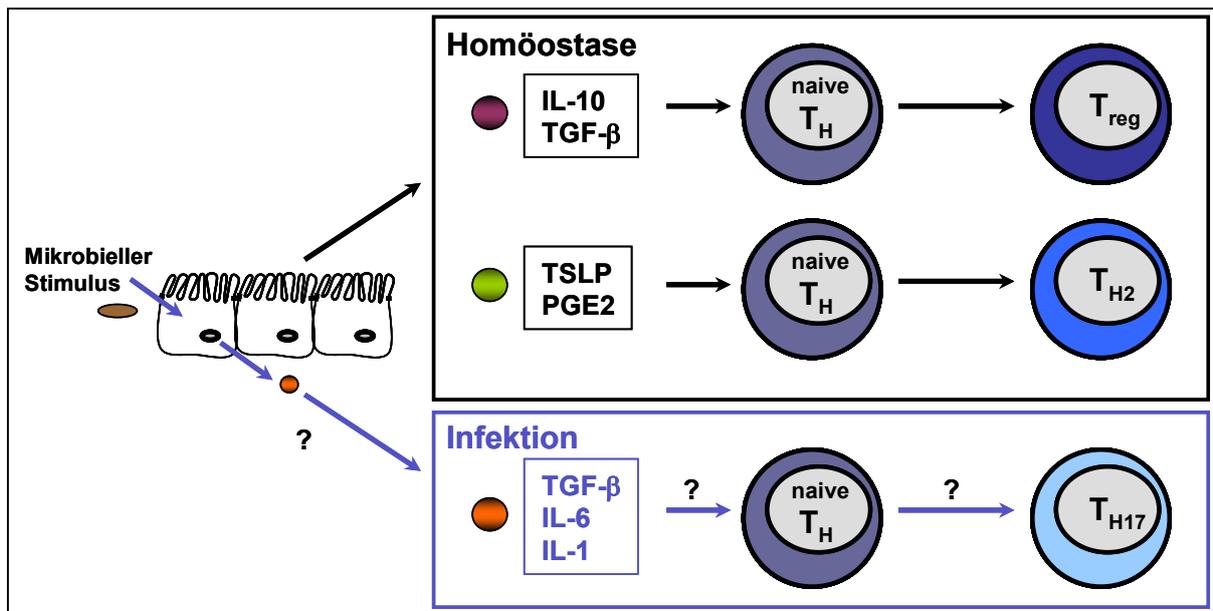
Für mukosale DCs ist bekannt, dass sie in der Lage sind, vorzugsweise T<sub>H2</sub>-Differenzierung zu begünstigen (Akbari et al., 2001; Alpan et al., 2001) und B-Zellen zur Produktion von Immunglobulin A stimulieren können (Sato et al., 2003). Das kann als Hinweis gewertet werden, dass mukosale DCs ein nicht-entzündliches Milieu induzieren können. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass Epithelzellen über eine Art „Mikromilieu-Regulation“ eine Umgebung schaffen, die professionelle Immunzellen beeinflussen kann. Dazu gibt es in der Literatur viele Hinweise. Im Respirationstrakt wurden verschiedene immunmodulierende Mechanismen diskutiert: Zytokine wie Interleukin-10 und Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) können modulierende Eigenschaften auf professionelle Immunzellen ausüben. Für Prostaglandine wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Stickoxid (NO) wurden ebenfalls modulierende Funktionen beschrieben (Bingisser and Holt, 2001).

Im Darm konnte gezeigt werden, dass intestinale Epithelzellen Dendritische Zellen phänotypisch und funktional verändern können, sodass diese eine reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle aufweisen und eine geringere T-Zellproliferation induzieren. Als löslicher Faktor wurde dabei TGF- $\beta$  diskutiert (Butler et al., 2006). TGF- $\beta$  wurde auch als modulierender Faktor beschrieben, der von intestinalen Stromazellen sezerniert wird und in mukosalen Makrophagen die Phagozytose und bakterizide Aktivität reduziert (Smythies et al., 2005). Ein weiterer Faktor wurde kürzlich identifiziert: Die Sekretion von TSLP aus Epithelzellen (Thymic stromal lymphopoietin). Es konnte gezeigt werden, dass TSLP DCs derart aktivierte, dass diese vermehrt Chemokine wie TARC (CCL17) und MDC (CCL22) sezernierten, welche T<sub>H2</sub>-Zellen anlocken (Soumelis et al., 2002; Zhou et al., 2005). Diese Inhibition von DCs durch das Epithel war bei Patienten mit Morbus Crohn aufgehoben. Das

konnte auf eine verminderte TSLP Expression zurückgeführt werden (Rimoldi et al., 2005). TSLP wurde auch in Epithelien von Asthmapatienten gefunden, was mit einer verstärkten  $T_{H2}$ -Differenzierung einherging (Ying et al., 2005). Weiter konnte gezeigt werden, dass IKK- $\beta$  defiziente Mäuse eine verminderte TSLP Expression zeigten, die eine reduzierte  $T_{H2}$ -Antwort zur Folge hatte (Zaph et al., 2007).

Auch für das Lungenepithel wurden regulatorische Inhibitionsmechanismen zwischen Epithelzellen und Alveolarmakrophagen gezeigt. Allerdings wurde dafür eine kontaktabhängige Inhibition über membranständiges TGF- $\beta$  beschrieben (Takabayshi et al., 2006). Es wurde folgendes Schema für einen „homöostatischen Kreislauf“ postuliert: Zunächst befinden sich Alveolar-Makrophagen (AM) und alveolare Epithelzellen (AEC) in einem stabilen Zustand tonischer Inhibition. Dabei präsentieren AEC TGF- $\beta$  über das Integrin  $\alpha\beta 6$  dem TGF- $\beta$ -Rezeptor auf Alveolar-Makrophagen. Werden eindringende Bakterien im Alveolarraum von den Makrophagen erkannt, so ändert sich über eine Aktinpolymerisierung die Form der Alveolar-Makrophagen, was die Verbindung zwischen AM und AEC über Integrin  $\alpha\beta 6$  und TGF- $\beta$ -Rezeptor zerstört. Im Gefolge kann sich der Makrophage von der AEC ablösen, was zu einer verminderten TGF- $\beta$  Signalgebung führt. Dadurch werden die Alveolar-Makrophagen aus der Inhibition durch AEC entlassen. Nach 48 h produzieren die Alveolar-Makrophagen MMP9 (matrix metalloproteinase 9), welches latentes TGF- $\beta$  aktivieren kann. Dieses kann dann an die TGF- $\beta$ -Rezeptor auf AM und AEC binden und eine Expression von  $\alpha\beta 6$  Integrin auf AEC induzieren. Somit ist die tonische Inhibition von Alveolar-Makrophagen wiederhergestellt.

All diese Befunde zeigen, dass gewebsspezifische Faktoren die Abwehrstrategien des professionellen Immunsystems bei Infektionen modulieren können. Epithelzellen in der Lunge produzieren große Mengen an TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  ist für die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{regs}$ ) von Bedeutung. Somit ist denkbar, dass das „bronchiale Mikromileu“ über die Induktion von  $T_{regs}$  zur Toleranz in diesem semi-sterilen Kompartiment beitragen kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine mikrobielle Stimulation von TLRs auf DCs eine Reduktion der Suppression von  $T_{regs}$  bedingt und damit „tonische Inhibition“ reduzierte (Pasare and Medzhitov, 2003). Dies war von IL-6 und IL-1 abhängig. Beide Zytokine sind im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$  ebenfalls entscheidend für die Differenzierung von  $T_{H17}$  Zellen (Weaver et al., 2006). Diese Zytokine können allesamt von Epithelzellen produziert werden. Daher könnte postuliert werden, dass es nach einer Infektion (und erfolgter Stimulation des Epithels über Toll-like Rezeptoren) zu einer Entlassung aus dem Zustand der tolerogenen DCs/  $T_{regs}$  hin zu einem aktivierten Zustand von DC/  $T_{H17}$  kommen könnte („release of inhibition“; siehe Abbildung 2-2). Dafür wären Regulationsprozesse im Epithel essentiell.



**Abbildung 2-2 Einfluss von Epithel auf die T-Helferzell Differenzierung**

Im Darm wurde beschrieben, dass Epithelzellen ein mukosales Mikromilieu bilden, welches über die Induktion von T<sub>regs</sub> zur Toleranz in diesem nicht-sterilen Kompartiment beitragen kann. Zusätzlich wurde beschrieben, dass TSLP aus Darmepithelien eine Differenzierung von T-Helferzellen zu T<sub>H2</sub> hin begünstigt. TGF-β, IL-6 und IL-1 sind essentiell für die Differenzierung von T<sub>H17</sub> Zellen.

## 2.8 Wissenschaftliche Fragestellung

In der vorgelegten Arbeit werden experimentelle Untersuchungen zur Rolle von bronchialen Epithelzellen in der Abwehr von Infektionen und bei der Regulation von Immunantworten vorgelegt. Hierzu wurden drei Hypothesen bearbeitet:

### 1. Bronchiale Epithelzellen sind einfache Immunzellen

Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Expression von Erkennungsmolekülen für mikrobielle Stimuli auf Atemwegsepithelzellen bekannt. Deshalb sollten zunächst verschiedene Mustererkennungsrezeptoren auf ihre Expression in humanen Atemwegsepithelzelllinien und in primären, humanen Epithelzellen untersucht werden. Funktionell sollten die Rezeptoren durch Stimulation mit hochgereinigten und genau definierten Liganden analysiert werden. Zur näheren Analyse der Antwortmuster von respiratorischen Epithelien auf die Stimulation mit pathogenen Erregern sollte eine genomweite Genexpressionsanalyse mittels Arraytechnologie durchgeführt werden. Dabei sollten Antwortmuster bronchialer Epithelzellen auf Stimulation mit prototypischen Atemwegspathogenen identifiziert werden.

### 2. Homöostatische Inhibition professioneller Immunzellen durch bronchiale Epithelzellen

Aus der Literatur waren bereits Vorbefunde über den Einfluss von intestinalem Epithel auf DCs und Makrophagen publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Weiteren der Einfluss von bronchialen Epithelzellen auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems untersucht. Dazu sollte in Kokultur Experimenten mit Atemwegsepithelzellen und DCs, Monozyten oder T-Zellen untersucht werden, ob auf Zellen des Immunsystems ein modulierender Einfluss von Epithelzellen beobachtet werden kann. Zusätzlich sollten potentielle Wechselwirkungen bezüglich der zu Grunde liegenden Mechanismen auf Seiten der Epithelzellen und auch in den durch bronchiale Epithelzellen beeinflussten Zellen genauer charakterisiert werden.

### 3. Isolation und Kultivierung primärer muriner Atemwegsepithelzellen

Schließlich sollte die Etablierung eines primären murinen Atemwegsepithel-Systems erfolgen, da das murine System einen leichteren Zugang zu primären Zellen gewährleisten kann. Zusätzlich können verschiedene „knock out“ Bedingungen getestet werden. Dazu sollten tracheale Epithelzellen isoliert und morphologisch sowie funktionell charakterisiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach,
Brutschrank	BBD 6220, Heraeus Instruments, Hanau
Chemilumineszenzsystem	Chemi-Smart 2000, Peqlab, Erlangen
Cycler	Primus <sup>advanced</sup> 25 & 96, Peqlab, Erlangen
Densimeter	DENSIMAT, BioMérieux, Marcy, Frankreich
Durchflusszytometer	BD FACS Canto, BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenz-Inversmikroskop	Leica DMI 6000B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Gelkammer	PerfectBlue Mini ExM, Gelgröße 14,4 x 10,2 cm, Peqlab, Erlangen
Geldokumentationssystem	CN-3000.WL, Peqlab, Erlangen
Harvester	Filtermate Harvester, PerkinElmer, Wellesley, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
Inkubator	Inkubator 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Inversmikroskop	Axiovert 25 CFL, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Luminometer	Chameleon V microplate reader, Hidex, Turku, Finnland
Magnetrührer	IKA <sup>®</sup> RCT basic, IKA <sup>®</sup> -Labortechnik, Staufen i.Br.
Mikrotiterplatten-Photometer	SUNRISE Absorbance Reader, Tecan, Salzburg, Österreich
Mikrozentrifugen	Biofugen fresco und pico, Heraeus Instruments, Hanau
Minischüttler (Vortexer)	MS 1, IKA <sup>®</sup> Works, Inc., Wilmington, USA
Netzgerät	PowerSupply 1000/500, Bio-Rad, München
Ohm-Meter	Millicell <sup>®</sup> -ERS, Millipore Corporation, Billerica, USA
Orbitalschüttler	Rocky <sup>®</sup> 3D, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
pH-Meter	Seven Easy, Mettler Toledo, Gießen
Real-time PCR Cycler	7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler	Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Spektrophotometer	NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Herasafe, Klasse II, Heraeus Instruments, Hanau

Szintillations-Messgerät	Chameleon V microplate reader, Hidex, Turku, Finland
UV-Kammer	Bio-Link™ Crosslinker BLX-254, Peqlab, Erlangen
Waage	EW600-2M, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Zählkammer	Neubauer 0,0025mm <sup>2</sup> /0,1mm, Brand GmbH, Schwerin
Zentrifugen	Biofuge stratos, Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments, Hanau

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

Blot-Membran	Immobilon-P Transfer Membran, 0,45 µm Porengrösse, Millipore, Billerica, USA
Blotting-Papier	Whatman® GB003, Whatman GmbH, Dassel
ELISA-Platten	Nunc-Immuno™ Plate, Maxisorp™ Surface, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
FACS-Röhrchen	BD Falcon™ 5 ml, BD Biosciences, Heidelberg
Filter-Papier	Glass Fiber Filter, Easy Tab-C Self Aligning Filters, RG, Packard Instruments, PerkinElmer, Wellesley, USA
Kanülen	Venofix® 0,8 x 20 mm, Braun, Melsungen 27G, 0,4 mm x 19 mm, BD Biosciences, Heidelberg
Kryo-Röhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kulturröhrchen	Cellstar® 15 ml und 50 ml Falcon-Röhrchen (Polystyrol), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Lumineszenz-Platten	CulturePlate™-96 (white), PerkinElmer, Wellesley, USA
Pasteur Pipetten	Sterile Einmal-Pipetten, LP ITALIANA SPA, Mailand, Italien
PCR-Platten	Thermo-Fast®96 Detection Plate, ABgene House, Epsom, UK
PCR-Platten-Abdeckfolien	Absolute QPCR Seal, ABgene House, Epsom, UK
PCR-Reaktionsgefäße	PP-PCR-Gefäße, Nat. 0,2 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Gefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; Eppendorf AG, Hamburg
Rundboden-Platten (U-Form)	Cellstar® 96-well plate, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Skalpelle	Disposable Scalpels, Feather Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan
Spritzen	BD Discardit II, 5 ml, BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter	Millex®-GS 0,22 µm, Millipore, Billerica, USA
Transwelleinsätze/Platten	Costar® 6,5 mm Transwell®, 0,4 µm Porengrösse, Klares Polyester, 24 well, Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflaschen	Cellstar® 25 cm <sup>2</sup> / 75 cm <sup>2</sup> / 175 cm <sup>2</sup> , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Cellstar® 6-/12-/24-/96-well plates, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	2 mm x 17 mm (58 cm <sup>2</sup> ), 144 mm x 21 mm (145 cm <sup>2</sup> ), Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden

Zellschaber

Disposable Cell Scraper, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 3.1.3 Kits

Absolute SYBR Green Rox Mix	ABgene House, Epsom, UK
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche, Mannheim
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
BD OptEIA™ Human ELISA Set (IL-8, IL-6, IL-12p40)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
BD OptEIA™ Mouse ELISA Set (IL-12p40, TNF- $\alpha$ Mono/Poly)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
DuoSet® ELISA Development System (TGF- $\beta$ 1)	R&D Systems, Minneapolis, USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
High Speed Maxi Kit	Qiagen, Hilden
High Speed Midi Kit	Qiagen, Hilden
Luminescence Reporter Gene Assay System	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
pcDNA™ 3.1 Directional TOPO® Expression kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T Cell Activation/Expansion kit human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Top10 One Shot™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

#### 3.1.4.1 Allgemeine Chemikalien

Allgemeine Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen und hatten den Reinheitsgrad „reinst“ oder „pro analysi“.

Acrylamid rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose-Standard	Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad injectabilia, 10 ml/1000 ml	Braun, Melsungen
Biocoll-Trennlösung, 1,077 g/ml	Biochrom AG, Berlin

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cell dissociating buffer, enzyme free	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
CFDA-SE/CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
Columbia-Agar (+5% Schafsblut)	BD Biosciences, Heidelberg
Confortid® 50 mg	Alpharma-Isis GmbH&Co. KG, Langenfeld
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM : Ham's F12 1:1 Mix	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1x)	Biochrom AG, Berlin
ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Eisennitrat/Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure 100%	Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FcR-Block	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Fötales Kälberserum (FCS) <sup>1</sup>	Biowest, Nuaille, Frankreich
Formamid	Applichem, Darmstadt
Formaldehydlösung 37%	Grüssing GmbH, Filsum
Gel-Ladepuffer (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Igepal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin, human, rekombinant	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Kollagen Typ VI (humane Plazenta)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Latex-beads-FITC; 1,0 µm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB-Broth-Pulver	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Leupeptin (-hydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Biochrom AG, Berlin
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Liquemin®	Roche, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>1</sup> FCS Chargennummer: S04224S1810, Endotoxingehalt: 0,2 EU/ml

Methanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Mounting Medium	AF1, Citifluor Ltd., London, UK
Methylthiazoltetrazolium (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom AG, Berlin
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat, 100 mM	Biochrom AG, Berlin
Natronlauge 1 M	Merck, Darmstadt
OptiMEM	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS instamed 9,55 g/l	Biochrom AG, Berlin
PBS (1x) für Zellkultur	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt
SB 431542 hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure 1 M	Merck, Darmstadt
<sup>3</sup> H-Thymidin (37GBq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Tetramethylbenzidin (TMB)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ultrosor® G	Pall Biosepra, Cergy, Frankreich
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>2</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> wurde in einer Konzentration von 200 mM in Aqua dest gelöst. Der pH Wert wurde mit NaOH und HCl auf pH 10 eingestellt. Die Lösung wurde gekocht bis sie klar wurde. Das Aufkochen der Lösung und die pH-Einstellung wurden so oft wiederholt bis sich der pH Wert stabilisiert hatte.

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

#### 3.1.5.1 Wasser

Um immunologische Experimente mit diversen mikrobiellen Stimuli durchführen zu können, ist die Abwesenheit von kontaminierenden mikrobiellen Bestandteilen, insbesondere Endotoxin, in den Lösungen entscheidend. Aus diesem Grund wurden alle Medien, Puffer, Lösungen und Stimulanzen für die Zellkultur mit pyrogen-freiem Wasser für Injektionszwecke der Firma Braun, Melsungen angesetzt.

#### 3.1.5.2 PBS (Phosphate buffered saline)

Instated PBS (Phosphate buffered saline) wurde nach Angaben des Herstellers in 1.000 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Dies ergab eine 10 x konzentrierte Stammlösung, aus der die 1 x konzentrierte Gebrauchslösung durch Verdünnung in Aqua dest. hergestellt wurde.

#### 3.1.5.3 Lösungen

	Konzentration	Lösungsmittel	Lagerung
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml	Aqua dest	-20°C
Aprotinin	1 mg/ml	Aqua dest	-20°C
DAPI	14,3 mM	Aqua dest	-20°C
Ethidiumbromid	10 mM	Aqua dest	4°C
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M	Aqua dest	RT
Leupeptin	1 mg/ml	Aqua dest	-20°C
β-Mercaptoethanol	10 mM	PBS, steril filtriert	-20°C
Natriumfluorid	200 mM	Aqua dest	RT
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	200 mM	Aqua dest	-20°C
Paraformaldehyd	4% (w/v)	PBS, gelöst bei 56°C	-20°C
Pepstatin	1 mg/ml	Methanol	-20°C
PMSF	200 mM	Isopropanol	RT
Trypanblau	2 mg/ml	PBS, steril filtriert	RT

#### 3.1.5.4 Puffer

##### RIPA-Lysepuffer

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1% Igepal

0,25% Natriumdeoxycholat

150 mM NaCl

1 mM EDTA

Supplementierung des Puffers direkt vor Gebrauch mit:

Je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin, je 1 mM PMSF, NaF und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

4x SDS-Probenpuffer

40% (v/v) Glycerol  
400 mM β-Mercaptoethanol  
200 mM 1 M Tris-HCl, pH 6,8  
0,4% (w/v) Bromphenolblau  
4% (w/v) SDS

TAE (Tris acetate EDTA, 50x)

2 M Tris-Base  
1 M konz. Essigsäure (100%)  
0,05 M EDTA, pH 8,0

SDS-Blotpuffer (10 min entgast)

25 mM Tris-Base, pH 8,3  
192 mM Glycin  
0,1% SDS

SDS-Laufpuffer (10 min entgast)

25 mM Tris-Base, pH 8,3  
192 mM Glycin  
10% Methanol

2x SDS-Sammelgelpuffer

250 mM Tris-HCl, pH 6,8  
0,2% SDS

3x SDS-Trenngelpuffer

1,125 mM Tris-HCl, pH 8,8  
0,3% SDS

TBS (Tris buffered saline)

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
150 mM NaCl

TE (Tris/EDTA)

10 mM Tris-HCl, pH 7,4  
1 mM EDTA

Blockpuffer (Western Blot)

3% BSA, 0,1% Tween 20 in TBS

Waschpuffer (Western Blot)

3% BSA in TBS

Coating-puffer pH 9,5 (ELISA)

0,1 M Natriumkarbonat:  
8,4 g NaHCO<sub>3</sub>  
3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
pH 9,5  
ad 1000 ml Aqua dest.

Coating-puffer pH 6,5 (ELISA)

0,2 M Natriumphosphat:  
11,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
16,1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 6,5  
ad 1000 ml Aqua dest.

Waschpuffer (ELISA)

0,05% Tween 20 in PBS

### 3.1.6 Primer für quantitative „real time“-RT-PCR

Primer wurden mittels der über das Internet zugänglichen Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) unter Berücksichtigung der Exon-Intron-Strukturen entworfen, sofern eine monoexonische Genstruktur vorlag. Somit wurden Primer generiert, welche cDNA, nicht aber genomische DNA amplifizieren konnten. Lyophilisierte Primer wurden im Maßstab 0,01 µmol, Reinheit HPSF, von MWG Biotech, Martinsried synthetisiert. Sie wurden in Aqua dest. gelöst und auf eine Endkonzentration von 50 pmol/µl eingestellt. Anschließend wurden die Primer aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

**Tabelle 3-1 Primersequenzen für die Amplifikation humaner Transkripte**

Gen	Sequenz 5'-3'	Amplifikat aus cDNA	genomisches Amplifikat	Position	Datenbank <sup>1</sup>
A20	fw GCC CTC ATC GAC AGA AAC AT rv GAA CAG CGC CTT CCT CAG TA	183 bp	_2)	265 - 284 447 - 428	NM_006290
β-Aktin	fw AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC rv AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	184 bp	_2)	186 - 205 969 - 950	NM_001101
CCL2 (MCP-1)	fw CTG CTC ATA GCA GCC ACC TT rv CAG ATC TCC TTG GCC ACA AT	194 bp	_2)	102 - 121 295 - 276	NM_002982
CCL20 (MIP-3α)	fw GCT TTG ATG TCA GTG CTG CT rv GCA TTG ATG TCA CAG CCT TC	155 bp	_2)	89 - 108 243 - 224	NM_004591
CD36	fw CTG TCA TTG GTG CTG TCC TG rv CCT GTG GAT TTT GCA CAT CA	186 bp	_2)	170 - 189 355 - 336	NM_000072
CXCL1 (GRO-α)	fw CAC CCC AAG AAC ATC CAA AG rv TTG GAT TTG TCA CTG TTC AGC	164 bp	_2)	236 - 255 399 - 379	NM_001511
CXCL2 (GRO-β)	fw GCA GGG AAT TCA CCT CAA GA rv GGA TTT GCC ATT TTT CAG CA	172 bp	172 bp	221 - 240 392 - 373	NM_002089
CXCL3 (GRO-γ)	fw CGT CCG TGG TCA CTG AAC T rv CAA GCT TTC TTC CCA TTC TTG	151 bp	_2)	266 - 284 416 - 396	NM_002090
CXCL5 (ENA-78)	fw GGT CCT TCG AGC TCC TTG T rv CTA TGG CGA ACA CTT GCA GA	178 bp	_2)	136 - 154 313 - 194	NM_002994
CXCL10 (IP-10)	fw TGA ATC AAA CTG CGA TTC TG rv ACA AAA TTG GCT TGC AGG AA	170 bp	_2)	68 - 87 237 - 118	NM_001565
dectin-1	fw TTA CAC TTC GAC TCT CAA AGC A rv CAT GGT ACC CAG GAC CAC A	150 bp	_2)	52 - 73 201 - 183	AY026770
DUSP4	fw TTT CCT CCG AGT ACC CAG AAT rv CAC TGC CGA GGT AGA GGA AG	174 bp	_2)	839 - 859 1012 - 993	NM_001394
ICAM-1	fw CAT AGA GAC CCC GTT GCC TA rv AGT TCC ACC CGT TCT GGA GT	177 bp	_2)	234 - 253 410 - 391	NM_000201
IL-1β	fw AGC TGA TGG CCC TAA ACA GA rv GCA TCT TCC TCA GCT TGT CC	158 bp	_2)	162 - 181 319 - 300	NM_000576
IL-8	fw TCC TGA TTT CTG CAG CTC TGT rv AAT TTC TGT GTT GGC GCA GT	161 bp	_2)	139 - 159 299 - 280	NM_000584
IL-10	fw TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA rv GGT CTT GGT TCT CAG CTT GG	170 bp	_2)	197 - 216 366 - 347	NM_000572
IL-11	fw ACA GCT GAG GGA CAA ATT CC rv TCT TCA GGG AAG AGC CAC CT	188 bp	_2)	310 - 329 497 - 478	NM_000641
MMP-2	fw ACC CAG ATG TGG CCA ACT AC rv GGT CAC ATC GCT CCA GAC TT	155 bp	_2)	311 - 330 465 - 446	NM_004530
MMP-12	fw ATG CAG CAC TTC TTG GGT CT rv TCA CGG TTC ATG TCA GGT GT	185 bp	_2)	211 - 230 395 - 376	NM_002426
MRC	fw GTG CAT TCC CGT TCA AGT TT rv AGC TTT CAC TGC CCT CAA AT	153 bp	_2)	606 - 625 758 - 739	NM_002438

NOD1	fw CTC CTT CGT CCT GCA TCA CT rv CAG CTC TTC GCT TAG CAC CT	172 bp	_2)	2509 - 2528 2680 - 2661	AF113925
NOD2	fw ATC TTC ACA CCG TCC CAG AG rv GAA GCG AGA CTG AGC AGA CA	189 bp	_2)	625 - 644 813 - 794	AF178930
NR4A2	fw GGG CTG CAA AGG CTT CTT TA rv TCT TTG ACC ATC CCA ACA GC	150 bp	_2)	1178 - 1197 1327 - 1308	NM_173171
PGRP-Ia	fw TCC CAT TCC GTC TAC ACC AT rv CTG GGA CTG CTG CCT ATC TT	176 bp	_2)	267 - 286 442 - 423	AY035376
PGRP-Ib	fw GCT GTT GGC TGC AGT ATT CA rv CCT TCA TAC ACC CTG CCA TC	197 bp	_2)	258 - 277 454 - 435	AY035377
PGRP-L	fw CTT CAG TGC ATG AGC CAA GA rv AGG CAC GTA GGT GTG ATG C	189 bp	_2)	1083 - 1102 1271 - 1253	AY384856
PGRP-S	fw TGT GCA GCA CTA CCA CAT GA rv TGT AGT TGC CCA TGA AGC TG	170 bp	_2)	281 - 300 450 - 431	AF076483
RGS4	fw CGG CTT CTT GCT TGA GGA rv CAG CCC ATT TCT TGA CTT CC	156 bp	_2)	150 - 167 305 - 286	NM_005613
SOD2	fw TGA ACA ACC TGA ACG TCA CC rv CGT TAG GGC TGA GGT TTG TC	150 bp	150 bp	180 - 199 329 - 310	NM_00636
Tollip	fw AGA ATC CCC GCT GGA ATA AG rv ACC ACT TGT CCT CCA CCT TG	168 bp	168 bp	398 - 471 565 - 546	NM_019009
TLR1	fw AGT TGT CAG CGA TGT GTT CG rv GGA AAA ATC CAA ATG CAG GA	151 bp	151 bp	918 - 937 1068 - 1049	NM_003263
TLR2	fw CCT GTG TGA CTC TCC ATC CCA rv AAC AGA GCA CAG CAC ATG CC	111 bp	111 bp	1905 -1924 2015 - 1996	NM_003264
TLR3	fw GTG CCA GAA ACT TCC CAT GT rv ATG TGA TTA AAT TCT TCT GCT TGA C	173 bp	_2)	383 - 402 555 - 531	NM_003265
TLR4	fw CCA GAG CCG CTG GTG TAT CT rv AGA AGG CGG TAC AGC TCC AC	141 bp	141 bp	2226 - 2245 2366 - 2347	NM_138554
TLR5	fw GAG CCC CTA CAA GGG AAA AC rv TGC TGA TGG CAT TGC TAA AG	184 bp	184 bp	1212 - 1231 1395 - 1376	NM_003268
TLR6	fw TGG GAT TGA GTG CTA TGA AGC rv GGT GAA GGG TTT TTG CAT TC	150 bp	150 bp	518 - 538 667 -	NM_006068
TLR7	fw AAT GTC ACA GCC GTC CCT AC rv TTA TTT TTA CAC GGC GCA CA	185 bp	185 bp	782 - 801 966 - 987	NM_016562
TLR8	fw TCC TTC AGT CGT CAA TGC TG rv CGT TTG GGG AAC TTC CTG TA	167 bp	167 bp	219 - 238 385 - 366	NM_016610
TLR9	fw CCA CCC TGG AAG AGC TAA ACC rv GCC GTC CAT GAA TAG GAA GC	161 bp	161 bp	244 - 264 404 - 385	NM_138688
TLR10	fw ACT TTG CCC ACC ACA ATC TC rv CCC AGA AAA GCC CAC ATT TA	174 bp	174 bp	2242 - 2261 2415 - 2396	NM_001017388
TGF-β	fw GAG CCT GAG GCC GAC TAC TA rv GGG TTC AGG TAC CGC TTC TC	150 bp	_2)	1133 - 1152 1282 - 1263	NM_000660
TSLP	fw TAT CTG GTG CCC AGG CTA TT rv TTT CAG TAA AGG TCG ATT GAA GC	151 bp	_2)	274 - 293 424 - 402	BC022894
VEGF	fw CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT rv CAC ACA GGA TGG CTT GAA GA	187 bp	_2)	48 - 67 234 - 215	AF486837

1): National Center for Biotechnology Information (NCBI: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

2): kein Amplifikat, da Exon/Intron Struktur berücksichtigt wurde bzw. das mögliche genomische Amplifikat zu groß für einen Nachweis ist

fw: forward, rv: reverse

### 3.1.7 Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmidname	Basisvektor	Insert	Beschreibung	Herkunft
pEF-SEM	pCDNA3 (Invitrogen)	Neomycin Resistenz-Kassette, EF1 $\alpha$ Promotor	Expression einer Neomycin Resistenz-Kassette unter der Kontrolle des EF1 $\alpha$ Promotors	H. Häcker <sup>1</sup> , München
pCDNA3- TLR2-GFP	pCDNA3 (Invitrogen)	Fusionsprotein aus humanem TLR-2 und GFP	Expressionsplasmid für das TLR- 2-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle eines CMV Promotors	T. Espevik <sup>2</sup> , Trondheim, Norwegen
pCDNA3.1- CD36	pCDNA3.1D/V5- His-TOPO (Invitrogen)	Fusionsprotein aus humanem CD36 und 6x Histidin	Expressionsplasmid für das CD36-His Fusionsprotein unter der Kontrolle eines CMV Promotors	A. Mayer <sup>3</sup> , Heidelberg
p6NF- $\kappa$ B-Luc	pGL3 (Promega)	Luziferase, 6xNF- $\kappa$ B Minimalpromotor	Expression eines Firefly-Luzi- ferasegens unter der Kontrolle von 6xNF- $\kappa$ B Bindestellen	C. Kirschning <sup>1</sup> , München

<sup>1</sup> Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, München, Deutschland

<sup>2</sup> Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norwegen

<sup>3</sup> Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Heidelberg, Deutschland

### 3.1.8 Marker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100-10000 bp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (100-3000 bp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.1.9 Enzyme

AccuTaq™ LA DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I, Rinderpankreas, 11284932001	Roche, Mannheim
Pronase E ( <i>Streptomyces griseus</i> ), P6911	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen, div.	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

### 3.1.10 Antikörper

#### 3.1.10.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper, mit Ausnahme des anti-TLR2 (eBioscience, San Diego, USA), wurden gebrauchsfertig von BD Pharmingen, Heidelberg, bezogen. Die humanen Antikörper wurden 1:10 (v/v) und murine Antikörper 1:100 (v/v) eingesetzt. Die Antikörper sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

**Tabelle 3-2 FACS-Antikörper**

Spezies	Antigen	Farbstoff <sup>1)</sup>	Klon
anti-human	CD1a	APC	HI149
anti-human	CD36	PE	CB38 (NL07)
anti-human	CD40	FITC	5C3
anti-human	CD80	PE	L307.4
anti-human	CD86	PE	IT2.2
anti-human	HLA-DR, DP, DQ (MHCII)	FITC	TÜ39
anti-human	TLR2	FITC	TL2.1

Spezies	Antigen	Farbstoff <sup>1)</sup>	Klon
anti-maus	B220	PE	RA3-6B2
anti-maus	CD11c	APC	HL3
anti-maus	CD40	FITC	HM 40-3
anti-maus	CD80	PE	16-10A1
anti-maus	CD86	PE	GL1
anti-maus	I-A/I-E (MHCII)	FITC	2G9

1) APC= Allophycocyanin; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; PE = R-Phycoerythrin

### 3.1.10.2 Antikörper für Immunhistologie/-zytologie (anti-Maus)

Anti-Smooth muscle actin, Klon 1A4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Vimentin, Klon LN-6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Pan Cytokeratin, C-11	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Zona occludens 1, 61-7300	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
Anti-E-Cadherin, 610181	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus IgG FITC, F-1010	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Goat-anti-rabbit IgG Texas Red <sup>®</sup> , 111-075-144	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, UK

### 3.1.10.3 Antikörper für Westernblot

Tetra-His Antibody, 34670	Qiagen, Hilden, Germany
goat anti-mouse IgG HRP, sc-2005	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA

### 3.1.10.4 Blockierende Antikörper

Anti-TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, MAB1835	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IgG <sub>1</sub> Isotyp Kontrolle, MAB002	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 3.1.10.5 Antikörper für die MACS<sup>®</sup>-Aufreinigung

Für die Sortierung von Zellen aus humanen PBMCs wurden CD14MicroBeads und CD3MicroBeads der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, verwendet.

### 3.1.11 Stimulanzen

#### 3.1.11.1 Mikrobielle Stimulanzen für Rezeptoren des angeborenen Immunsystems („pattern recognition receptors – PRR“)

##### Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>) – TLR2 und TLR1

Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>) wurde von EMC microcollections GmbH, Tübingen bezogen und ist ein synthetisches triacyliertes Lipopeptid, welches dem acetylierten Aminoterminus bakterieller Lipopeptide entspricht. Es stimuliert das Heterodimer aus TLR2 und TLR1. Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

##### Lipoteichonsäure (LTA) – TLR2

Lipoteichonsäure ist ein Bestandteil der Zellwand von gram-positiven Bakterien und wirkt als Stimulus für TLR2/TLR6. LTA wurde freundlicherweise von S. Morath, Konstanz, zur Verfügung gestellt. LTA wurde aus *Staphylococcus aureus* isoliert, massenspektroskopisch auf Reinheit überprüft und auf Endotoxinfreiheit getestet (Morath et al., 2001). LTA wurde als Stammlösung von 10 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

##### R-FSL-1/S-FSL-1 – TLR2 und TLR6

Dieses MALP-2 (macrophage activating lipopeptide of 2 kDa ursprünglich aus *Mycoplasma fermentans* isoliert) Analogon besteht aus dem N-terminalen Ende des 44 kDa Lipoprotein LP44 von *Mycoplasma salvarium* und wurde von EMC microcollections GmbH, Tübingen bezogen. Die stereoisomeren diacylierten Lipopeptide R-FSL-1/S-FSL-1 geben ihr Signal über TLR2 und TLR6 Heterodimere an die Zelle weiter. Für die beiden Stereoisomere ist eine differenzielle Abhängigkeit von CD36 beschrieben worden (Hoebe et al., 2005). Sie wurden in Aqua dest. in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

##### Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) – TLR3

Poly(I:C) wurde von Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen und ist ein synthetisches Analogon zu dsRNA. Poly(I:C) stimuliert TLR3 (Alexopoulou et al., 2001). Es wurde eine Stammlösung von 5 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

##### RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) – TLR3

RSV ist ein umhülltes Virus mit einzelsträngiger Minus-RNA aus der Gruppe der Paramyxoviren. Ein Zwischenprodukt der Virusreplikation ist doppelsträngige RNA, die ein Ligand für den TLR3 und die Protein Kinase R (PKR) ist (Groskreutz et al., 2006). Die Übertragung von RSV erfolgt durch Tröpfcheninfektion und verursacht Infektionen im oberen Respirationstrakt: Schnupfen, Husten, Bronchitis, Mittelohrentzündung vor allem bei Kleinkindern und immungeschwächten Menschen. RSV

strain A2 wurde freundlicherweise von S. Ehl, Freiburg zur Verfügung gestellt und in Aliquots mit  $1,2 \times 10^7$  pfu/ml bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Lipopolysaccharid (LPS) – TLR4

Gram-negative Bakterien besitzen als Bestandteil ihrer Zellwand Lipopolysaccharid, welches aus einem Lipid-A-Anteil und einer für den jeweiligen Bakterienstamm spezifischen Polysaccharidkette zusammengesetzt ist. Aufgereinigtes LPS stimuliert den TLR-4 (Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999). Das hier verwendete hochreine S-LPS wurde aus *Salmonella minnesota* (HL63, smooth-Form) gewonnen und war eine Überlassung von U. Seydel, Forschungszentrum Borstel. LPS wurde in Aqua dest. gelöst und als  $100 \mu\text{g/ml}$ -Stammlösung aliquotiert bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### R848 – TLR7 und TLR8

R848 ist ein synthetisches Purin-Analogon (Hemmi et al., 2002) und stimuliert TLR7 und TLR8. R848 wurde von Invivogen, Toulouse, Frankreich bezogen und als Stammlösung von  $1 \text{ mg/ml}$  gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  in Aliquots gelagert.

#### CpG-Oligodesoxynukleotid (CpG-ODN) – TLR9

Das verwendete CpG-ODN 2006-PTO (2006-PTO 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3') wurde von TIB Molbiol, Berlin in einem Synthesemaßstab von  $2 \mu\text{mol}$  komplett Phosphothiat-modifiziert und endotoxinfrei bezogen, in Aqua dest. zu einer Stammlösung von  $250 \mu\text{M}$  gelöst, steril filtriert und in Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Das zentrale immunstimulatorische Prinzip von humanstimulierenden CpG-ODNs ist ein 6-mer Motiv 5'-GTCGTT-3' (Vollmer, 2006) und stimuliert den TLR9. CpG-ODNs sind durch Phosphothioat-Modifikationen im Rückgrat (PTO – Substitution eines Sauerstoffs in nicht-bindender Stellung durch Schwefel) so verändert, dass sie eine größere Stabilität besitzen (Krieg et al., 1996; Liang and Lipsky, 2000).

#### MurNAc-L-Ala-gamma-D-Glu-meso-Dpm (Diaminopimelinsäure; kurz: DAP) – NOD1

MurNAc-L-Ala-gamma-D-Glu-meso-Dpm ist eine Komponente des Zellwandbestandteils Peptidoglykan und stimuliert den zytosolischen Rezeptor NOD1 (nucleotide oligomerization domain protein 1) (Girardin et al., 2003a; Chamaillard et al., 2003). DAP kommt vorwiegend in Peptidoglykan von *gram-negativen* Bakterien vor, ist aber auch bei einigen *gram-positiven* Bakterien gefunden worden. DAP wurde von N. Kubasch, Konstanz synthetisiert (Traub et al., 2004) und wurde freundlicherweise von C. Hermann, Konstanz, zur Verfügung gestellt. DAP wurde als Stammlösung von  $1 \text{ mg/ml}$  in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### MurNAc -L-alanyl-D-isoglutamin (Muramyldipeptid; kurz: MDP) – NOD2

MPD ist das minimale, bioaktive Motiv von Peptidoglykan, welches ein Bestandteil *gram-positiver* und *gram-negativer* Zellwände ist. In der Zelle wird MDP über den zytosolisch gelegenen Rezeptor NOD2 erkannt (Girardin et al., 2003b). MDP stammte von Bachem, Weil am Rhein und wurde freundlicherweise von C. Hermann, Konstanz, zur Verfügung gestellt. MDP wurde in Aqua dest. in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert.

### Mannan – Mannoserezeptor

Der Mannoserezeptor gehört zu der Familie der C-Typ-Lektin-Rezeptoren und erkennt glykosylierte Moleküle mit terminaler Mannose, Fucose oder N-Acetylglukosamin (Fraser et al., 1998). Darüber erkennt der Mannoserezeptor den Zellwandbestandteil Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae*. Mannan wurde von Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen, als Stammlösung von 10 mg/ml in NaCl gelöst und sofort verwendet.

### **3.1.11.2 Rekombinante Zytokine**

Rekombinantes humanes IL-1 $\beta$ , IL-4, GM-CSF, IFN- $\gamma$  wurden lyophilisiert von tebu-bio, Offenbach bestellt, als Stammlösung von 100  $\mu$ g/ml in Aqua dest. angelöst und bei -80°C gelagert. Rekombinantes TNF- $\alpha$ , ebenfalls von tebu-bio bezogen, wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml bei -80°C gelagert. Rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 1 stammt von R&D Systems, Minneapolis, USA. TGF- $\beta$ 1 wurde als Stammlösung von 50  $\mu$ g/ml angelöst und aliquotiert bei -80°C gelagert.

### **3.1.12 Wachstumsmedien**

Die Medien wurden, wenn nicht anders vermerkt, für wenige Wochen bei 4°C gelagert.

#### Inaktivierung von fetal calf serum (FCS)

Die Hitzeinaktivierung des FCS diente dazu, die im Serum enthaltenen Komplementproteine zu inaktivieren. Dazu wurde steriles FCS bei 56°C für 1 h inaktiviert und aliquotiert bei -20°C eingefroren.

#### „Collection Medium“ für primäre murine Atemwegsepithelzellen (pECs)

Als Basis wurde DMEM : Ham's F12 1:1 Mix verwendet. Vor Gebrauch wurde das Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin (P/S; aus 100x Stammlösung) supplementiert.

#### „Dissociation Medium“ für pECs

Dulbecco's PBS (1x) wurde mit 0,6% Penicillin/Streptomycin (aus 100x Stammlösung), 44 mM Natriumhydrogencarbonat, 0,25  $\mu$ M Eisen(III)nitrat und 1  $\mu$ M Natriumpyruvat komplementiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 0,1 mg/ml DNase I und 1,4 mg/ml Pronase E hinzugegeben.

### „Culture Medium“ für pECs

DMEM : Ham's F12 1:1 Mix wurde mit 1% Penicillin/Streptomycin (aus 100x Stammlösung), 5% inaktiviertem FCS und 120 IU/l Insulin (aus Stammlösung mit 4 mg/ml = 10<sup>8</sup> IU/ml) versetzt.

### Ultroser<sup>®</sup> G Medium für pECs

DMEM : Ham's F12 1:1 wurde versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin (aus 100x Stammlösung) und 2% Ultroser<sup>®</sup> G Serumersatz. Ultroser<sup>®</sup> G enthält Albumin, Transferrin, Insulin, Hormone, Vitamine und mineralische Spurenelemente bei einem fünfmal geringeren Proteingehalt als FCS.

### DMEM

DMEM wurde vor Gebrauch mit 1% Penicillin/Streptomycin (aus 100x Stammlösung) und 10% inaktiviertem FCS versetzt.

### RPMI 1640

Vor Gebrauch wurde RPMI mit 1% Penicillin/Streptomycin (aus 100x Stammlösung) und 10% inaktiviertem FCS versetzt.

### Erhaltungs- und Anzuchtplatten für Bakterien

Es wurden gebrauchsfertige Columbia-Agar-Platten mit 5% Schafsblut genutzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### LB-Medium

Bakterien wurden zur Anzucht in LB-Medium (Luria Broth) kultiviert. Dazu wurden 20 g LB-Broth-Pulver in 1 l Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min).

## **3.1.13 Zellen**

### **3.1.13.1 Prokaryote Zellen**

Als prokaryote Zellen wurden hier Bakterien verwendet, die sich durch ihren Wandaufbau in *gram-positive* und *gram-negative* Stämme einteilen lassen. Diese Bakterien wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben angezüchtet, um sie später als ganze Organismen als Stimulus einzusetzen. Folgende Bakterienstämme wurden, wenn nicht anders vermerkt, aus der Stammsammlung der Abteilung für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in Heidelberg verwendet:

#### *Gram-negativ:*

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Legionella pneumophila</i>	corby strain, K. Heuner, Würzburg

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Gram-positiv:*

*Listeria monocytogenes* Patientenisolat

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213

*Streptococcus agalactiae* ATCC 27956

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

*Streptococcus pneumoniae* Patientenisolat

*Streptococcus oralis* ATCC 35037

### 3.1.13.2 Eukaryote Zellen

Alle Zellen wurden in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Die Erhaltung der Zelllinien erfolgte durch wöchentliches Umsetzen und Expansion in 25 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup>/175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Zusätzlich wurden die Zellen regelmäßig mittels DAPI-Färbung auf Mykoplasmen-Freiheit getestet. Die Passagenzahlen der jeweiligen Zelllinien sind uns nicht bekannt. Primäre humane Atemwegsepithelzellen und die Epithelzelllinien BEAS-2B, IHAEo-, 16-HBE, MM-39 wurden freundlicherweise von PD Dr. Dr. R. Bals, Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Pneumologie, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

#### BEAS-2B

Dies ist eine humane bronchiale Epithelzelllinie. Die Zellen wuchsen adhärent und wurden in RPMI mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert. Sie wurden alle 3-4 Tage durch Trypsinierung passagiert.

#### Primäre humane/murine Atemwegsepithelzellen

Humane Atemwegsepithelzellen wurden wie bereits beschrieben (Wang et al., 1998; Platz et al., 2004) aus humanem Bronchusmaterial gewonnen. Die Isolierung primärer muriner Atemwegsepithelzellen ist unter 3.2.1.7 gesondert beschrieben.

#### IHAEo- / 16-HBE

Diese beiden humanen bronchialen Epithelzelllinie wuchsen adhärent, wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert und mittels Trypsinierung passagiert.

#### MM-39

MM-39 ist ebenfalls eine adhärent wachsende, bronchiale Epithelzelllinie, die in DMEM : Ham's F12 1:1 mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert und mittels Trypsinierung passagiert wurde.

### BMDDCs (Knochenmarks-generierte Dendritische Zellen)

Verwendet wurden Knochenmarks-generierte Dendritische Zellen der unter 3.1.14 aufgeführten Mauslinien. Die Generierung der Zellen ist gesondert unter 3.2.1.8 beschrieben.

### CD14<sup>+</sup> Zellen/Dendritische Zellen /T-Zellen

Die Isolierung humaner CD14<sup>+</sup> Zellen, Dendritischer Zellen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen ist unter 3.2.1.5 und 3.2.1.6 beschrieben. Die Kultivierung und Stimulation dieser Zellen erfolgte in RPMI mit 10% FCS und 1% P/S.

### HEK293

Dies ist eine humane Fibroblastenzelllinie, die aus embryonalen Nieren gewonnen wurde (human embryonic kidney cells; erhalten von der AG Neumaier, Institut für klinische Chemie, Mannheim). HEK Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert.

### X63-Zellen

X63-Ag8 sind Plasmacytoma-Zellen, die GM-CSF in den Überstand sezernieren. Das so hergestellte GM-CSF-haltige Medium wird für die Generierung von BMDDCs verwendet. Die Zellen wurden in RPMI mit 5% FCS und 1%P/S kultiviert und der Überstand, wie unter 3.2.1.8 beschrieben, gewonnen.

## **3.1.14 Mauslinien**

Für die verschiedenen Versuche wurden 6-12 Wochen alte C57BL/6 und Balb/c Mäuse (Charles River, Sulzfeld) verwendet, die unter SPF („specific pathogen free“)-Bedingungen gehalten wurden. Die Tiere wurden in Polykarbonkäfigen des Typs II auf staubfreiem Weichholzgranulat bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$  gehalten mit einer Belichtungszeit von 7.00 bis 19.00 MEZ. Die kontinuierliche Fütterung fand mit einer pelletierten autoklavierten Alleindiät und sterilem Leitungswasser über Tränkflaschen statt. Die Tierhaltung erfolgte hinter Infektionsbarrieren und einer monatlichen Kontrolle auf das Freisein von Erregern entsprechend der Liste GV-SOLAS 1995. Genehmigungen zur Tötung von Mäusen und Organentnahme lagen vor, die Experimente wurden ordnungsgemäß aufgezeichnet und über den Tierschutzbeauftragten dem Regierungspräsidium Tübingen gemeldet.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Kultivierung und Aufreinigung eukaryoter Zellen**

#### **3.2.1.1 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien**

In flüssigem Stickstoff können Zellen, vor allem etablierte Zelllinien, über einen langen Zeitraum und weitestgehend unter Beibehaltung ihrer Vitalität gelagert werden. Hierzu wurden  $5 \times 10^6$  Zellen mit 1

ml eiskaltem „Einfriermedium“, bestehend aus 10% DMSO (Dimethylsulfoxid), 35% FCS und 55% Zellkulturmedium gemischt und in Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden schnell auf 0°C heruntergekühlt, da DMSO bei höheren Temperaturen und ab einer Konzentration von 4% zytotoxisch wirkt. Die weitere Abkühlung erfolgt stufenweise, so dass intrazelluläres Wasser mittels Osmose austreten kann. Zunächst wurden die Zellen daher für 2 h bei -20°C und anschließend ü.N. bei -80°C gelagert, bevor sie zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Um die Zellvitalität der eingefrorenen Zellen während des Auftauvorgangs zu erhalten, ist es wichtig, einen osmotischen Schock zu vermeiden. Hierzu wurden die Zellen sehr schnell aufgetaut, langsam mit frischem Medium versetzt und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt.

### **3.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien**

Zur Kultivierung der Zellen wurden diese je nach Konfluenzgrad alle 4-5 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und für wenige Minuten bei RT mit Trypsin/EDTA (1x) behandelt bis die Zellen sich vom Boden lösten. Die Zellen wurden mit Kulturmedium abgespült und in Kulturröhrchen überführt, um das Trypsin zu inaktivieren. Nach Zentrifugation bei 1.300 rpm für 5 min (Multifuge 3 S-R) wurden die Zellen resuspendiert und 1:20 bis 1:10 in 30 ml Medium in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen passagiert und weiter kultiviert.

### **3.2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 90 µl Trypanblaulösung versetzt und in einer Neubauer Zählkammer im Mikroskop (Inversmikroskop, Axiovert 25 CFL, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) gezählt. Trypanblau besitzt die Eigenschaft, nur in avitale Zellen über deren geschädigte Membranen einzudringen. Die Anzahl avitaler Zellen sollte nicht mehr als 3% der Gesamtzellzahl betragen.

### **3.2.1.4 Isolation monozytärer Zellen (PBMCs – Peripheral Blood Mononuclear Cells)**

Es wurde bei gesunden, freiwilligen, erwachsenen Probanden in gängiger Venenpunktionstechnik mit Hilfe einer Einwegkanüle und einer Einwegspritze peripheres, venöses Blut entnommen. Zur Antikoagulation wurde das entnommene Blut mit 5000 IE Liquemin<sup>®</sup> (Heparin) versetzt und danach 1:1 in PBS verdünnt. Das Gemisch aus PBS und Blut wurde in 50 ml Röhrchen mit Ficoll-Lösung (Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml) im Verhältnis 1:2 unterschichtet und 20 Minuten bei 4°C und 485 x g ohne Bremse (= 1700 rpm in der Multifuge 3 S-R) zentrifugiert. Das hier verwendete Ficoll besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber eine geringere als die von Erythrozyten und den meisten Granulozyten. PBMCs reichern sich nach Zentrifugation in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an, während die Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren. PBMCs wurden mit einer Pipette abgenommen und mit PBS zweimal zehn Minuten bei 350 x g (1300 rpm) gewaschen.

### 3.2.1.5 Magnet assoziierte Zellsortierung (MACS)

Die immunmagnetische Zellsortierung ist eine antikörpervermittelte Zellseparation mittels an Magnetpartikel gebundener Antikörper (MACS-MicroBeads). Dabei wurden die zu isolierenden Zellen markiert, in einer Säule via Magnet angereichert und nachträglich eluiert (Positiv-Selektion). CD14 positive Zellen wurden gewonnen, indem PBMCs mit anti-humanen CD14MicroBeads markiert wurden und über das AutoMACS halbautomatisch aufgereinigt wurden. CD14<sup>+</sup> Zellen wurden für Stimulationsexperimente oder zur Generierung von humanen Dendritischen Zellen verwendet. CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels CD3MicroBeads ebenfalls durch positive Selektion isoliert. Die Aufreinigung erfolgte exakt nach Angaben des Hersteller-Protokolls.

### 3.2.1.6 Generierung humaner Dendritischer Zellen

2 x 10<sup>6</sup> CD14<sup>+</sup> Zellen wurden pro Vertiefung einer 24-well Platte ausgesät und für 6 Tage in Anwesenheit von 10 ng/ml rekombinantem humanem (rh) GM-CSF und 500 IU/ml rhIL-4 inkubiert. Die so erhaltenen unreifen Dendritischen Zellen wurden an Tag sechs für 30 min auf Eis gestellt und durch intensives Waschen geerntet. Die DCs wurden anschließend auf die Expression der Oberflächenmarker CD1a und CD14 im FACS untersucht, wobei unreife DCs CD14 negativ und CD1a positiv waren.

### 3.2.1.7 Kultivierung muriner trachealer Epithelzellen

Die Isolation und Kultivierung muriner trachealer Epithelzellen wurde modifiziert nach [Davidson, 2000 #179] durchgeführt.

#### Vorbereitung der Transwelleinsätze

Einen Tag vor der Zellisolation wurden Transwelleinsätze (Durchmesser: 6,5 mm) mit humanem rekombinantem Plazenta-Kollagen Typ VI beschichtet. Dazu wurde das Plazenta-Kollagen in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Aqua dest. mit 0,2% Eisessig gelöst, 100 µl in die Transwelleinsätze gegeben und über Nacht unter der Sterilbank bei RT inkubiert. Kurz vor Gebrauch wurden die Einsätze zweimal mit 200 µl PBS gewaschen.

#### Isolation und Anzucht muriner trachealer Epithelzellen

Die unter 3.1.14 angegebenen Mauslinien wurden verwendet, um primäre tracheale Epithelzellen zu isolieren. Die Tiere wurden durch mehrminütige CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getötet. Nach Sprühdesinfektion mit 70% Ethanol wurde das Fell mit chirurgischen Instrumenten, welche 10 min in H<sub>2</sub>O ausgekocht worden waren, geöffnet, die Thyroidea wurde stumpf entfernt und die Faszien über der Trachea beseitigt. Der Thorax wurde eröffnet, die Trachea vom Ösophagus abgehoben, zwischen dem Larynx und der Bifurcatio tracheae entnommen und der Länge nach aufgeschnitten. Anhaftende Gewebestücke wurden entfernt. Die Trachea wurde kurz in PBS gewaschen und in 20 ml „Collection Medium“ überführt. 8 Tracheen wurden in ein 50 ml Kulturröhrchen mit 20 ml „Dissociation Medium“ überführt und bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> für 1 h inkubiert, wobei die Epithelzellen vom trachealen Skelett abgelöst werden. Nach zwölfmaligem Schwenken des Röhrchens, um die restlichen

Epithelzellen zu lösen, wurden die Tracheen in ein weiteres 50 ml Kulturröhrchen mit 10 ml Culture Medium überführt und erneut zwölf Mal vorsichtig gewendet. Nach dem Entfernen der trachealen Skelette, wurden beide Suspensionen vereint und zentrifugiert (1000 rpm für 10 min in Multifuge 3 S-R). Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Culture Medium aufgenommen, in eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 92 mm gegeben und für 2 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Damit sollten adhärenente Zellen, wie Makrophagen, ausselektioniert werden. Der Überstand mit nicht-adhärenenten Zellen wurde vorsichtig mit einer Einmal-Pasteurpipette abgenommen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 800 µl Culture Medium (200 µl pro 2 Tracheae) aufgenommen und 200 µl der Suspension wurden in einen vorbereiteten Transwelleinsatz gegeben (2 Tracheen/well). In das untere Kompartiment der 24-well Platte, in der sich die Transwelleinsätze befinden, wurden 600 µl Culture Medium gegeben. Zwischen dem 4. und 8. Tag wurde, je nach Konfluenz der Zellen, das Medium im Transwelleinsatz und der Kavität entfernt. In das untere Kompartiment wurde 600 µl Ultrosor<sup>®</sup> G Medium gegeben, während das obere Kompartiment ohne Medium blieb, um ein „Air-Liquid-Interface“ herzustellen. Danach wurde alle 3-4 Tage das Medium im unteren Kompartiment gewechselt. Ab dem 30. Tag wurden Epithel-Experimente durchgeführt. Die pECs waren maximal 80 Tage nutzbar.

### **3.2.1.8 Generierung Dendritischer Zellen aus Knochenmark**

#### Herstellung GM-CSF-haltigen Mediums

X63-Zellen sind Plasmacytoma-Zellen der Linie X63-Ag8, die mit dem Gen für murines GM-CSF transfiziert wurden und murines GM-CSF in den Überstand sezernieren (Überlassung von Manfred B. Lutz, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg) (Zal et al., 1994). Zellfreier Überstand wurde nach 10 tägiger Kultivierung in RPMI-Medium/5% abgenommen und steril filtriert (0,2 µm Porengröße). Der Kulturüberstand wurde bei -20°C gelagert. Zur Generation von BMDDCs, wurde Kulturüberstand im Verhältnis von 5–20% (v/v) zugesetzt und die so gewonnenen BMDDCs per FACS-Analyse auf CD11c-Expression untersucht (chargenspezifische Austestung). Die hier verwendeten Chargen ergaben optimale Ergebnisse bei 7,5% (v/v) Zusatz.

#### Murine Knochenmarks-generierte dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cells - BMDDC)

Zur Gewinnung von Knochenmark, aus dem Dendritische Zellen (BMDDCs) generiert wurden, wurden Mäuse durch Genickbruch getötet, die Ober- und Unterschenkelknochen von C57BL/6- oder Balb/c-Mäuse frei präpariert und die proximalen und distalen Enden eröffnet. Die Knochen wurden jeweils mit 2,5 ml eiskaltem RPMI-Medium mit 10% FCS mittels einer 10 ml Spritze mit 27G-Kanüle durchspült und so das Knochenmark in einem 50 ml Kulturröhrchen gewonnen. Nach Zentrifugation des Knochenmarks für 5 min bei 1200 rpm und 4°C (Multifuge 3 S-R) wurde das Zellpellet in 15 ml RPMI mit 10% FCS und 0,5% β-Mercaptoethanol, supplementiert mit 7,5% (v/v) Kulturüberstand der X63-Zellen versetzt und in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 h wurden die nicht-

adhärenten Zellen geerntet, gewaschen und davon  $10^7$  Zellen mit 7,5% (v/v) Kulturüberstand der X63-Zellen versetzt und erneut in  $175\text{ cm}^2$ -Zellkulturflaschen ausgesät. Nach weiteren vier Tagen wurden nochmals 25 ml RPMI/10% FCS/0,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol mit 7,5% (v/v) Kulturüberstand der X63-Zellen zugesetzt. Am Tag neun wurden dann die nicht-adhären Zellen geerntet und für die Stimulation weiter verarbeitet. Zu diesem Zeitpunkt waren die BMDDCs in der FACS-Analyse zu etwa 90-95% CD11c positiv (spezifischer Marker für DCs) und maximal 2% B220/CD11c doppelt positiv (Marker für plasmazytoide DCs) und befanden sich im Stadium unreifer myeloider DCs.

### 3.2.2 Kultivierung prokaryoter Zellen

#### 3.2.2.1 Anzucht von Bakterien/Zellzahlbestimmung

Bakterien wurden auf Columbia-Agar mit 5% Schafsblut bei  $37^\circ\text{C}$  ohne  $\text{CO}_2$  im Brutschrank ausplattiert und danach bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Um die Bakterien für Experimente in ausreichender Menge nutzen zu können, wurden etwa 4 Kolonien der jeweiligen Bakterienstämme in 100 ml LB-Bouillon über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler (225 rpm) inkubiert. Die Kulturen wurden bei 4500 rpm (Multifuge 3 S-R) und  $4^\circ\text{C}$  für 20 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Bakterienpellet in 10 ml PBS aufgenommen. Die Keimzahl wurde mittels photometrischer Absorption bei 600 nm nach McFarland ( $1\text{ McF} = 3 \times 10^8$  Keime/ml (Murray et al., 2003)) bestimmt. Die Bakterienkonzentration wurde auf  $1 \times 10^{10}$  Keime/ml eingestellt.

#### 3.2.2.2 Inaktivierung von Keimen

##### UV-Inaktivierung

Bakterien wurden in einer Konzentration von  $10^{10}$  Keime/ml und Aliquots zu 200  $\mu\text{l}$  für eine Stunde auf Eis mit 9999  $\mu\text{J}$  in der UV-Kammer inaktiviert. Um die Inaktivierung zu überprüfen, wurden aus den Aliquots 3-Ösen-Ausstriche auf Columbia-Agar mit 5% Schafsblut angefertigt und diese über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die inaktivierte Bakteriensuspension wurde dann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

##### Hitze-Inaktivierung

$10^{10}$  Bakterien/ml wurden in 500  $\mu\text{l}$  Aliquots für 20 min (*Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) oder 40 min (*Staphylococcus aureus*) bei  $70^\circ\text{C}$  unter Schütteln im Heizblock inaktiviert. Die Inaktivierungskontrolle und Lagerung erfolgte wie nach der UV-Inaktivierung.

### 3.2.3 Zellstimulation

#### 3.2.3.1 Stimulation humaner Epithelzelllinien

$2.5 \times 10^4$  Zellen/well wurden einen Tag vor Stimulation in einer 96-well Platte ausgebracht. Die Stimulation der Zellen erfolgte am Folgetag je nach Versuch für 18 – 24 h. Zellfreier Überstand wurde abgenommen und bis zum Zytokinnachweis mittels ELISA für max. 2 Wochen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für die RNA Isolation wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro 24-well ausgebracht und für die angegebene Zeit stimuliert.

### **3.2.3.2 Koinkubation/Stimulation Knochenmarks-generierter Dendritischen Zellen**

Murine Dendritische Zellen (BMDDCs) wurden wie unter 3.2.1.8 beschrieben generiert und am Tag 9 in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/well in einer 96-well Platte ausgesät. Die Zellen wurden entsprechend den Angaben des jeweiligen Versuches in Anwesenheit des unter 3.2.4.1 generierten epithelialen Überstandes mit 100 ng/ml LPS stimuliert und die Expression der Oberflächenmarker nach 14 h im FACS analysiert. Zusätzlich wurde die Zytokinfreisetzung der BMDDCs mittels ELISA nachgewiesen.

## **3.2.4 Gewinnung von Zellüberständen**

### **3.2.4.1 Überstand von murinen trachealen Epithelzellen**

In das Transwell der Air-Liquid-Interface Kulturen wurden 200  $\mu$ l und in das untere Kompartiment 600  $\mu$ l Culture Medium gegeben. Nach 24 h wurde das Medium in beiden Kompartimenten ausgetauscht und nach weiteren 24 h der Überstand aus dem Transwelleinsatz entnommen, abzentrifugiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Es wurden Überstände aus verschiedenen primären Epithelzellkulturen gemischt.

### **3.2.4.2 Überstand von humanen Zellen**

$2.5 \times 10^4$  Epithelzellen wurden in die Kavität einer 96-well Platte ausgesät. Nach 48-50 h wurde der Überstand abgenommen, bei 1300 rpm für 5 min abzentrifugiert und in Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Überstand von HEK-293 Zellen und PBMCs wurde durch Ausbringen von  $6 \times 10^4$  bzw.  $10^5$  Zellen pro well hergestellt.

### **3.2.4.3 Hitzebehandlung von humanem Zellüberstand**

Die Überstände wurden gegebenenfalls für 30 min bei  $100^\circ\text{C}$  unter Schütteln im Heizblock gekocht.

## **3.2.5 Immunhistochemie**

Primäre murine Epithelzellen wurden immunhistologisch auf die Expression epithelzell-spezifischer „Marker“ überprüft. Die Transwelleinsätze wurden einmal mit PBS gewaschen und die Zellen für 10 min bei  $-20^\circ\text{C}$  mit 90% Methanol fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min mit PBS/10% FCS geblockt, um unspezifische Bindungen der später eingesetzten Antikörper zu verhindern. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Erstantikörper in PBS/1,5% FCS in den Transwelleinsatz pipettiert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Dabei wurden folgende Antikörperkonzentrationen verwendet: anti-Pan-Zytokeratin 5  $\mu\text{g/ml}$ , anti-Zona-occludens-1 5  $\mu\text{g/ml}$ , anti-Smooth-muscle-actin 5  $\mu\text{g/ml}$ , anti-Vimentin 2  $\mu\text{g/ml}$  und anti-E-Cadherin 2,5  $\mu\text{g/ml}$ . Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Zweitantikörper (Anti-Maus IgG FITC 5  $\mu\text{g/ml}$ , Goat-anti-rabbit IgG Texas Red<sup>®</sup> 3,75  $\mu\text{g/ml}$ ) 45 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min eine DAPI-Färbung (3  $\mu\text{M}$  DAPI in EtOH) durchgeführt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Membran der Transwelleinsätze mit einem Einmalskalpell entfernt und auf einen Objektträger mit einem Tropfen

Mounting Medium (AF1) eingedeckelt und gegen Ausbleichen geschützt. Die Auswertung erfolgte mit dem Leica DMI 6000B Fluoreszenz-Inversmikroskop mit einem 63x bzw. 40x Objektiv und der Leica Application Suite Advanced Fluorescence 1.6.1 Software. Es wurden die Filterblöcke A4 für DAPI (Exzitationsfilter 360/40; Dichromatischer Spiegel 400; Suppressionsfilter 470/40), YFP für FITC (500/20; 515; 535/30) und DSRed für TexasRed (580/20; 595; 630/55) genutzt. Als Anregungsquelle diente eine 100 W Quecksilber-Lampe.

### 3.2.6 Transepithelialer Widerstand

Epithelzellen bilden Barrieren zwischen unterschiedlichen funktionellen Räumen des Körpers und sind durch die Ausbildung von dichten Zellverbänden mit „tight junctions“ charakterisiert. Die Ausbildung solcher „tight junctions“ lässt sich biophysikalisch durch Messung des transepithelialen Widerstandes mit dem Ohm-Meter Millicell<sup>®</sup>-ERS (Millipore Corporation, Billerica, USA) nachweisen. Die kürzere Elektrode wird in den Transwelleinsatz gegeben, während die längere sich im unteren Kompartiment befindet. Die Elektrode wurde für 24 h in dem jeweiligen Medium equilibriert und anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach erfolgter Desinfektion, wurde die Elektrode für erneute 15 min equilibriert. Als Kontrolle wurden nur mit Plazenta-Kollagen behandelte Transwelleinsätze ohne Zellen gemessen. Die Messungen erfolgten entsprechend dem angegebenen Standardprotokoll und wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Reifung der Epithelzellen in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Messdaten wurden wie folgt auf flächenbereinigte Widerstandswerte normalisiert:

$$R_{\text{Probe}} - R_{\text{Leer}} = R_{\text{Zellrasen}} \quad \text{und} \quad R_{\text{Zellrasen}} \times \text{Fläche}_{\text{Transwell}} = \text{Widerstand} \times \text{cm}^2 [\Omega \times \text{cm}^2].$$

### 3.2.7 Zytokinnachweis mittels ELISA

Zum quantitativen Nachweis von Zytokinen wurde ein Sandwich-ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) verwendet, bei dem zwei Antikörper, die an unterschiedlichen Epitopen des Proteins spezifisch binden, eingesetzt werden. Der Erstantikörper ist an der Festphase gebunden und dient dazu, das Antigen zu binden („capture“). Der zweite Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, dient dem Proteinnachweis („detection“). Die Zugabe eines Testsubstrats führt zu einem farbigen, messbaren Produkt. Für die Zytokinbestimmung wurden zellfreie Überstände benutzt, die bis zur Analyse für wenige Tage bei -20°C gelagert wurden. Die Durchführung der Analysen erfolgte exakt nach den Angaben des Herstellers. Als Substrat wurde BD OPTEDIA<sup>™</sup> TMB Substrate Reagent Set verwendet. Es wurden Doppelbestimmungen der in PBS/10%FCS verdünnten Proben durchgeführt und die Auswertung wurde mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 490 nm (Messfilter) gegen 630 nm (Referenzfilter) durchgeführt. Unter Verwendung einer Standardreihe mit rekombinanten Zytokinen wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Auswerteprogramms „Magellan V 5.0“ (Tecan, Salzburg, Österreich) berechnet. Die Standardbestimmung wurde nach der Vier-Parameter-Methode durchgeführt.

### 3.2.8 MTT Test

Stimulierte Zellen wurden nach Abnahme der Überstände für die Zytokinbestimmung auf den Umsatz von MTT untersucht, um die Vitalität der Zellen zu überprüfen. Das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen durch die enzymatischen Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem dunkelblauen wasserunlöslichen Formazanderivat reduziert. 20 µl MTT-Lösung (2,5 mg/ml MTT/PBS) und 20 µl Medium/5% FCS wurden zum verbliebenen Restvolumen auf die Zellen dazugegeben. Nach 4 h Inkubation wurden die Farbniederschläge mit 150 µl Isopropanol/4% HCl gelöst und die Absorption im Photometer bei 550 nm gegen 630 nm Referenzwellenlänge gemessen.

### 3.2.9 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln wie z.B. Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Dafür besteht das Durchflusszytometer aus elektronischen, mechanischen und optischen Komponenten: das Flusssystem, das optische System und das Detektionssystem, womit eine multiparametrische Messung und Analyse bezüglich der Fluoreszenzmarkierung, Größe und Granularität jeder Zelle ermöglicht wird. Die Zellsuspension wird zunächst mittels Druck in die Messkanüle gedrückt und durch eine trichterartige Verengung beschleunigt, wodurch sich die Zellen in einem feinen Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander anordnen (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen werden einzeln von einem oder mehreren Lasern erfasst und angeregt. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts, wobei die Vorwärts-Lichtstreuung (FSC, „forward scatter“) mit der Größe der Zellen korreliert und die seitliche Lichtstreuung (SSC, „sideward scatter“) der Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis der Zellen entspricht. Als weiterer Parameter kann die Fluoreszenz bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen mit den angegebenen Fluorophor-markierten Antikörpern gefärbt. Der Laserstrahl regt die jeweiligen Fluorochrome an, die daraufhin Licht charakteristischer Wellenlänge emittieren. Im BD FACS Canto System stehen hierfür zwei Laser (Helium-Neon Laser 633 nm und Coherent Sapphire Laser 488 nm) und sechs Kanäle (FL1-FL6) zur Verfügung. Dieses emittierte Licht wird mit dem „detector array“ erfasst und in seine spektralen Komponenten zerlegt. Zuerst wird das Licht, mit der längsten Wellenlänge erfasst (üblicherweise PE-Cy7) und am Schluss das Licht, mit der kürzesten Wellenlänge (FITC). Mit nachgeschalteten elektronischen Komponenten wird das Signal verstärkt und in ein digitales Messsignal umgewandelt. Die Datendarstellung und -auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm „FACS Diva V 4.1.2“ und WinMDI 2.9.

#### 3.2.9.1 Färbung von zellulären Oberflächenmarkern

Mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper wurde die Regulation von Oberflächenmolekülen auf den verschiedenen Zellen untersucht. Dazu wurden Zellen in eine 24-well Platte ausgesät und wie angegeben stimuliert. CD14<sup>+</sup> Monozyten und DCs wurden für 30 min auf Eis gestellt und durch

intensives Waschen geerntet. BEAS-2B Zellen wurden mit 300 µl enzymfreiem „cell dissociation buffer“ geerntet. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden die Zellen in PBS/2% FCS (1300 rpm, 5 min und 4°C) gewaschen und das Volumen auf 100 µl eingestellt. Zellen wurden dann für 15 min auf Eis mit den angegebenen Antikörpern inkubiert, dreimal gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. Zuerst wurden die Zellen auf Grund ihrer Größe und Granularität im FSC und SSC identifiziert. Es wurden von diesen so identifizierten Zellen 20.000 gemessen („Live gating“). Ungefärbte Zellen und Isotypkontrollen wurden verwendet, um die „Gates“ für das jeweilige Fluorochrom festzulegen.

### 3.2.9.2 Annexin-V-FLUOS Färbung

Im Frühstadium der Apoptose wird Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an die Außenseite transloziert. Das FITC-markierte Protein Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin und detektiert somit apoptotische Zellen (Vermees et al., 1995). Propidiumiodid (PI) interkaliert mit doppelsträngiger DNA. PI kann nur durch die Plasmamembran toter Zellen eindringen und lässt sich mit einer Wellenlänge von 490 nm anregen. Das Emissionsmaximum liegt bei 635 nm, sodass angefärbte Zellen im PE-Kanal des FACS detektiert werden können. Frühapoptotische Zellen sind Annexin V positiv, während nekrotische und spätapoptotische Zellen sowohl Annexin V als auch PI positiv sind. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 3.2.9.3 Phagozytose Assay

Professionelle Immunzellen, wie CD14<sup>+</sup> Monozyten, neutrophile Granulozyten oder DCs sind in der Lage, Antigene zu phagozytieren und zu präsentieren. Dies kann genutzt werden, um funktionelle Veränderungen dieser Zellen zu untersuchen. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup> Zellen in die Vertiefungen einer 24-well Platte ausgesät und mit 50% Epithelzell-Überstand und 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen geerntet und mit 1 µl FITC-markierten Latex-Kügelchen (1,0 µm) inkubiert. Die eine Hälfte der Zellen wurde 45 min bei 37°C mit den Mikropartikeln inkubiert, die andere Hälfte bei 4°C. Bei 4°C kommen energieverbrauchende Prozesse zum Erliegen, daher findet bei 4°C keine Phagozytose statt. Die Phagozytoseaktivität bei 4°C diente als Kontrolle. Nach Inkubation mit den Latex-Kügelchen wurden die Zellen im Durchflusszytometer bezüglich der FITC-Expression (dies zeigt die Aufnahme der Latex-Kügelchen mittels Phagozytose an) analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt wurde. Anschließend wurde die Differenz zwischen MFI<sub>37°C</sub> und MFI<sub>4°C</sub> ( $\Delta$ MFI) gebildet.  $\Delta$ MFI wurde dann auf die unstimulierte Kontrolle ohne Überstand normiert, die als 1 gesetzt wurde.

### 3.2.9.4 CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) Färbung

Der membrangängige Farbstoff CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) bindet an freie Amine zytoplasmatischer Proteine und wird in der Zelle von Esterasen in CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) umgewandelt, welches kaum noch membrangängig ist und

somit in der Zelle verbleibt. Die CFSE-Färbung kann zur Analyse proliferierender Zellen genutzt werden, da der Farbstoff bei der Zellteilung zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wird und so die Fluoreszenz um 50% reduziert wird. Die CFSE-gefärbten Zellen können im Durchflusszytometer im FITC-Kanal detektiert werden. Zur Färbung wurden  $4 \times 10^5$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit 1  $\mu$ M CFSE (Stocklösung: 10 mM in DMSO) versetzt und die Lösung stark gemischt. Die Zellen wurden dann für exakt 10 min im Dunkeln inkubiert, anschließend dreimal mit großem Volumen (40 ml Medium) gewaschen und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen gezählt und in einer gemischten Leukozyten Kultur (MLR: „mixed leukocyte reaction“, siehe 3.2.18) mit DCs von einem MHC-disparaten Spender koinkubiert. Durch den Besatz der DCs mit für die T-Zellen allogenen MHC Molekülen werden die T-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. T-Zellen wurden in einer 96-well Platte ( $2 \times 10^5$  Zellen/well) in Duplikaten ausplattiert und die Dendritischen Zellen im Verhältnis 1:10 ( $2 \times 10^4$ ) hinzugegeben. Nach 96 h wurden die zwei gleichartig behandelten wells gemischt und die Proliferation der T-Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

### 3.2.10 RNA-Aufreinigung

Für die RNA-Isolierung wurde das High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim) verwendet, welches einen DNase I Verdau beinhaltet. Die Aufreinigung erfolgte hierbei über die Absorption von Nukleinsäuren an eine Glasfaser/Silika Oberfläche in Anwesenheit eines chaotropen Salzes. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen. Die aufgereinigte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.11 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt, wobei 1  $\mu$ g Gesamt-RNA in die Synthesereaktion eingesetzt wurde. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers unter Verwendung von Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern, wodurch ausschließlich mRNA mit einer 3'-polyA-Sequenz in cDNA umgeschrieben wird. Die erhaltene cDNA wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.12 “Real time”-RT-PCR

Das Prinzip der Polymerase chain reaction (PCR - Polymerase-Ketten-Reaktion) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes mittels zweier Oligonukleotid-Primer, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die quantitative „real time“-PCR (qPCR) kann zur Genexpressionsanalyse und DNA-Quantifizierung genutzt werden, wobei hier der Reaktion der DNA-interkalierende Cyanidfluoreszenzfarbstoff SYBR-Green® zugesetzt wird, der durch Interkalieren mit doppelsträngiger DNA und Anregung mit Licht von 488 nm ein Fluoreszenzsignal emittiert. Dieses Signal ist proportional zu der entstehenden Menge an Amplifikat. Das PCR-Gerät misst nach jedem PCR Zyklus das emittierte Spektrum. Damit wird es möglich, die Analysen nicht als Endpunkt-Messung durchzuführen, sondern den Verlauf der PCR in Echtzeit (real-time) zu verfolgen. Als Maß für die Amplifikatmenge wird dann der Zyklus bestimmt, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals

einen Schwellenwert  $C_t$  (threshold cycle) überschreitet und detektierbar wird. Als template wurde die unter 3.2.11 beschriebene cDNA verwendet. Die PCR wurde mit einem quantitativen „Fertig-PCR-Mix“ nach den Angaben des Herstellers (Absolute SYBR Green Rox Mix, Abgene, Epson, UK - 2.5  $\mu$ l cDNA, 12.5 pmol forward/reverse-Primer, 12.5  $\mu$ l Absolute SYBR Green Rox Mix mit 3 mM  $MgCl_2$  Endkonz., ad 25  $\mu$ l  $H_2O$ ) auf dem 7900 HT Fast Real-Time PCR System (AB Applied Biosystems, Darmstadt) mit einem 96-Proben Block durchgeführt (95°C 15 min; 40x [95°C, 15 sec; 60°C, 1 min]). Die Spezifität der qPCR wurde mittels „no RT-“, „no template“-Kontrollen und automatisierter Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der relativen  $\Delta\Delta C_t$  Methode. Hierbei wird die Zielsequenz relativ zu einer endogenen Referenz bestimmt und dann über eine Kontrollprobe normalisiert. Als endogene Referenz dient eine nicht-regulierte Amplifikationskontrolle ( $\beta$ -Aktin), welche Schwankungen in der Gesamt-RNA kompensieren soll. Die Normalisierung erfolgte durch Differenzbildung der Schwellenwerte und ergibt  $\Delta C_t$  ( $= C_{t(\text{Zielgen})} - C_{t(\text{„housekeeping“-Gen})}$ ). Dann können die  $\Delta C_t$  Werte von stimulierten Proben durch erneute Differenzbildung zu einer unstimulierten Probe gebildet werden ( $\Delta\Delta C_t$  oder x-fache Induktion). Alternativ wurden die Daten als relative Expression des Zielgens zum „housekeeping“-Gen  $\beta$ -Aktin [ $rE = 1/(2^{\Delta C_t})$ ] angegeben. Dies erfordert eine identische PCR-Effizienz, die durch Verdünnungsreihen von bestehenden Proben nachgewiesen worden war.

### 3.2.13 Klonierung von humanem CD36

Humanes CD36 wurde aus cDNA von humanen CD14<sup>+</sup> Zellen mit einem pcDNA<sup>TM</sup>3.1 Directional TOPO® Expressions Kit in einen pcDNA3.1<sup>TM</sup>D/V5-His-TOPO® Vektor nach Angaben des Herstellers kloniert. Dabei wurde ein 4 bp Überhang (CACC) 3' an den forward (fw) primer angehängt. Der Überhang im Vektor (GTGG) bindet den so entstandenen Überhang des PCR Produktes und stabilisiert somit das PCR Produkt in der korrekten Orientierung.

Für die Amplifikation wurden folgende Primer verwendet:

fw 5'-3': CAC CAT GGG CTG TGA CCG GAA C

rv 5'-3': TTT TAT TGT TTT CGA TCT GCA TGC

Die PCR-Reaktion erfolgte im 50  $\mu$ l Ansatz: 5  $\mu$ l 10 x-Puffer für AccuTaq LA DNA Polymerase, 300  $\mu$ M dNTP Mix (10 mM each), 200 ng template DNA, 2% DMSO, 400 nM fw/rv primer, 0,05 units/ $\mu$ l AccuTaq LA DNA Polymerase Mix, ad 50  $\mu$ l Aqua dest.

Die Reaktionsbedingungen waren:

1x [98°C, 30 sec]; 5x [94°C, 15 sec; 62°C, 30 sec; 68°C, 7 min]; 10x [94°C, 15 sec; 60°C, 30 sec; 68°C, 7 min]; 15x [94°C, 15 sec; 58°C, 30 sec; 68°C, 7 min]; 1x [68°C, 10 min].

Die Sequenz von CD36 wurde mittels kommerzieller, automatisierter Kapillar-Sequenzierung verifiziert und die Expression mit FACS und Western Blot Analyse kontrolliert.

### 3.2.14 Plasmidpräparation

#### 3.2.14.1 Transformation von Bakterienzellen

Rekombinante Plasmide können in Bakterienzellen vermehrt werden. Dazu wurde das TOP10 One Shot™ Kit (Genotyp F- *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1* *araD139*  $\Delta(araleu)7697$  *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*) benutzt. Die Bakterien wurden nach Angaben des Herstellers mit Plasmiden transformiert und auf LB (Luria Broth)/Ampicillinplatten (100  $\mu\text{g/ml}$ ) über Nacht bei 37°C selektioniert.

#### 3.2.14.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Transformierte Bakterien wurden in LB-Bouillon in Anwesenheit von Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) angezchtet. Plasmide wurde mittels kommerzieller Aufreinigungskits isoliert. Diese basieren auf alkalischer Lyse, Abtrennung genomischer DNA mittels Zentrifugation oder Filtration, Säuberung über Bindung der Plasmide an Silica-Matrizes unter hohen Salzkonzentrationen, Elution und Fällung. Für Plasmidpräparationen in großem Maßstab wurden das High Speed Midi Kit oder High Speed Maxi Kit benutzt. Die Plasmidpräparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Isolation wurden die Plasmide auf Reinheit (260nm/280nm Absorption) und Konzentration im Photometer vermessen. Nukleinsäure lässt sich bei 260 nm in einer Lösung spezifisch nachweisen. Proteinkontaminationen hingegen detektiert man durch die Absorption bei 280 nm. Bei Kontaminationen der DNA-Präparation durch Proteine ist das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis kleiner als 1,8. Bei reinen Präparationen liegt das Verhältnis bei 2,0.

### 3.2.15 BCA Proteinbestimmung

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay kombiniert BCA als Detektionssystem mit dem Biuret Assay, bei dem gelöstes Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu einen rotvioletten Farbkomplex bilden. Dabei werden zwei Peptidbindungen (CO-NH) mit  $\text{Cu}^{2+}$  komplexiert. Der BCA-Assay beruht wie der Lowry-Assay auf einer Reduzierung von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , wobei hierbei BCA mit  $\text{Cu}^+$  einen Farbkomplex bildet. Zu 20  $\mu\text{l}$  Probe wurden 180  $\mu\text{l}$  frisch angesetzte BCA/Kupfersulfatlösung gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der kolorimetrische Nachweis von Proteinen erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 550 nm. Unter Verwendung einer Standardreihe mit BSA (Bovines Serum Albumin) wurde die Konzentrationen mit Hilfe des Auswerteprogramms Magellan V 5.0 (Tecan, Salzburg, Österreich) berechnet. Die Standardbestimmung wurde nach der Vier-Parameter-Methode durchgeführt.

### 3.2.16 Western Blot

Die dazu verwendeten Puffer sind unter 3.1.5.4 beschrieben.

#### 3.2.16.1 Proteinlysate-Herstellung

$3.5 \times 10^5$  Zellen wurden in zwei Vertiefungen einer 6-well Platte in Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Lipofectamine™ 2000 mit je 4 µg des unter 3.2.13 beschriebenen CD36 Expressionsplasmids bzw. eines Leervektors nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 300 µl supplementiertem RIPA-Lysepuffer für 30 min auf Eis lysiert wurden. Das Lysat wurde in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Proteinassay mittels eines BSA Standards quantifiziert. Die Proben wurden auf die gleiche Konzentration eingestellt und 10 µg pro Tasche im SDS-Gel aufgetragen.

#### 3.2.16.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis) werden die aufgetragenen Proteine ihrem molekularen Gewicht nach in einem Gel aufgetrennt. Den Proben wurde erst ein SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:4 beigemischt und sie wurden dann für 10 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert, um ihre Tertiärstruktur aufzulösen. Das SDS (Natriumdodecylsulfat) im Probenpuffer sorgt dafür, dass die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht negativ geladen werden, so dass eine Auftrennung im elektrischen Feld möglich ist. Anschließend wurden 25 µl auf das Gel aufgetragen, wobei parallel ein Protein-Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt wurde. Die Auftrennung erfolgte mit einem 12%igen Polyacrylamidgel nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese erfolgte bei 140 V in einem vertikalen Gel-Elektrophorese-System.

#### 3.2.16.3 Western Blot

Die Proteine aus dem SDS-Gel wurden beim Western Blot in einem Nassblotverfahren auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran überführt, die zuerst kurz in Methanol, dann in SDS-Blotpuffer geschwenkt wurde. Die Protein Übertragung erfolgte bei 200 mA für 1 h.

#### 3.2.16.4 Immunfärbung

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran für 1 h in Blockpuffer inkubiert. Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Bindung des Erstantikörpers (Tetra-His Antikörper 1:1000 in 8 ml Blockpuffer verdünnt) erfolgte bei 4°C auf einem Orbitalschüttler. Nach dreimaligem Waschen für 5 min wurde der Zweitantikörper (goat anti-mouse IgG HRP 1:1000 in 8 ml Blockpuffer verdünnt) bei RT für 1 h inkubiert. Nach drei erneuten Waschschritten erfolgte der Nachweis mittels Chemilumineszenz mit ECL-Reagenz nach Angaben des Herstellers. Chemilumineszenz wurde mit einer gekühlten CCD-Kamera detektiert und mit der Chemi-Capt Software (Vilber Lourmat

Deutschland GmbH, Eberhardzell) digital dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Bio-1D Software (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell).

### **3.2.17 Transfektionsexperimente**

#### **3.2.17.1 Transiente Transfektion eukaryoter Zelllinien**

Zur Analyse der Funktion von TLR2 und CD36 in humanen Atemwegsepithelzellen wurden diese mit den unter 3.1.7 beschriebenen Expressionsplasmiden und mit Hilfe eines kationischen Lipids (Lipofectamine 2000) transient transfiziert. Für Zytokinnachweis und Reporteragen-Analysen wurden  $2.5 \times 10^4$  Zellen in einer 96-well-Platte in antibiotikafreiem Medium (RPMI/10%FCS) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0.2 µg Plasmid nach den Angaben des Herstellers transfiziert und nach 6 h das Medium gewechselt. Für FACS-Analysen wurden  $3.5 \times 10^5$  Zellen in je zwei Vertiefungen einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag mit 4 µg Expressionsplasmid transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen stimuliert und Reporteragen-Analysen, FACS-Messungen oder Zytokinnachweis mittels ELISA durchgeführt. Für den Proteinnachweis mittels Western Blot siehe 3.2.16.1.

#### **3.2.17.2 Reporteragen-Analyse**

Die Aktivierung von Zellen, die mit CD36 und TLR2 transfiziert wurde, kann mit Hilfe eines Reporteragen-Assays untersucht werden. Dazu wurden Zellen transient im 24-well Format mit 0,4 µg TLR2, CD36 oder Leervektor und zusätzlich mit 0,4 µg eines p6NF-κB-Luc Reporterplasmids transfiziert. In dem NF-κB-Luziferase-Reporterplasmid ist das Luziferase-Gen unter der Kontrolle von sechs NF-κB-abhängigen Elementen. Wird nach Transfektion und Stimulation NF-κB aktiviert, so bildet die Zelle das Protein Luziferase. Luziferaseaktivität kann durch Umsatz eines chemilumineszenten Substrates in einem Luminometer gemessen und quantifiziert werden. 18 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit verschiedenen TLR-Liganden und IL-1β stimuliert. Die Aktivität des Reporteragens Luziferase wurde mittels des LucLite Assay Systems nach Angaben des Herstellers in Triplikaten bestimmt. Dabei wird ein initiales Luziferase Signal mit extrem kurzer Halbwertszeit (flash-type) so verändert, dass ein länger messbares Signal mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden entsteht (glow-type). Dieses erlaubt die Messung in einem Plattenluminometer. Die stimulierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit PBS und Lyse-Substrat (1:1) versetzt und dann in eine 96-well Lumineszenzplatte überführt und gemessen.

### **3.2.18 Gemischte Leukozyten Kultur**

Bei einer gemischten Leukozyten Kultur (MLR; „mixed leukocyte reaction“) werden DCs aus einem Spender mit T-Zellen aus einem MHC-disparaten anderen Spender koinkubiert. Durch den Besatz der DCs mit für die T-Zellen allogenen MHC Molekülen werden die T-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. CD3<sup>+</sup>-aufgereinigte T-Zellen wurden in eine 96-well Platte ( $1-2 \times 10^5$  Zellen/well) ausplattiert. Dendritische Zellen wurden im Verhältnis 1:10 ( $1-2 \times 10^4$ ) mit den T-Zellen

des allogenen Spenders inkubiert. Proliferation wurde nach 96 h mit Hilfe des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin während der Replikation der T-Zellen radiometrisch ermittelt. Nach 96-stündiger Koinkubation wurden die Zellen mit 22,5 kBq  $^3\text{H}$ -Thymidin (Amersham, 185 GBq/mmol) gepulst. Nach weiteren 18 h wurden die markierten Zellen auf einen Filter abgesaut (Filtermate Harvester, PerkinElmer, Wellesley, USA). Dabei wird die DNA der Zellen (mit eingebautem  $^3\text{H}$ -Thymidin) auf dem Filter immobilisiert. Überschüssiges, nicht eingebautes  $^3\text{H}$ -Thymidin wurde abgesaugt. Immobilisiertes  $^3\text{H}$ -Thymidin wurde über die schwache  $\beta$ -Strahlung mit einem Flüssigszintillationscocktail in einem Szintillations-Messgerät gemessen. Der Flüssigszintillationscocktail besteht aus organischen Lösungsmitteln, einem Emulgator und einem Fluorophor. Die bei radioaktivem Zerfall entstehenden  $\beta$ -Teilchen regen die Lösungsmittelmoleküle an, indem sie ihre Energie auf diese übertragen. Kehren die Lösungsmittelmoleküle wieder in den Normalzustand zurück, so übertragen sie ihre Energie an die Fluorophore. Die dann als Photonen emittierte Energie kann im Szintillations-Messgerät detektiert werden.

### 3.2.19 DC unabhängige T-Zell Aktivierung

$1-2 \times 10^5$   $\text{CD}3^+$ -aufgereinigte T-Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96-well Platte ausgebracht und mit 1  $\mu\text{l}$  der anti-CD2/CD3/CD28-gekoppelten Kügelchen des „T Cell Activation/Expansion Kits“ inkubiert. Diese wurden exakt nach Angaben des Herstellers beladen. Die Stimulation erfolgte somit DC-unabhängig. Nach 96 h wurden die Zellen wie unter 3.2.18 beschrieben gepulst und die Proliferationsrate bestimmt.

### 3.2.20 Genomweite Expressionsanalysen mit DNA-Microarrays

$1 \times 10^6$  Zellen wurden 24 h vor Stimulation in 6-well Platten ausgesät. Die Stimulation der Zellen erfolgte in Triplikaten für 4 h mit  $10^8/\text{ml}$  UV-inaktiviertem *P. aeruginosa* oder *S. aureus* oder mit RSV (MOI 1). RNA wurde wie unter 3.2.10 beschrieben aufgereinigt. Die folgenden Schritte wurden im Labor von Roland Lang (Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Klinikums rechts der Isar, München) durchgeführt. Die Integrität und Qualität der RNA wurde auf einem Bio-Rad Experion automated electrophoresis system (Biorad, München) überprüft. 3  $\mu\text{g}$  RNA wurden in einer 2-Schritt cDNA Synthese umgeschrieben, dabei Biotin markiert. Anschließend wurde die cDNA fragmentiert und auf den humanen U133A 2.0 Microarray nach Angaben des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. Der U133A 2.0 chip ist ein Oligomer-basierter Microarray, bei dem 11 synthetisch hergestellte Oligonukleotide (25 bp) pro Gen als Sonden an einer definierten Position in situ synthetisiert werden ( $> 22.000$  probe sets, 14.500 charakterisierte Gene). Hierbei binden markierte cRNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Um zwischen echtem Signal und Fehlhybridisierung zu unterscheiden, wird für jedes „perfect match“ Oligo ein „mismatch“ Oligo (unterscheidet sich in einem Nukleotid) platziert. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen cRNA Stücke wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines Lasers ausgelesen und zunächst mit der Affymetrix GCOS Software analysiert. Jeder Array wurde auf

folgende Qualitätskriterien hin untersucht: gewichtetes mittleres Hintergrundrauschen von 69 mit einer Standardabweichung von 19, Normalisierungsfaktor zwischen 0,3 und 0,6 und 3'-5' Quotient für die Kontrollgene GAPDH und  $\beta$ -Aktin  $<1.1$ . CEL files wurden mit dem im Statistikprogramm „R“ implementierten RMA-Algorithmus (rma: robust multiarray analysis) normalisiert (Bolstad et al., 2003) ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)). Die Liste der signifikant regulierten Gene wurde durch die Anwendung des SAM multiclass Algorithmus (SAM: Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al., 2001) auf alle 4 experimentellen Bedingungen (Medium, *S.aureus*, RSV and *P. aeruginosa*) generiert. Die 1% False Discovery Rate (FDR) als Signifikanzmaß überschritt für differenziell regulierte Gene 1364 probe sets. Der zusätzliche Filter  $\max(\text{alle Mittelwerte})/\min(\text{alle Mittelwerte}) > 2$  resultierte in 701 probe sets (entspricht 520 Genen). Der Tukey Honest Significant Differences Test (Miller, 1987) wurde zu Evaluationszwecken angewandt, um zu testen, welche Veränderungen der mittleren Expressionswerte zwischen den jeweiligen Bedingungen gegenüber Medium signifikant unterschiedlich ist (bei einer 5% statistischen Wahrscheinlichkeit). Weiteres Filtern und Bearbeiten der Daten wurde mit der Spotfire DecisionSite 8.0 Software (Spotfire Somerville, USA) durchgeführt. Eine sogenannte „heatmap“, bei der die hochregulierten Gene relativ zur Baseline (in diesem Fall Medium) in rot und die runterregulierten Gene in grün dargestellt sind, wurde mit dem Programm Genesis (release 1.6.0) erstellt (Sturn et al., 2002). Die Überrepräsentierung von Gene Ontology Klassifizierungen wurde mit dem Software Programm der Firma Genomatix Bibliosphere ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) analysiert.

### 3.2.21 Statistische Auswertungen

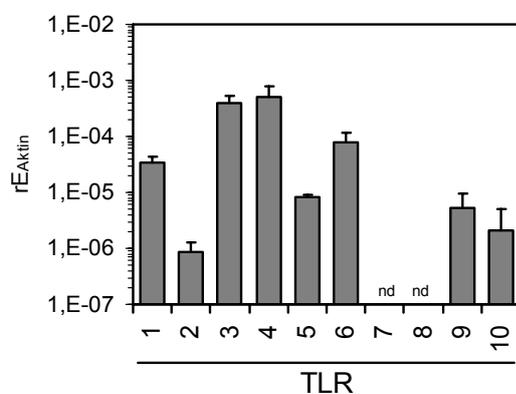
Zur Beschreibung und Bewertung der Untersuchungsdaten wurden unterschiedliche Streuungsmaße angewandt. Zunächst wurde der Mittelwert (arithmetisches Mittel) gebildet. Für Experimente, die mit primären Zellen von humanen Spendern durchgeführt wurden, wurde als Streuungsmaß der Standardfehler (SEM; standard error of the mean) verwendet, um die Variabilität zwischen den verschiedenen Spendern zu berücksichtigen. Der Standardfehler ist die Standardabweichung der Stichprobenmittelwerte, der eine Aussage über die Güte des ermittelten Mittelwertes liefert. Für alle weiteren Experimente wurde die Standardabweichung (SD; standard deviation) verwendet, die ein Maß für die Streuung der Werte einer Variablen um ihren Mittelwert ist. Die Anwendung von statistischen Tests für die genomweite Expressionsanalysen mittels DNA-Microarrays ist gesondert unter 3.2.20 beschrieben.

## 4 Ergebnisse

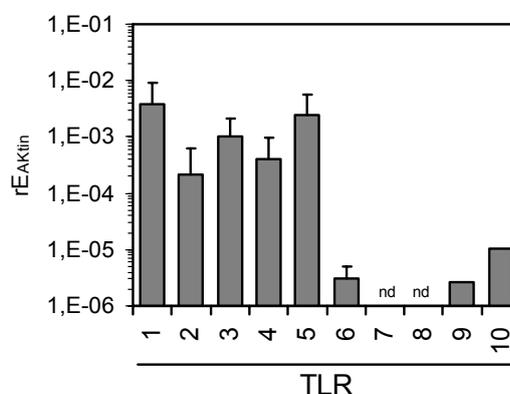
### 4.1 Humane bronchiale Epithelzellen exprimieren funktionale Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Zu Beginn der Untersuchungen war wenig über die Expression von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf humanen bronchialen Epithelzellen bekannt. Daher wurde zunächst die Expression verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf der Epithel-Zelllinie BEAS-2B (und den Zelllinien IHAEo<sup>-</sup>, 16-HBE, MM-39; Daten nicht gezeigt) und auf primären humanen bronchialen Epithelzellen analysiert. Zu den untersuchten Rezeptoren aus der Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren (PRR) gehörten unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLRs), der Mannoserezeptor, CD14, Peptidoglykan-Erkennungsproteine (PGRPs), N-formyl-Methionin-Rezeptor (fMLP) und die zytosolischen Rezeptoren NOD1 und NOD2. Für die Analyse wurde aus den genannten Epithelzellen cDNA hergestellt und mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression der verschiedenen Rezeptoren untersucht (Abbildung 4-1). TLR1-6, 9 und 10 wurden sowohl in BEAS-2B als auch in primären Epithelzellen exprimiert. TLR1, 3, 4, 5 und TLR6 waren in BEAS-2B Zellen in hoher Kopienzahl vorhanden. TLR2 war zusammen mit TLR 9 und TLR10 niedrig exprimiert. In primären Zellen hingegen war TLR2 in etwas reduzierter Kopienzahl vorhanden, TLR6, 9 und TLR10 waren in marginalen Kopienzahlen detektierbar. TLR7 und TLR8 konnten weder in BEAS-2B noch in primären Epithelzellen nachgewiesen werden. Der Mannoserezeptor wurde in primären Epithelzellen und in BEAS-2B Zellen in ähnlicher Stärke exprimiert. Zudem konnten Transkripte von CD14 und fMLP-Rezeptor detektiert werden, wohingegen keines der vier bekannten PGRPs und Dektin-1 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Von den untersuchten intrazellulären Rezeptoren konnten nur Transkripte von NOD1 und nicht von NOD2 detektiert werden.

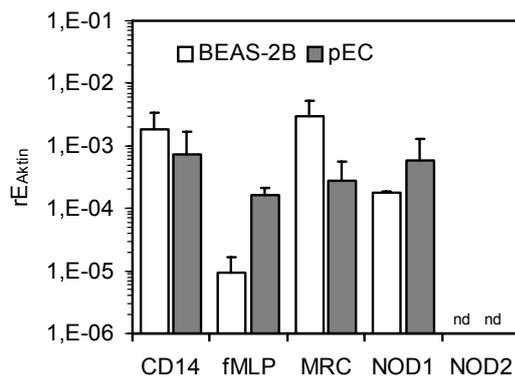
A



B



C

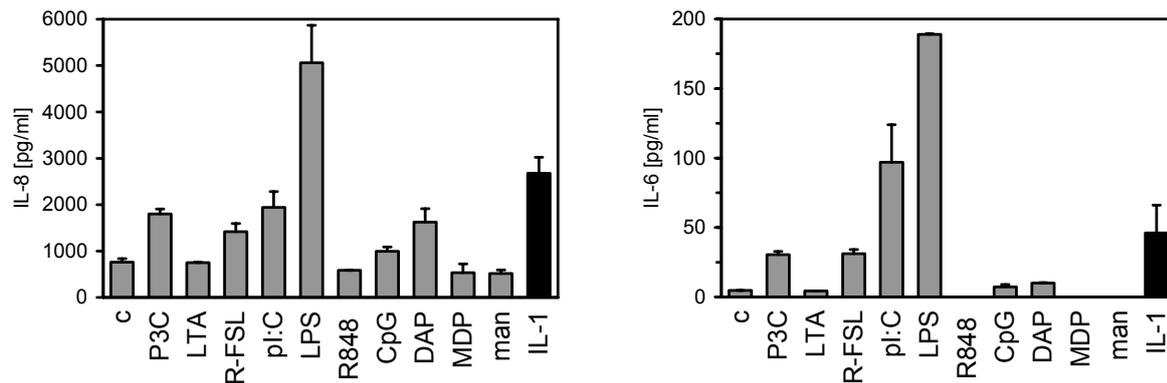


**Abbildung 4-1: Mustererkennungsrezeptoren in bronchialen Epithelzellen**

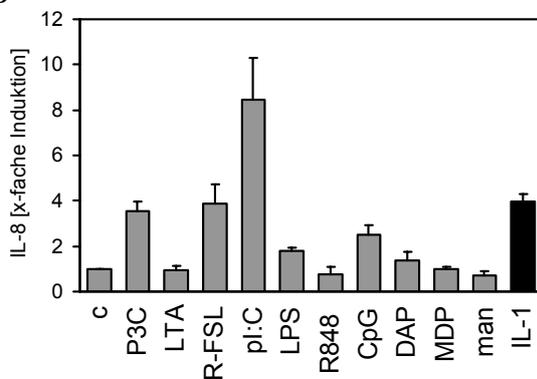
Die Expression von TLR 1-10 wurde in BEAS-2B (A) und primären bronchialen Epithelzellen (B) mittels quantitativer real-time RT PCR analysiert. Angegeben ist die relative Expression der untersuchten Gene, normiert auf die Expression von  $\beta$ -Aktin (Mittelwert + SD, n=2; nd = nicht detektierbar). (C) Analyse der Expression von CD14, fMLP, MRC (Mannoserezeptor), NOD1 und NOD2 in BEAS-2B und in primären bronchialen Epithelzellen (Mittelwert + SD, n=3; nd = nicht detektierbar).

Um die Funktionalität dieser als mRNA exprimierten Rezeptoren zu überprüfen und weil kaum gut charakterisierte Antikörper für den Proteinnachweis zur Verfügung standen, wurden BEAS-2B Zellen und primäre Epithelzellen mit sehr sauber aufgereinigten, spezifischen Liganden stimuliert. Als Aktivierungsparameter wurde die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und des Chemokins IL-8 mittels ELISA bestimmt. Die Liganden für TLR1 (Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>), -2 (R-FSL, Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>), -3 (p:IC), -4 (LPS), -6 (R-FSL), -9 (CpG) und NOD1 (DAP) waren in der Lage, IL-8 und IL-6 (Abbildung 4-2) Sekretion zu induzieren. Es zeigte sich, dass p:IC und LPS auf BEAS-2B die potentesten Stimuli darstellten. Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, R-FSL und DAP führten ebenfalls zu einer erhöhten Zytokinfreisetzung, DAP hingegen war nicht in der Lage, IL-6 Sekretion zu induzieren. Die Aktivierung der Zellen durch CpG-DNA war insgesamt sehr schwach ausgeprägt. Eine Inkubation mit LTA (TLR2 Ligand) bewirkte keine Zytokinfreisetzung. Außerdem konnte keine Stimulation von TLR7+8 durch R848 und von NOD2 durch MDP beobachtet werden, was im Einklang mit einer fehlenden Expression dieser Rezeptoren auf den Zellen steht. Zusätzlich konnte der Mannoserezeptor, dessen Expression auf mRNA Ebene nachgewiesen wurde, nicht mit Mannan (man) stimuliert werden. BEAS-2B Zellen und primäre bronchiale Epithelzellen zeigten ein ähnliches Aktivierungsmuster, jedoch antworteten die primären Zellen im Vergleich zu BEAS-2B Zellen sehr viel schwächer auf LPS. BEAS-2B Zellen wurden im Folgenden als ausreichend gutes Modell für humane bronchiale Epithelzellen für weitere Versuche betrachtet. Dies erfolgte auch unter dem Gesichtspunkt der schwierigen Verfügbarkeit von primären Epithelzellen und einer beträchtlichen Spendervarianz. Für die Evaluation der Kernbefunde wurden jedoch auch primären Epithelzellen verwendet.

A



B



**Abbildung 4-2: Differenzielle Erkennung von mikrobiellen Stimuli in bronchialen Epithelzellen**

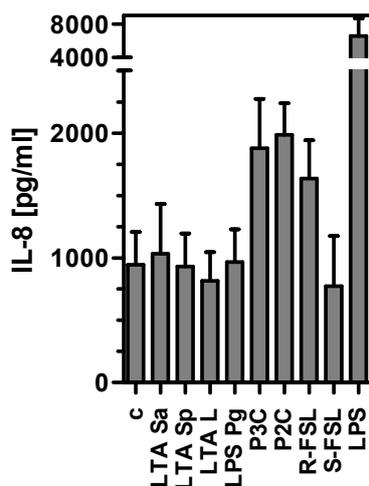
(A) BEAS-2B Zellen wurden mit verschiedenen Liganden für „pattern recognition receptors“ über Nacht stimuliert. IL-8 und IL-6 Sekretion (Triplikate+SD) wurden mittels ELISA bestimmt. Die Stimuli wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: 10 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (P3C), LTA, Mannose, 5 µg/ml DAP, MDP, 1 µg/ml R-FSL-1, pl:C, R848, 1 µM CpG, 10 ng/ml LPS und IL-1β. (B) Primäre humane bronchiale Epithelzellen wurden, wie oben beschrieben, stimuliert und die IL-8 Freisetzung im ELISA nachgewiesen. Die unstimulierte Kontrolle wurde, aufgrund von Spendervariabilität, normiert und als 1 gesetzt (x-fache Induktion; n=2, Mittelwert+SD).

#### 4.2 Liganden-abhängige Unterschiede in der Aktivierung von TLR2

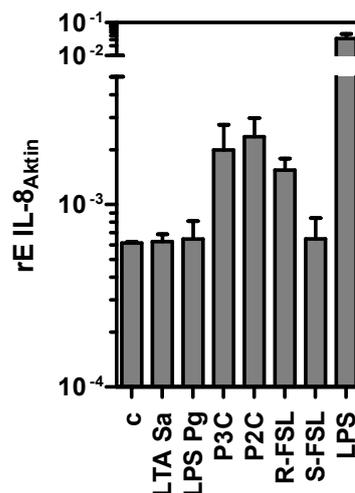
Verglichen mit anderen TLRs detektiert TLR2 ein weites Spektrum von bakteriellen Liganden und ist maßgeblich an der Erkennung gram-positiver Keime beteiligt. Die Stimulationen in Abbildung 4.2 zeigten bereits eine unterschiedliche Aktivität verschiedener TLR2 Liganden bezüglich der Aktivierung von bronchialen Epithelzellen, welche jetzt genauer untersucht werden sollte. Eine Vielzahl an bakteriellen Zellwandbestandteilen, wie z.B. Lipoteichonsäuren, sowie bakterielle Lipoproteine und deren synthetisch hergestellten Analoga di-/tri-palmitoyl-cysteinylseryl-(lysyl)3-lysine (Pam<sub>2/3</sub>CysSK<sub>4</sub>) und MALP-2 (macrophage-activating lipoprotein von *Mycoplasma fermentans*) bzw. R-FSL-1/S-FSL-1 bestehend aus dem N-terminalen Teil des 44 kDa Lipoprotein LP44 von *Mycoplasma salvarium*, sind Agonisten von TLR2 (Buwitt-Beckmann et al., 2006). LPS-Präparationen von *Porphyromonas gingivalis* wird ebenso eine TLR2-Aktivität zugesprochen (Hirschfeld et al., 2001; Hashimoto et al., 2004). Die Erkennung einer Vielzahl unterschiedlicher Liganden wird durch die funktionelle Beteiligung von mehreren Rezeptoren ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass TLR1 und TLR6 obligatorisch an der Erkennung bakterieller Lipopeptide beteiligt sind. Das Heterodimer TLR1/2 erkennt triacylierte Lipopeptide, wohingegen MALP-2 über das

Heterodimer TLR2/6 die Zelle aktiviert (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002; Ozinsky et al., 2000). Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> repräsentiert ein synthetisches Lipohexapeptid Analogon der Lipopeptide aus der Zellwand von *E. coli* (Buwitt-Beckmann et al., 2006). Für LTA hingegen wurde beschrieben, dass TLR2 alleine ausreicht, um die Zellen zu aktivieren (Schwandner et al., 1999; Lehner et al., 2001; Morath et al., 2002). Zusätzlich wird für LTA auch eine Beteiligung von TLR6 diskutiert (Henneke et al., 2005). BEAS-2B Zellen wurden mit einem erweiterten Repertoire an Liganden für TLR2 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach über Nacht Inkubation wurde die IL-8 Freisetzung mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde eine 2 h Stimulation durchgeführt und die Induktion von IL-8 mRNA mittels Real-time RT PCR quantifiziert. In Abbildung 4-3 zeigten die Liganden einen deutlichen Unterschied in ihrer Stimulativität, sowohl in der IL-8 Sekretion (Abbildung 4-3 A) als auch in der IL-8 mRNA Induktion (Abbildung 4-3 B). Lipoteichonsäuren aus drei verschiedenen *gram-positiven* Bakterien waren allesamt inaktiv. LPS von *Porphyromonas gingivalis* und S-FSL waren ebenfalls nicht stimulatив. Triacyliertes Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> und diacyliertes Lipopeptid R-FSL induzierten hingegen deutliche Mengen an IL-8.

A



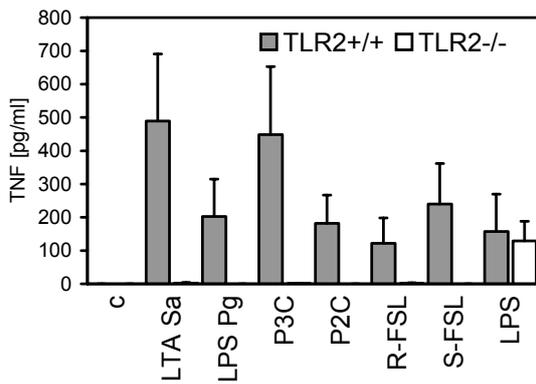
B



**Abbildung 4-3: Differentielle TLR2 Sensitivität in humanen bronchialen Epithelzellen**

BEAS-2B Zellen wurden mit Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* (LTA Sa), *Streptococcus pneumoniae* (LTA Sp), *Listeria monocytogenes* (LTA L), LPS von *Porphyromonas gingivalis* (LPS Pg) (je 10 µg/ml), Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub>, Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (5 µg/ml), R-FSL-1 oder S-FSL-1 (1 µg/ml) oder 10 ng/ml LPS stimuliert und (A) die IL-8 Sekretion (über Nacht stimuliert, Mittelwert+SD, n=2) und (B) IL-8 mRNA Induktion (2 h Stimulation, Mittelwert+SD, n=2) bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die eingesetzten Stimuli tatsächlich komplett TLR2 abhängig waren, wurden diese auf murinen Knochenmarkszellen von Wildtyp- und TLR2 knockout-Mäusen getestet (Abbildung 4-4). Hierbei wurde TNFα als Aktivierungsparameter für Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und Dendritische Zellen) gemessen. Nach über Nacht Stimulation wurde die induzierte TNF Sekretion im ELISA gemessen. Es zeigte sich, dass die TNF Sekretion aller Liganden komplett TLR2 abhängig war. Als Kontrolle diente LPS, welches über TLR4 stimuliert und keine TLR2 Abhängigkeit zeigte. Zusätzlich zeigte sich auch, dass LTA Präparationen auf murinen Knochenmarkszellen besonders potente Stimuli im Vergleich zu den verwendeten Lipopeptiden waren. Die Hyporesponsivität von BEAS-2B gegenüber LTA Stimulation kann also nicht im Liganden selbst begründet sein.



**Abbildung 4-4: TLR2 Abhängigkeit der getesteten TLR2 Liganden**

Murine Knochenmarkszellen von TLR2<sup>-/-</sup> oder Wildtyp-Mäusen wurden mit den Liganden aus Abbildung 4-2 in folgenden Konzentrationen stimuliert: Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* (LTA Sa), LPS von *Porphyromonas gingivalis* (LPS Pg) (je 10 µg/ml), Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub>, Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, R-FSL-1 oder S-FSL-1 (je 0.5 µg/ml) oder 10 ng/ml LPS. Die TNF Produktion wurde im ELISA gemessen (Mittelwert+SD, n=3).

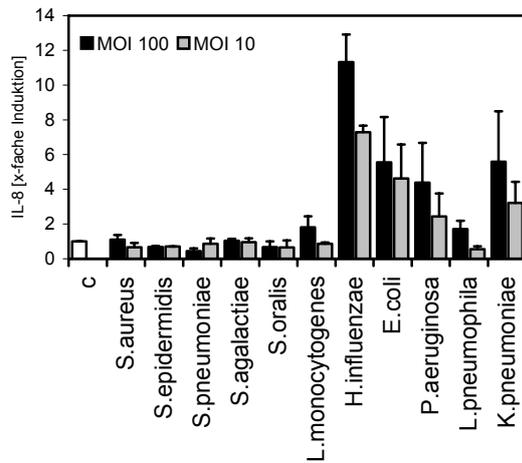
### 4.3 Hyporesponsivität bronchialer Epithelzellen gegenüber *gram-positiven* Bakterien

Molekulare Muster (PAMPs) von *gram-positiven* Bakterien sind hauptsächlich in Lipopeptiden und LTA repräsentiert, während LPS Hauptbestandteil der Zellwand *gram-negativer* Mikroorganismen ist. Aufgrund der Vorbefunde differentieller Erkennung von Lipopeptiden und LPS wurde die Frage untersucht, ob sich die unterschiedliche Empfindlichkeit bronchialer Epithelzellen auf TLR2 und TLR4 Liganden auch bei Stimulation mit Bakterien widerspiegelt. BEAS-2B Zellen wurden mit verschiedenen inaktivierten *gram-positiven*<sup>3</sup> und *gram-negativen*<sup>4</sup> Keimen in einer MOI (multiplicity of infection – Verhältnis der Bakterien zu den stimulierten Zellen) von 10 und 100 über Nacht stimuliert und die IL-8 Sekretion mittels ELISA bestimmt (Abbildung 4-5 A). Es konnte beobachtet werden, dass *gram-positive* Keime Epithelzellen kaum aktivieren konnten, wohingegen *gram-negative* Bakterien durchweg Stimulativität zeigten. Als Positivkontrolle wurden periphere Blutmonozyten (CD14<sup>+</sup> sortierte Zellen) getestet, welche *gram-positive* und *gram-negative* Keime erkennen können. Tatsächlich reagierten CD14<sup>+</sup> Zellen sowohl auf das Spektrum *gram-positiver* als auch *gram-negativer* Bakterien mit TNF Sekretion, wenn auch auf *gram-positiven* Keime weniger sensitiv (Abbildung 4-5 B). Das lässt auf die Verwendung stimulativer Bakterienpräparationen schließen. Die Reaktion primärer humaner Epithelzellen auf *gram-positive* und *gram-negative* Keime war vergleichbar mit der von BEAS-2B Zellen (Abbildung 4-5 C). Erneut zeigte sich, dass bronchiale Epithelzellen hyporesponsiv auf *gram-positive* Bakterienpräparationen waren.

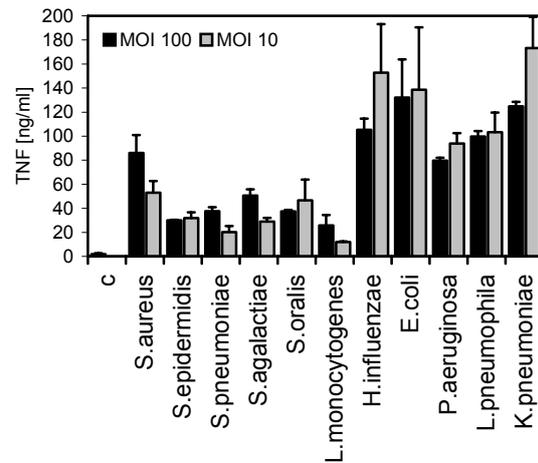
<sup>3</sup> *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus oralis*

<sup>4</sup> *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa*

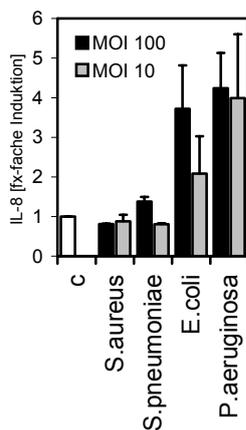
A



B



C



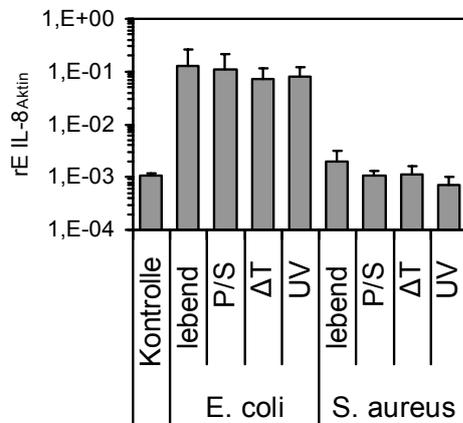
**Abbildung 4-5: Differentielle Stimulation von BEAS-2B Zellen durch *gram-positive* und *gram-negative* Bakterien**

BEAS-2B Zellen (A) wurden mit UV-inaktivierten Bakterien in einer MOI (multiplicity of infection) von 100 und 10 über Nacht stimuliert, die IL-8 Sekretion bestimmt und die unstimulierte Kontrolle als 1 gesetzt (x-fache Induktion, Mittelwert+SD, n=3, c = unstimulierte Kontrolle). (B) CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden in Duplikaten, wie in (A), stimuliert und die TNF Sekretion im ELISA gemessen (Mittelwert+SD, eines aus zwei Experimenten gezeigt). (C) Primäre humane bronchiale Epithelzellen wurden, wie oben beschrieben, stimuliert und die IL-8 Freisetzung im ELISA nachgewiesen (Mittelwert+SD, n=3).

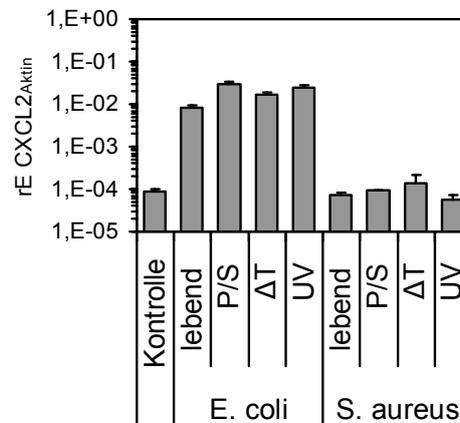
Um auszuschließen, dass die beobachtete Hyporesponsivität von bronchialen Epithelzellen auf eine Zerstörung stimulatorischer Strukturen während der UV-Inaktivierung zurückzuführen ist, wurden die Experimente zur Stimulativität eines repräsentativen *gram-negativen* Keims (*E. coli*) und eines *gram-positiven* Erregers (*S. aureus*) mit unterschiedlichen Inaktivierungsmethoden wiederholt. Dazu wurden die Bakterien in einer MOI von 100 lebend, in An- oder Abwesenheit der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (P/S), hitzeinaktiviert oder UV-inaktiviert auf die Zellen gegeben und nach 2 h die mRNA der Zellen isoliert. Die Proliferation der lebenden Bakterien bedingte, dass nur Kurzzeit-Stimulationen möglich waren. Daher wurde die induzierte mRNA und nicht die Proteinsekretion nachgewiesen. In Abbildung 4-6 wurde die Induktion von IL-8 (A) und CXCL2 (B) (wie IL-8 ein stark induzierbares Chemokin, vgl. Tabelle 4-1) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels quantitativer Real-time RT-PCR ermittelt. Die unterschiedlichen Inaktivierungsmethoden hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Stimulativität der Bakterien. *E.coli* konnte in allen Fällen die

beiden Chemokine induzieren, wohingegen *S. aureus* unter keiner Bedingung auf BEAS-2B stimulatив war.

A



B



**Abbildung 4-6: Austestung verschiedener Inaktivierungsmethoden bezüglich der Stimulativität mikrobieller Präparationen auf BEAS-2B Zellen**

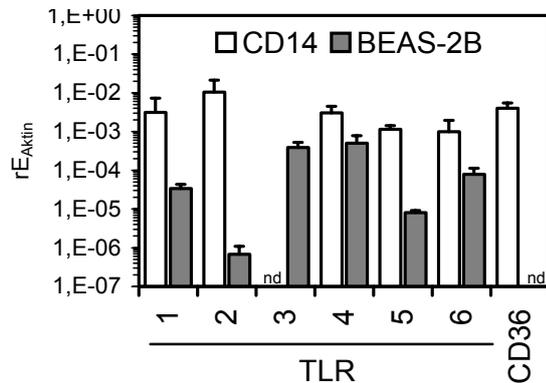
BEAS-2B Zellen wurden für 2 h mit *E. coli* und *S. aureus* stimuliert. Die Bakterien wurden entweder lebend, mit oder ohne Penicillin und Streptomycin (P/S) auf die Zellen gegeben oder zuvor durch Hitze ( $\Delta T$ ) oder UV-Strahlung (UV) inaktiviert. Die IL-8 (A) und CXCL2 (B) Induktion wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR gemessen und auf das housekeeping Gen  $\beta$ -Aktin normiert (MW+SD, n=2).

#### 4.4 Niedrige oder fehlende Expression von TLR2 und CD36 in bronchialen Epithelzellen

##### 4.4.1 Das Expressionsniveau von TLR2 und die Abwesenheit des Korezeptors CD36 regulieren die Sensitivität von bronchialen Epithelzellen gegenüber verschiedenen TLR2 Liganden

Es konnte eine unterschiedliche Responsivität bronchialer Epithelzellen gegenüber verschiedenen TLR2 Liganden beobachtet werden. Das ging einher mit der Hyporesponsivität auf Stimulation mit intakten *gram-positiven* Keimen. Ob diese Beobachtung in Zusammenhang mit einer differenziellen Rezeptorexpression stand, wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR überprüft. Dazu wurde die Stärke der Expression von TLR1-6 im Vergleich zu CD14<sup>+</sup> Monozyten bestimmt (Abbildung 4-7). Es konnte beobachtet werden, dass die Referenzzellen (CD14<sup>+</sup>) TLR2 stärker exprimierten als die anderen TLRs, wobei TLR3 Expression erwartungsgemäß nicht detektiert werden konnte (Hornung et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigten BEAS-2B Zellen eine sehr niedrige Expression von TLR2, verglichen mit TLR1 und TLR6. TLR3 und TLR4 waren die am stärksten exprimierten Rezeptoren. Die unterschiedlich starke mRNA-Expression von TLR2 auf BEAS-2B Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten spiegelte sich in der Proteinexpression an der Zelloberfläche wider (Abbildung 4-8). Dazu wurde mittels FACS-Analyse TLR2-Protein an der Zelloberfläche nachgewiesen. TLR2 konnte auf

Monozyten stark angefärbt werden (graues Histogramm), wohingegen BEAS-2B Zellen nur eine geringe Färbung im Vergleich zum Isotyp (gestrichelte Linie) aufwiesen.

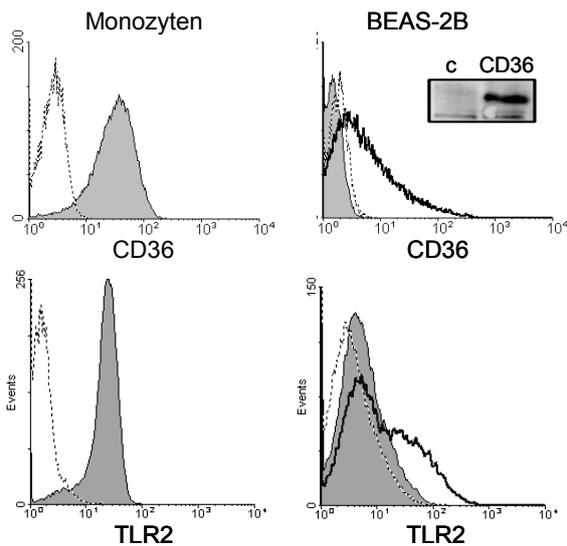


**Abbildung 4-7: Expressionsniveau von TLR2 und CD36 in Epithelzellen und Monozyten**

Das Expressionsniveau von TLR 1-6 und CD36 wurde in CD14<sup>+</sup> Monozyten und BEAS-2B Zellen mittels quantitativer real-time RT PCR bestimmt. Angegeben ist die relative Expression der angegebenen Gene auf  $\beta$ -Aktin normiert (Mittelwert + SD, n=3, nd = nicht detektierbar).

Kürzlich wurde veröffentlicht, dass CD36 ein essentieller Korezeptor für die Erkennung von Lipoteichonsäuren und bestimmter diacylierter Lipopeptide ist (Hoebe et al., 2005). Deshalb wurde CD36 als möglicher Korezeptor in bronchialen Epithelzellen untersucht. Eine Expression von CD36 auf BEAS-2B Zellen konnte weder mit quantitativer real-time RT-PCR noch mittels FACS-Analyse als Protein an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8). CD14<sup>+</sup> Monozyten dagegen wiesen eine starke Expression von TLR2 und CD36 auf.

Um die Rolle von CD36 als Korezeptor zu überprüfen, wurde dann humanes CD36 aus cDNA von humanen CD14<sup>+</sup> Zellen kloniert. Anschliessend wurden BEAS-2B Zellen mit dem Expressionsplasmid für CD36 transfiziert und die Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abbildung 4-8). In den CD36 transfizierten Zellen konnte die Oberflächenexpression des Rezeptors im FACS deutlich sichtbar gemacht werden, wobei die Stärke des Signals durch die Transfektionseffizienz bestimmt wurde. Um zusätzlich zu zeigen, dass das CD36 Protein in der richtigen Größe vorliegt, wurden die transfizierten Zellen lysiert und mittels Westernblot auf eine Membran immobilisiert. Das Protein wurde anschließend über den His-Tag angefärbt. Das detektierte Protein hatte eine Größe von ungefähr 88-90 kDa, was der Größe von CD36 entspricht. Zudem wurden BEAS-2B Zellen mit einem Expressionsplasmid für humanen TLR2 transfiziert, um die Expression für nachfolgende funktionelle Untersuchungen (Abbildung 4-8) zu modulieren und zu verstärken. Dabei zeigte sich, dass nach erfolgter Transfektion TLR2 an der Oberfläche von Epithelzellen zu detektieren war.



**Abbildung 4-8: Oberflächenexpression von TLR2 und CD36 auf BEAS-2B und CD14<sup>+</sup> Monozyten**

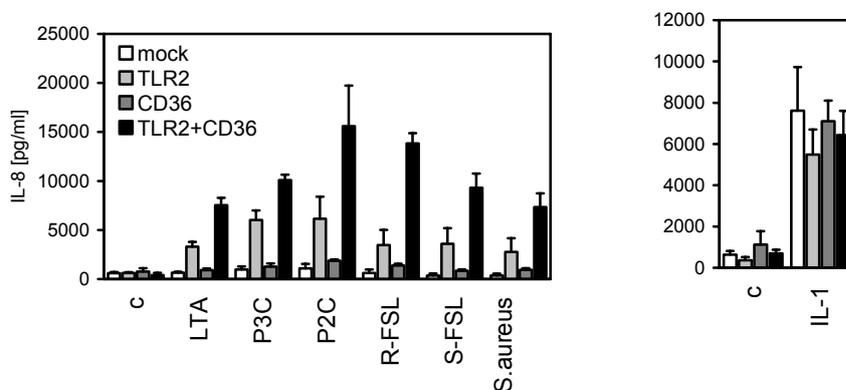
Die Oberflächenexpression von TLR2 und CD36 wurde mittels FACS-Analyse untersucht (gestrichelte Linie = Isotypkontrolle). Zusätzlich wurden BEAS-2B mit CD36 und TLR2 transfiziert (dicke schwarze Linie). Die Expression von CD36 in der richtigen Größe wurde per Western Blot nachgewiesen (c = untransfizierte Zellen).

#### 4.4.2 Der fehlende Korezeptor CD36 und das niedrige Expressionsniveau von TLR2 sind ursächlich für die Hyporesponsivität auf verschiedene TLR2 Liganden

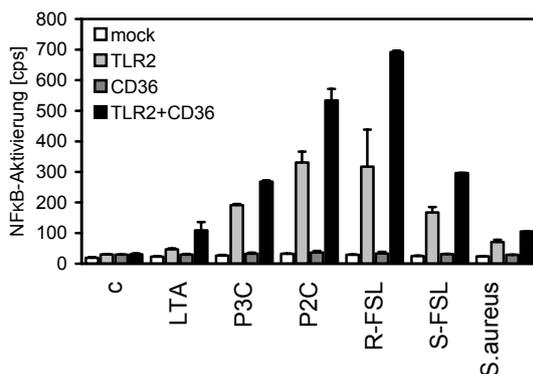
Im Folgenden wurde untersucht, welche Bedeutung die niedrige TLR2 Expression und die fehlende Expression von CD36 für die differenzielle Sensitivität bronchialer Epithelzellen auf unterschiedliche TLR2 Liganden hat. Dazu wurden BEAS-2B Zellen mit den Expressionsplasmiden für TLR2 und CD36 in verschiedenen Kombinationen transfiziert. In Abbildung 4-9 wurden die Zellen mit einem Leervektor (mock) als Negativkontrolle, jeweils TLR2 oder CD36 alleine oder TLR2 mit CD36 zusammen transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen über Nacht mit unterschiedlichen Liganden für TLR2 und der nicht TLR2 abhängigen Positivkontrolle IL-1 $\beta$  stimuliert. Die IL-8 Freisetzung wurde im ELISA ermittelt. Die Transfektion des Leervektors alleine führte zu keiner IL-8 Sekretion. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Transfektionsbedingungen. Die Transfektion von CD36 alleine resultierte nicht in einer erhöhten Empfindlichkeit von BEAS-2B Zellen gegenüber LTA und den anderen Stimuli. Im Gegensatz dazu führte die durch Transfektion erhöhte TLR2 Expression zu einer verstärkten Sensitivität für LTA, messbar anhand vermehrter IL-8 Freisetzung. Darüber hinaus zeigte die Transfektion beider Rezeptoren (TLR2+CD36) einen synergistischen Effekt hinsichtlich der LTA Erkennung und IL-8 Freisetzung. Die Lipopeptide Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub> und Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> waren auf den mock-transfizierten Zellen bereits schwach aktiv, was bereits in Vorbefunden (Abbildung 4-2) beobachtet werden konnte. Hier führte die Transfektion von TLR2 (und damit die erhöhte Expression) ebenso zu einer erhöhten Aktivierung dieser Zellen. Das zeigt, dass bereits kleine Mengen an TLR2 ausreichend für eine suffiziente Erkennung von bestimmten TLR2 Liganden sind (wie z.B. für Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub> und Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>), BEAS-2B Zellen im Allgemeinen aber hyporesponsiv auf TLR2 abhängige molekulare Muster reagieren. Ebenso verhielt es sich für das *gram-positive* Bakterium *S. aureus*. Bereits kleine Mengen an zusätzlich transfiziertem TLR2 führten zu einer Responsivität gegenüber *S. aureus* (Abbildung 4-9). Die Transfektion von TLR2 und CD36 zeigte einen

synergistischen Effekt bezüglich der Erkennung des Bakteriums. Das unterstreicht zusätzlich die Beobachtungen für LTA, da die hier verwendete LTA aus *S. aureus* isoliert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in einem weiteren System beobachtet, bei dem BEAS-2B Zellen zusätzlich zu den TLR2/CD36 Plasmiden mit einem NFκB-abhängigen Reporterplasmid transfiziert wurden. Die Zellen wurden für 6 h stimuliert und die Luziferaseaktivität im Luminometer vermessen (Abbildung 4-9 B). Eine Erhöhung der Expression von TLR2 und CD36 führte zu einer verstärkten NF-κB-Aktivierung nach Stimulation mit den angegebenen TLR2 Liganden. Dabei zeigte sich gleichermaßen, dass der fehlende Korezeptor CD36 und das niedrige Expressionsniveau von TLR2 ursächlich für die differentielle Erkennung verschiedener TLR2 Liganden (vor allem LTA) und Hyporesponsivität auf *gram-positive* Keime sind.

A



B



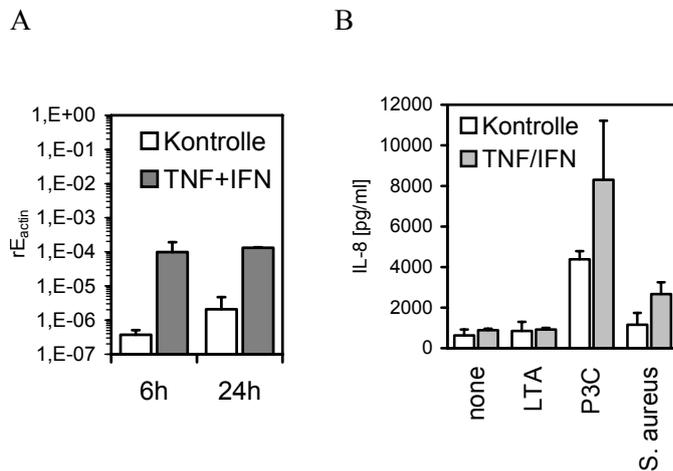
**Abbildung 4-9: Erhöhung der TLR2/CD36 Expression führt zur Sensitivierung von BEAS-2B Zellen gegenüber LTA und *gram-positiven* Bakterien**

(A) BEAS-2B Zellen wurden mit einem Leervektor (mock), CD36 und/oder TLR2 Expressionsplasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 µg/ml LTA, Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub>, 1 µg/ml R-FSL-1 und S-FSL, 10<sup>8</sup>/ml UV-inaktiviertem *S. aureus* oder 10 ng/ml IL-1β über Nacht stimuliert und die IL-8 Freisetzung im ELISA bestimmt. (B) Zellen wurden wie in (A) und zusätzlich mit einem NFκB-abhängigen Reporterplasmid transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde für 6 h stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde im Luminometer bestimmt (Mittelwert + SD, n=3).

#### 4.4.3 Regulation der TLR2 Expression durch TNFα und IFNγ

Homma et al. konnten zeigen, dass TNFα und IFNγ die Expression von TLR2 in Atemwegsepithelzellen erhöhen (Homma et al., 2004). BEAS-2B Zellen wurden deshalb mit TNFα und IFNγ für 6 und 24 Stunden stimuliert und die TLR2 mRNA Expression mittels real-time RT-PCR analysiert.

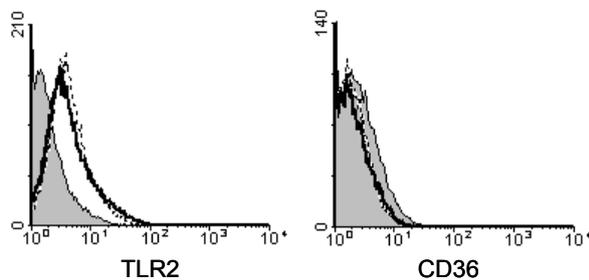
Tatsächlich zeigte sich nach 6 und 24-stündiger Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  eine erhöhte TLR2 mRNA Expression (Abbildung 4-10 A). Allerdings war kaum eine Erhöhung der TLR2 Proteinmenge auf der Oberfläche festzustellen (Abbildung 4-11). Funktionell konnte eine erhöhte IL-8 Sekretion nach Vorinkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  und anschließender Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> oder *S. aureus* Stimulation beobachtet werden. Jedoch hatte die erfolgte Vorstimulation keinerlei Einfluss auf die Erkennung von LTA (Abbildung 4-10 B).



**Abbildung 4-10:  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  induzieren eine erhöhte TLR2 mRNA-Expression**

(A) BEAS-2B Zellen wurden für 6 und 24 h mit 100 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert und TLR2 Expression relativ zum „housekeeping“ Gen  $\beta$ -Aktin mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen (Mittelwert+SD, einer aus zwei unabhängigen Versuchen gezeigt). (B) BEAS-2B Zellen wurden mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  für 24 h vorstimuliert. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und für weitere 18 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA, Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, und  $10^8/\text{ml}$  UV-inaktiviertem *S. aureus* stimuliert. Die IL-8 Freisetzung wurde im ELISA gemessen (Mittelwert+SD, einer aus zwei unabhängigen Versuchen gezeigt).

Nach Vorstimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  war CD36 weder als mRNA (Daten nicht gezeigt) noch als Protein an der Zelloberfläche detektierbar (Abbildung 4-11). Das erklärt möglicherweise, weshalb trotz TLR2 Erhöhung keine Responsivität für LTA erreicht wurde.



**Abbildung 4-11:  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  haben keinen Einfluss auf die TLR2 und CD36 Expression an der Zelloberfläche**

BEAS-2B Zellen wurden für 24 h mit 100 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert. Die Oberflächenexpression von TLR2 und CD36 wurde mittels FACS-Analyse untersucht (graue Kurve = Isotypkontrolle, gestrichelt = unstimulierte Zellen). Zusätzlich wurden BEAS-2B mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert (dicke schwarze Linie) (einer aus zwei unabhängigen Versuchen gezeigt).

#### 4.5 Genomweite Expressionsanalyse von BEAS-2B Zellen

Nachdem gezeigt worden war, dass bronchiale Epithelzellen in der Lage sind, Mikroben mit Hilfe von PRRs zu detektieren, stellte sich die Frage, ob bronchiale Epithelzellen auf verschiedene Pathogene gleichartig antworten oder Pathogen-spezifische Expressionsmuster existieren. Zusätzlich sollte die Frage untersucht werden, ob *S. aureus*, welcher kaum IL-8 aus bronchialen Epithelzellen freisetzen konnte, in der Lage war, eine andere Gruppe von Genen zu induzieren. Dazu wurden BEAS-2B Zellen mit drei unterschiedlichen bronchialen Pathogenen, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und Respiratory Syncytial Virus (RSV) für 4 h in Triplikaten stimuliert, zelluläre RNA isoliert und genomweite Expressionsanalysen mit DNA-Microarrays durchgeführt.

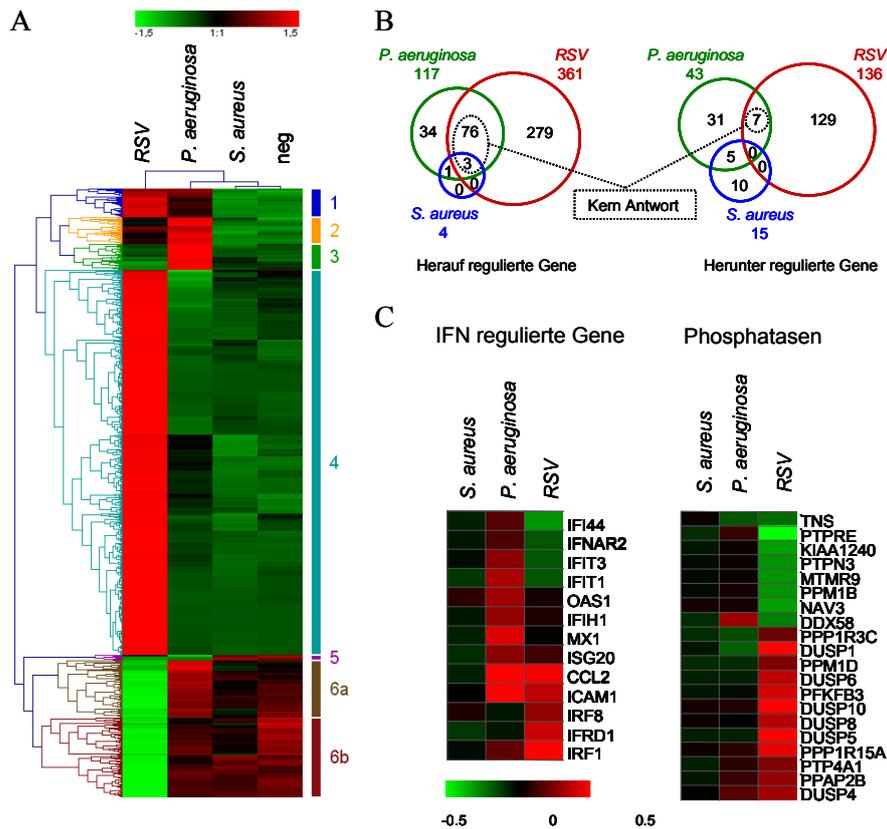
#### 4.5.1 Kernantwort von bronchialen Epithelzellen auf verschiedene Modellpathogene

Es fanden sich 520 individuelle Gene (701 probe sets), die nach Anwendung verschiedener Filterkriterien und statistischer Tests auf mindestens einen der drei Stimuli (*S. aureus*, *P. aeruginosa* und *RSV*) reguliert waren. Von diesen 701 probe sets wurde eine „heatmap“ erstellt (Abbildung 4-12 A), bei der durch „hierarchisches Clustering“ (Klassifikationsverfahren) Gene mit ähnlicher Funktion in eine Gruppe zusammengefasst und grafisch durch ein zweidimensionales Diagramm, einem sogenannten Dendrogramm dargestellt wurden (Eisen et al., 1998). Ein Dendrogramm ist eine spezielle Baumstruktur, deren Knoten jeweils einem Cluster entsprechen. Dabei zeigte sich, dass *S. aureus* weitgehend inaktiv war und nur eine minimale Anzahl von Genen regulierte. Das bestätigte die vorherigen Ergebnisse der mangelnden Erkennung von *gram-positiven* Keimen durch bronchiale Epithelzellen. *P. aeruginosa* und *RSV* hingegen regulierten eine beträchtliche Anzahl an Genen (siehe auch 4.5.2). Betrachtete man zuerst die Gene, die gleichartig herauf- (cluster 1 und 2) oder herunter- (cluster 5) reguliert wurden, so konnte eine generelle „Kern“-Antwort von Epithelzellen auf die beiden Pathogene (*P. aeruginosa* und *RSV*), die aus 86 unterschiedlichen Genen besteht, identifiziert werden (Tabelle 4-1, Anhang: Tabelle 7-1a, Tabelle 7-1d). Von diesen 86 induzierten Genen wurden 79 herauf- und 7 herunter-reguliert, die zusätzlich in einem Venn-Diagramm dargestellt wurden (Abbildung 4-12 B). Venn-Diagramme dienen der grafischen Veranschaulichung und stellen alle möglichen Relationen der vertretenen Stimulationsbedingungen dar. Eine nähere Analyse dieser Gene zeigte, dass die regulierten Gene der Kernantwort drei hauptsächliche Funktionen erfüllen: Inflammatorische Signalgebung, Chemoattraktion und Apoptoseregulation. Dazu gehören Gene, die für Chemokine, pro-inflammatorische Zytokine und intrazelluläre Signalmoleküle von Entzündungs-Signalwegen kodieren (Tabelle 4-1, Anhang: Tabelle 7-1a, Tabelle 7-1d). Chemokine (chemotaktische Zytokine) leiten Leukozyten, Monozyten und Neutophile Granulozyten zum Ort der Entzündung. Auffällig neben der massiven Induktion von Chemokinen (CCL2, CCL20, CXCL1, 2, 3 und IL-8) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-6 und IL-11), war die Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP12 und MMP3) und Superoxiddismutase (SOD2). Diese sind im Zusammenhang mit Reparatur und Umbau von Geweben beschrieben worden („tissue remodeling“) um z.B. Diapedese von Immunzellen zu ermöglichen. Superoxiddismutase schützt eukaryote Zellen vor reaktiven Sauerstoffverbindungen. Ein Teil der Kernantwort waren Gene, die zu „inflammatorischer Signalkaskade“ zusammengefasst werden können. Dazu gehören unter anderem Krüppel-like Faktoren (KLFs), die als Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden. KLF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der benötigt wird, um die Barrierefunktion der Haut aufrecht zu erhalten. Zusätzlich waren auch KLF6 und KLF9 reguliert. Weitere induzierte Gene waren TNFAIP2 und TNFAIP3. TNFAIP3/A20 ist ein Inhibitorprotein für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und inhibiert TNF induzierten Zelltod.

#### 4.5.2 Pathogen-spezifische Expressionsmuster

Zusätzlich zur gleichartig induzierten Kernantwort konnten Pathogen-spezifische Expressionsmuster gefunden werden. Eine große Gruppe von Genen wurde vorzugsweise nur von *RSV* reguliert (279 herauf regulierte Gene: Abbildung 4-12 cluster 4, 129 herunter regulierte Gene: cluster 6b). Zudem gab es Gene, die eine hauptsächlich von *P. aeruginosa* regulierte Antwort repräsentierten (34 herauf regulierte Gene: cluster 3, 31 herunter regulierte Gene). Außerdem wurde die Transkription einer Gruppe von 40 Genen, von den beiden Pathogenen *P. aeruginosa* und *RSV* gegenläufig reguliert (cluster 6a). Bei näherer Betrachtung der von *P. aeruginosa* spezifisch induzierten Gene, zeigte sich, dass zusätzlich zu der Kern-Antwort weitere Gene, welche Entzündungsmechanismen, anti-apoptotische Signalkaskaden und der Chemoattraktion zuzuordnen sind, reguliert wurden (Anhang: Tabelle 7-1b, Tabelle 7-1e). In Abbildung 4-12 C wurden dafür exemplarisch Gene aus der heatmap vergrößert dargestellt. Es zeigte sich, dass ein Teil der durch *P. aeruginosa* spezifisch induzierten Gene durch Interferon regulierbar war. Zu diesen Genen gehörten unter anderem IFNAR2 (interferon alpha receptor 2), ISG20 (interferon stimulated gene 20 kDa) und IFIT1, -3 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, -3). Das könnte möglicherweise ein Indiz für die Aktivierung von BEAS-2B Zellen durch *P. aeruginosa* über den TLR4-TRIF-IFN Signalweg sein.

Im Gegensatz dazu gehörten die meisten durch *RSV* regulierten Gene zu Gruppen, welche der Regulation von Transkription, Regulation des Nukleinsäuremetabolismus und anti-apoptotische Signalkaskaden zugeschrieben werden. Dies spiegelt die Notwendigkeit eines Virus zu replizieren wider (Anhang: Tabelle 7-1c, Tabelle 7-1 f). Das zeigt auch die Tatsache, dass *RSV* deutlich mehr Gene induzierte als *P. aeruginosa*. *RSV* induzierte drei prominente Gruppen von Genen. Die bereits erwähnten KLFs, NR4A (nuclear receptor subfamily 4, group A), denen eine Funktion als Transkriptionsfaktor zugeschrieben wurde und Hsp70 bzw. Hsp22 (heat shock proteins). Hitzeschockproteine sind molekulare Chaperone, die die Faltung von Proteinen kontrollieren. Zudem wurde beschrieben, dass Hsp70 direkt an den *RSV* Polymerase Komplex rekrutiert wird. NR4A1 ist als Transkriptionsfaktor beschrieben und reguliert Protein Kinase C (PKC) Aktivität über direkte Bindung an die katalytische Region. Neben den Genen, die *RSV* für die Replikation benötigt, induziert *RSV* auch Gene, die mit inhibitorischen Effekten im angeborenen Immunsystem assoziiert werden, wie z. B. Phosphatasen und Proteine der DUSP-Familie (Abbildung 4-12 C). Obwohl während der *RSV* Replikation doppelsträngige RNA entsteht, welche dann TLR3 aktiviert und über den TRIF-abhängigen Signalweg die Zellen stimuliert, werden von *RSV* verglichen mit *P. aeruginosa* viele Typ-I IFN-abhängigen Gene nicht induziert bzw. möglicherweise aktiv inhibiert (Abbildung 4-12 C).



**Abbildung 4-12: Veränderungen im Transkriptom von BEAS-2B nach Stimulation mit mikrobiellen Erregern**

BEAS-2B Zellen wurden in Triplikaten für 4 h mit  $10^8$ /ml UV-inaktiviertem *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder lebenden RSV (MOI 1) inkubiert und eine genomweite Expressionsanalyse mit DNA-Microarrays durchgeführt. (A) Die 701 regulierten „probe sets“ wurden mittels „Hierarchischem Clustering“ (Eisen et al., 1998) gruppiert und eine „heatmap“ erstellt (rot – heraufregulierte Gene; grün – herunterregulierte Gene). Seitlich davon sind verschiedene Gruppen (cluster) definiert, die Gene umfassen, die ähnlich reguliert sind (cluster 1 – 6b). (*P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*; RSV = „Respiratory Syncytial Virus“; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*; neg = unstimulierte Kontrolle). (B) Die Venn-Diagramme zeigen die Anzahl der Gene, die bei der jeweiligen Stimulationsbedingung herauf- oder herunterreguliert wurden (bestimmt durch den Tukey HSD test). (C) Aus der „heatmap“ wurden Gene vergrößert dargestellt, die durch Interferon induziert wurden (IFN regulierte Gene) oder Gene, die annotierte Phosphatase Aktivität besitzen (Phosphatasen). In diese Analyse wurden nur Gene einbezogen, die eine signifikante Regulation zeigten.

Tabelle 4-1: Gemeinsame Kernantwort auf *Pseudomonas aeruginosa* und RSV Stimulation

Gene Name	Gene Symbol	P. aerug <sup>1</sup>	RSV <sup>1</sup>
<b>Entzündungssignalkaskade, Apoptose</b>			
B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	2.17	3.04
baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	4.83	2.16
interferon regulatory factor 1	IRF1	1.60	3.25
jun B proto-oncogene	JUNB	1.50	7.94
Krüppel-like factor 4 (gut)	KLF4	3.83	17.47
Krüppel-like factor 6	KLF6	1.27	3.43
Krüppel-like factor 9	KLF9	3.57	4.13
nuclear factor, interleukin 3 regulated	NFIL3	1.31	3.73
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB1	2.10	2.09
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha phosphatidic acid phosphatase type 2B	NFKBIA	1.96	3.00
protein tyrosine phosphatase type 2B	PPAP2B	1.31	1.97
protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	PTP4A1	1.44	2.31
receptor-interacting serine-threonine kinase 4	RIPK4	1.72	2.48
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	TNFAIP2	3.96	1.84
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	5.33	9.55
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	1.33	1.94
putative lymphocyte G0/G1 switch gene	G0S2	2.62	2.27
<b>Chemoattraktion</b>			
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	8.45	3.06
chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	11.28	5.10
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	13.52	17.15
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	10.47	19.34
chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	1.82	2.62
interleukin 8	IL8	25.36	20.47
intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	ICAM1	3.83	2.49
MCP-1 treatment-induced protein	MCPIP	1.78	10.63
<b>Entzündung</b>			
interleukin 11	IL11	2.19	3.99
interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	3.72	10.00
leukemia inhibitory factor	LIF	1.90	4.79
matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12	5.44	2.04
matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MMP3	2.93	8.25
pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	PTX3	4.85	3.09
superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	3.78	2.21

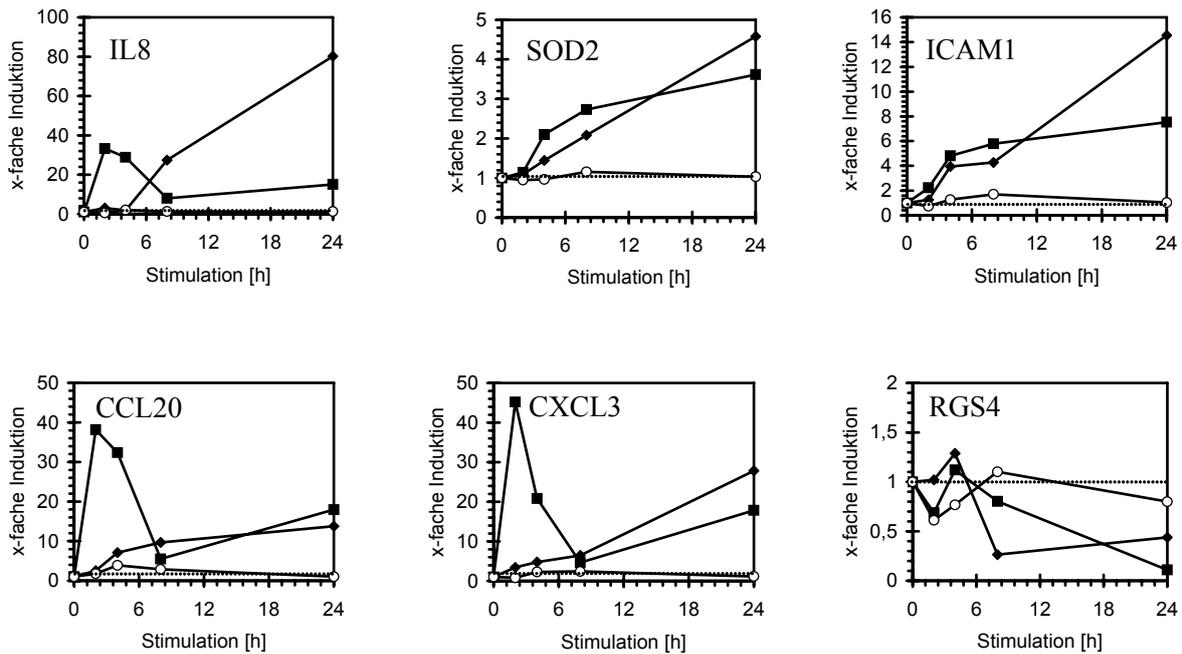
<sup>1</sup>x-fache Veränderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, die als 1 gesetzt wurde (Abbildung 4-12 A, neg = unstimulierte Zellen). Diese Tabelle beinhaltet 32 von 86 heraufregulierten Genen (komplette Liste alphabetisch sortiert unter Tabelle 7-1a im Anhang zu finden) mit bekannter oder vermuteter Funktion in Entzündungssignalkaskade, Apoptose, Entzündung, Chemoattraktion; Tukey HSD test = 1 (für beide Keime).

## 4.6 Bestätigung der Microarray Analyse mittels quantitativer „real time“-PCR

Die Expression von repräsentativen Genen der in Tabelle 4-1 gefunden Kern-Antwort wurde zunächst über einen Zeitraum von 24 h mittels real-time RT PCR überprüft. Dazu wurden BEAS-2B Zellen mit UV-inaktivierten *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder RSV für die in Abbildung 4-13 angegebene Zeitpunkte stimuliert, RNA aus den Zellen isoliert, und nach erfolgter cDNA Synthese eine quantitative RT-PCR Analyse (SYBR Green) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des „housekeeping“-Gens  $\beta$ -Aktin normalisiert. Anschließend wurde die x-fache Induktion, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten, berechnet.

### 4.6.1 Expression gleichartig regulierter Gene

Zunächst wurde die Expression von Genen überprüft, die von beiden Pathogenen (*Pseudomonas aeruginosa* und RSV) gleichartig reguliert wurden (vgl. Tabelle 4-1). Darunter waren drei Chemokine (IL-8, CCL20 und CXCL3), das mitochondriale Enzym SOD2 (Superoxid-Dismutase 2), welches eukaryote Zellen vor reaktiven Sauerstoffverbindungen schützt, das Integrin ICAM1 (intracellular adhesion molecule 1) und RGS4 (regulator of G-protein signalling 4). RGS4 wurde als einziges von diesen prototypischen Genen im Microarray herunterreguliert. Zunächst zeigte sich, dass die Microarray-Daten bestätigt werden konnten. IL-8, SOD2, ICAM1, CCL20 und CXCL3 wurden auf RSV und *Pseudomonas aeruginosa* Stimulation hin stark exprimiert, RGS4 wurde wie erwartet herunter reguliert. Außerdem war keines dieser Gene durch *S. aureus* reguliert worden. Zusätzlich ließ sich aber erkennen, dass zwei unterschiedliche Expressionsverläufe über die Zeit existierten (IL-8, CCL20 und CXCL3 vs SOD2 und ICAM-1). *Pseudomonas aeruginosa* induzierte IL-8, CCL20 und CXCL3 sehr schnell auf bis zu 40-fache Induktion, allerdings sank die Expression nach 8 h fast auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle (die als 1 normiert wurde, gestrichelte Linie). RSV hingegen induzierte verzögert IL-8, CCL20 und CXCL3, was damit zusammen hängen könnte, dass das Virus erst eine gewisse Zeit benötigte, um die Zellen zu infizieren. Die Expression von SOD2 und ICAM1 dagegen stieg über die Zeit hinweg stetig an, sowohl nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* als auch mit RSV. Die Herunterregulation von RGS4 war ebenfalls für beide Keime zu beobachten.



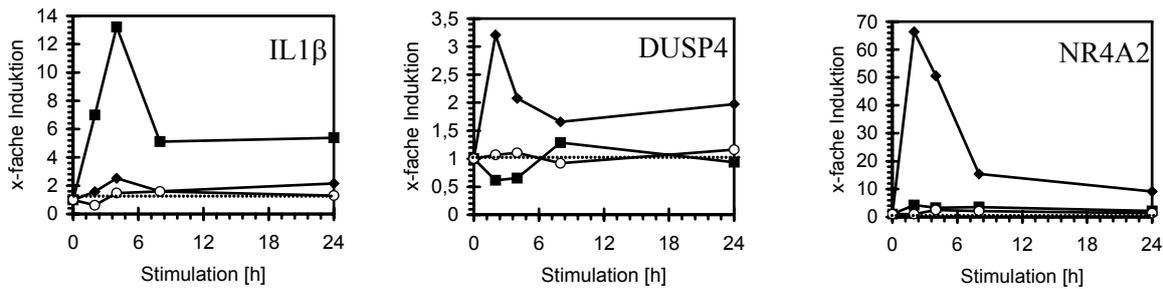
**Abbildung 4-13: Genexpressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR für prototypische Gene der Kernantwort**

◆ RSV  
 ■ P. aerug.  
 ○ S. aureus

Die Expression einiger in der Microarray Analyse identifizierten Gene wurden mittels quantitativer RT-PCR relativ zu  $\beta$ -Aktin bestimmt. Dazu wurden BEAS-2B Zellen für 1 h, 4 h, 8 h und 24 h mit  $10^8$ /ml UV-inaktivierten *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder RSV (MOI 5) stimuliert und RNA isoliert. Aufgetragen ist die x-fache Induktion, die auf die unstimulierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes normiert wurde (gestrichelte Linie: keine Veränderung der Induktion; x-fache Induktion = 1). Gezeigt ist hier eines aus zwei unabhängigen Experimenten.

#### 4.6.2 Expression pathogen-spezifischer Gene

Zur Überprüfung der pathogen-spezifisch regulierten Gene (Anhang: Tabelle 7-1) wurden IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta), ein proinflammatorisches Zytokin, die Phosphatase DUSP4 (dual specificity phosphatase 4) und NR4A2 (nuclear receptor subfamily, group A, member 2) gewählt. DUSP4 hat eine negativ regulierende Funktion im MAP-Kinase Signalweg, NR4A2 fungiert als Transkriptionsfaktor und wurde in Zusammenhang mit der Regulation von Zellzyklus und Apoptose, sowie Entzündungsreaktionen gebracht. IL-1 $\beta$  wurde erwartungsgemäß nur von *Pseudomonas aeruginosa* induziert, was die Arraydaten verifizierte. Die beiden RSV-spezifischen Gene DUSP4 und NR4A2 wurden ausschließlich von RSV reguliert. Alle drei Gene zeigten eine sehr schnelle Induktion und eine ebenfalls schnelle Abnahme des Expressionsniveaus nach 6 bis 8 h. Damit waren die Microarraydaten überprüft und bestätigt worden.



**Abbildung 4-14: Genexpressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR für Pathogen spezifische Gene**

◆ RSV  
 ■ P. aerug.  
 ○ S. aureus

Die Expression relativ zu  $\beta$ -Aktin wurde an einigen exemplarischen Genen nach Stimulation mit  $10^8$ /ml UV-inaktivierten *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder RSV (MOI 5) mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dazu wurden BEAS-2B Zellen für 1 h, 4 h, 8 h und 24 h stimuliert und RNA isoliert. Aufgetragen ist die x-fache Induktion, die auf die unstimulierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes normiert wurde (gestrichelte Linie; keine Veränderung der Induktion; x-fache Induktion = 1). Gezeigt ist hier eines aus zwei unabhängigen Experimenten.

#### 4.7 Homöostase im Mikromilieu „Bronchiale Grenzfläche“

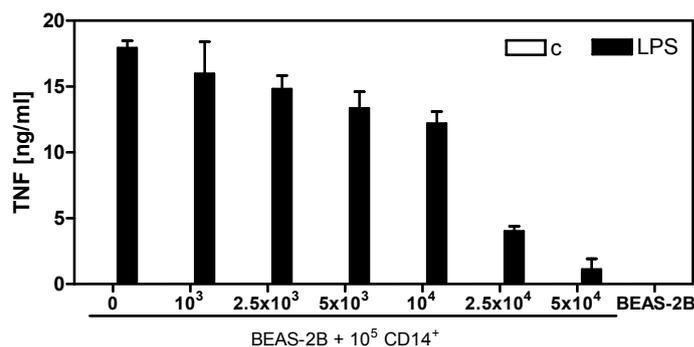
Das angeborene Immunsystem mit seinen keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRR) kann nicht zwischen symbiontischen bzw. kommensalen oder pathogenen Keime unterscheiden, da beide die gleichen molekularen Strukturen, die als Liganden für die PRRs fungieren, besitzen. Stimulation von TLRs führt über eine inflammatorische Signalkaskade zu einer Entzündungsreaktion, die das adaptive Immunsystem zu einer spezifischen Immunantwort aktiviert. Dieses Szenario ist vor allem in sterilen Kompartimenten (z.B. im Blut) oder Organen (wie der Milz) zutreffend. Jedoch kann damit nicht erklärt werden, wie das angeborene Immunsystem in Organen funktioniert, in denen regelhafter Kontakt mit Mikroben stattfindet (wie Haut, Lunge und Darm). Würden sich diese Organe in der Abwehrfunktion wie die Milz oder das Blut verhalten, so hätte dies eine schwerwiegende Störung der Barrierefunktionen und ständige Inflammation zur Folge. Somit müssen unterschiedliche Abwehrmechanismen für verschiedene Kompartimente existieren, bzw. spezifische Kontrollmechanismen für mukosale Oberflächen bestehen. In sterilen Kompartimenten wird das angeborene Immunsystem aktiviert, um durch Induktion von Entzündungsreaktionen die Sterilität aufrecht zu erhalten. In semi-sterilen Kompartimenten, wie den Alveolen der Lunge, muss das angeborene Immunsystem straff reguliert werden, um chronische Entzündung und Dysfunktion der Epithelbarriere zu vermeiden. In einem nicht-sterilen Kompartiment, wie dem Darm, muss es zu einer Koexistenz zwischen angeborenem Immunsystem und residenter Flora kommen, um letztlich Dysfunktionen durch chronische Entzündungsprozesse zu umgehen und um Homöostase zu gewährleisten (Raz, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auf Seiten der bronchialen Epithelzellen zu einer Regulation von TLR2 und dem Korezeptor CD36 kommt, was zu einer Hyporesponsivität gegenüber gram-positiven Keimen und Liganden führt. Es sollte weiterführend untersucht werden, ob und wie das Mikromilieu in bronchialen Atemwegen die Reaktionsfähigkeit von professionellen Immunzellen auf mikrobielle Stimulation hin verändert. Zusätzlich sollte

analysiert werden, ob Immunreaktionen von Monozyten, Dendritischen Zellen und T-Zellen durch Epithelzellen moduliert werden. Die folgenden Untersuchungen sollten Aufschluss geben über die Regulation von Immunreaktionen und Immuntoleranz im Mikromilieu „bronchiale Grenzfläche“.

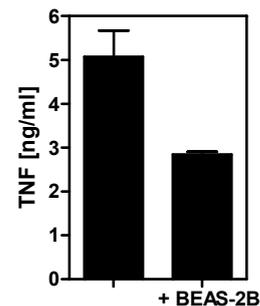
#### 4.7.1 Homöostatische Inhibition professioneller Immunzellen durch bronchiale Epithelzellen

Aus der Literatur waren Vorbefunde bekannt, die zeigten, dass es vor allem im Darm zu einer Beeinflussung von Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen durch das intestinale Epithel kommt. Dies führt dazu, dass DCs weniger IL-12 freisetzen und die Polarisierung der T-Zell Antwort hin zu einer  $T_{H2}$  Antwort fördern (Rimoldi et al., 2005; Smythies et al., 2005). Auch für die Lunge wurde bereits ein Mikromilieu diskutiert, bei dem ebenfalls die Epithelzellen eine Art „anti-inflammatorische-Umgebung“ für professionelle Immunzellen schaffen, was massgeblich zur Homöostase in der Lunge beitragen soll (Bingisser and Holt, 2001; Takabayshi et al., 2006). Um einen möglichen Einfluss von Epithelien auf Zellen des angeborenen Immunsystems zu untersuchen, wurden BEAS-2B Zellen mit  $CD14^+$  Monozyten koinkubiert (Abbildung 4-15 A).

A



B



**Abbildung 4-15: Inhibition der TNF Sekretion von  $CD14^+$  Zellen durch bronchiale Epithelzellen**

(A) BEAS-2B wurden in den angegebenen Zellzahlen in eine 96-well Platte ausgebracht, am nächsten Tag  $1 \times 10^5$   $CD14^+$  Zellen hinzugegeben und mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Die TNF Freisetzung wurde mittels ELISA bestimmt (Mittelwert + SD, eines aus drei Experimenten). (B)  $2 \times 10^5$   $CD14^+$  Zellen wurden in einem Transwelleinsatz in An- oder Abwesenheit von  $1 \times 10^5$  BEAS-2B im unteren Kompartiment (24-well) über Nacht koinkubiert und mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die TNF Sekretion wurde im ELISA detektiert (Mittelwert + SD, ein aus drei Experimenten).

Dabei wurden BEAS-2B in ansteigender Zellzahl in die Vertiefungen einer 96-well Platte ausgebracht, dazu wurden  $1 \times 10^5$   $CD14^+$  Zellen hinzugegeben und mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Es wurde die TNF-Freisetzung im ELISA gemessen, da TNF ein prototypisches Zytokin von Monozyten ist. BEAS-2B Zellen hingegen waren nicht in der Lage, TNF zu bilden. Dabei zeigte sich, dass BEAS-2B Zellen in der Lage waren, die TNF-Freisetzung der Monozyten deutlich zu inhibieren, wobei die Inhibition mit ansteigender Epithelzellzahl zunahm. Um zu differenzieren, ob bei diesem Phänomen Zell-Zell-Kontakte essentiell sind oder ob die Inhibition durch einen löslichen Faktor vermittelt wird, wurden  $CD14^+$  Zellen und BEAS-2B in einem Transwellsystem kokultiviert (B). Dabei wurden zuerst

BEAS-2B Zellen in das untere Kompartiment gegeben, danach die CD14<sup>+</sup> Zellen in den Transwelleinsatz pipettiert und mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Es zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt auf die TNF Freisetzung von CD14<sup>+</sup> Zellen auch in einem Transwellssystem zu erreichen ist. Die Hemmung war im Transwellssystem etwas schwächer ausgeprägt, was daran liegen könnte, dass Abstand zwischen den unterschiedlichen Zelltypen für einen löslichen Faktor in einem Transwellssystem wesentlich größer ist, als in einem Koinkubationsansatz.

#### 4.7.2 Dauer der Konditionierung von Epithelzell-Überstand ist entscheidend für die Inhibitionseffizienz

Nachdem das Transwellexperiment einen deutlichen Hinweis für einen löslichen Faktor geliefert hatte, wurde die Inhibitionseffizienz von epitheliale Überstand in Abhängigkeit der Expositionszeit des Mediums mit den Zellen untersucht. Dazu wurden BEAS-2B Zellen ausgesät, nach verschiedenen Zeitpunkten der Überstand abgenommen und zu 50% (vol/vol) auf CD14<sup>+</sup> Monozyten gegeben, die anschließend noch mit LPS stimuliert wurden. Die Überstand vermittelte TNF Inhibition war am deutlichsten mit 48 h altem Überstand. Dies lässt darauf schließen, dass sich ein konstitutiv sezernierter, inhibitorischer Faktor vermutlich erst anreichern muss (Abbildung 4-16). Das könnte auch erklären, weshalb die Hemmung im Transwellansatz nach 24 h (Abbildung 4-15 B) nicht so effizient ausfiel, wie in den folgenden Experimenten mit 48 h-konditioniertem Überstand.

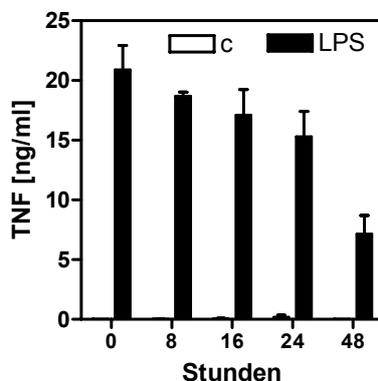


Abbildung 4-16: Zeitabhängigkeit der Inhibitionseffizienz des epithelialen Überstandes

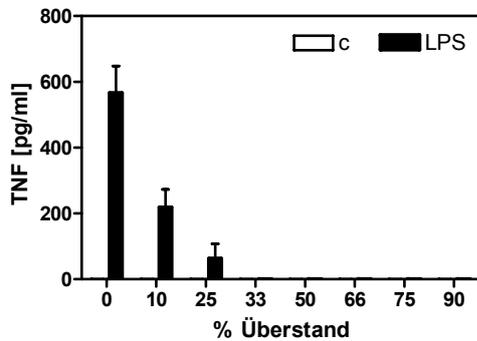
2,5 x 10<sup>4</sup> BEAS-2B wurden in 96-well Platten ausgesät, nach den angegebenen Zeitpunkten der Überstand abgenommen und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde zu 50% (vol/vol) auf 1 x 10<sup>5</sup> CD14<sup>+</sup> Zellen hinzugegeben und mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Die TNF Freisetzung wurde mittels ELISA analysiert (Mittelwert + SD).

#### 4.7.3 Abhängigkeit der Inhibition von der Konzentration des Epithelzell-Überstandes

Epithelzell konditionierter 48 h Überstand wurde dann in weiteren Experimenten in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 90% vol/vol) auf professionelle Immunzellen gegeben. Es wurden CD14<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 4-17 A) und DCs analysiert (Abbildung 4-17 B). Zunächst zeigte sich bei beiden Zelltypen eine konzentrationsabhängige Inhibitionskurve. Je mehr Überstand eingesetzt wurde, desto stärker war der inhibitorische Effekt. Allerdings fiel auf, dass CD14<sup>+</sup> Zellen wesentlich sensibler reagierten als Dendritische Zellen, bei denen der max. Hemmeffekt erst bei 90% Überstand eintrat. Bei den Zellen gab es außerdem spenderabhängige Effekte. In Abbildung 4-17 A ist ein Spender von drei gezeigt, bei dem der Überstand besonders effektiv die Zytokinfreisetzung hemmte. In Abbildung

4-17 B war die Induktion von IL-12p40 von drei Spendern gemittelt. Der Überstand selbst enthält keine aktivierenden Komponenten, wie die unstimulierten Kontrollen (c) zeigten.

A



B

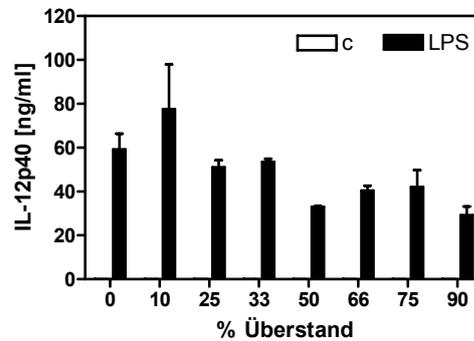


Abbildung 4-17: Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes auf CD14<sup>+</sup> Zellen und DCs

(A) 48 h alter Epithelzell-Überstand wurde in den angegebenen Konzentrationen auf  $1 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> Zellen zugegeben und mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Die TNF Freisetzung wurde mittels ELISA bestimmt (Mittelwert + SD, einer aus drei Spendern). (B)  $1 \times 10^5$  DCs wurden mit 48 h altem Überstand in den angegebenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben und diese mit 30 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Die IL-12p40 Freisetzung wurde mittels ELISA gemessen und (Mittelwert + SD, einer aus drei Spendern).

#### 4.7.4 Die Inhibition professioneller Immunzellen ist spezifisch für Epithelzellen

Um die Spezifität des Inhibitionseffektes zu überprüfen, wurden Überstände aus Zellen unterschiedlicher embryonaler Herkunft hergestellt (respiratorische Epithelzellen: endodermal; Fibroblasten und Blutzellen: mesodermal). Als Kontroll-Überstände dienten Überstände von HEK293 Zellen und aufgereinigten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). HEK293 ist eine humane Fibroblastenzelllinie, die aus embryonalen Nieren gewonnen wurde und nicht als Immunzellen agieren. PBMCs sind humane, mononukleäre Zellen aus dem Blut, die vor allem Lymphozyten und Monozyten enthalten, die üblicherweise als professionelle Immunzellen bezeichnet werden. Diese zwei unterschiedlichen Zelltypen wurden für die Generation von Kontrollüberständen verwendet. Epithelzell-Überstand wurde aus BEAS-2B und IHAEo<sup>-</sup> generiert. Die unterschiedlichen Überstände wurden zu 50% (vol/vol) zu  $1 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> Zellen gegeben und diese über Nacht mit LPS stimuliert. Abbildung 4-18 zeigt, dass die inhibitorische Wirkung speziell von Epithelzell-Überständen erzielt wurde und nicht von Überständen der anderen getesteten Zelltypen.

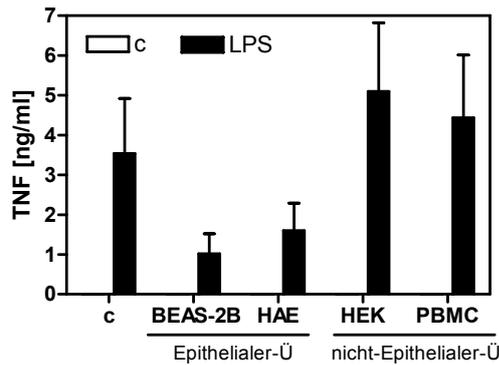
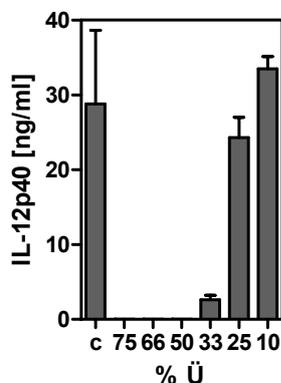


Abbildung 4-18: Spezifität des epithelialen Überstandes

$1 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> wurden je Vertiefung in eine 96-well Platte ausgesät, mit 50% (vol/vol) 48 h-konditionierter Epithelzell-Überstand inkubiert und mit 10 ng/ml über Nacht in Duplikaten stimuliert. Es wurden 48 h Überstände unterschiedlicher Zellen generiert. Dazu wurden  $2.5 \times 10^4$  BEAS-2B bzw. HAE Zellen in 96-well Platten ausgebracht und nach 48 h wurde zellfreier Überstand abgenommen. Überstand von HEK293 Zellen und PBMCs wurde durch Ausbringen von  $6 \times 10^4$  bzw.  $10^5$  Zellen pro well hergestellt. Die Zytokinfreisetzung wurde mittels ELISA vermessen (c = Kontrolle, Ü = Überstand, Mittelwert + SD, n = 2 Experimente).

Um diesen Effekt noch in einem anderen System zu verifizieren, wurde die Isolation und Kultur primärer muriner trachealer Epithelzellen nach einem bestehenden Protokoll etabliert (Davidson et al., 2000). Zur Charakterisierung der Epithelzellen wurde der trans epitheliale Widerstand gemessen und die Zellen immunhistochemisch untersucht (siehe 4.9.1 und Abbildung 4-32). Die so charakterisierten Epithelzellen wurden dazu verwendet, Überstand zu generieren. Dazu wurden „Air-liquid-Interface-Kulturen“ (ALI) hergestellt. In das Transwell-Kompartiment wurden 200 µl Culture-Medium gegeben und für 24 h mit Epithelzellen inkubiert. Im unteren Kompartiment befanden sich 600 µl Medium, welches nicht als Überstand entnommen wurde. Der Überstand wurde in den in Abbildung 4-19 angegebenen prozentualen Anteilen auf murine BMDDCs (Knochenmarksgenerierte DCs) gegeben, die dann mit 100 ng/ml LPS über Nacht stimuliert wurden. Es zeigte sich, dass primäre murine Epithelzellen in der Lage waren, in den Überstand einen Faktor zu sezernieren, der effizient und konzentrationsabhängig die TNF und IL-12p40 Sekretion von BMDDCs inhibieren konnte. Zusätzlich fiel auf, dass im Vergleich zu humanen DCs, die IL-12p40 Sekretion in DCs suffizienter gehemmt werden konnte. Primäre Epithelzellen scheinen den inhibitorischen Faktor konstitutiv stärker sezernieren zu können, als die verwendeten Zelllinien. Das geht einher mit der Tatsache, dass muriner Überstand bereits nach 24 h ausreichend inhibitorisch wirkte.

A



B

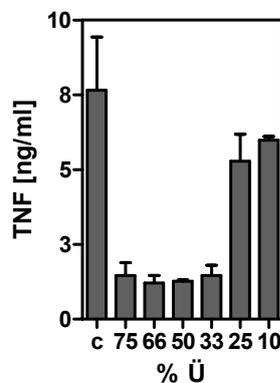


Abbildung 4-19: Überstand von murinen primären Epithelzellen hemmt BMDDCs

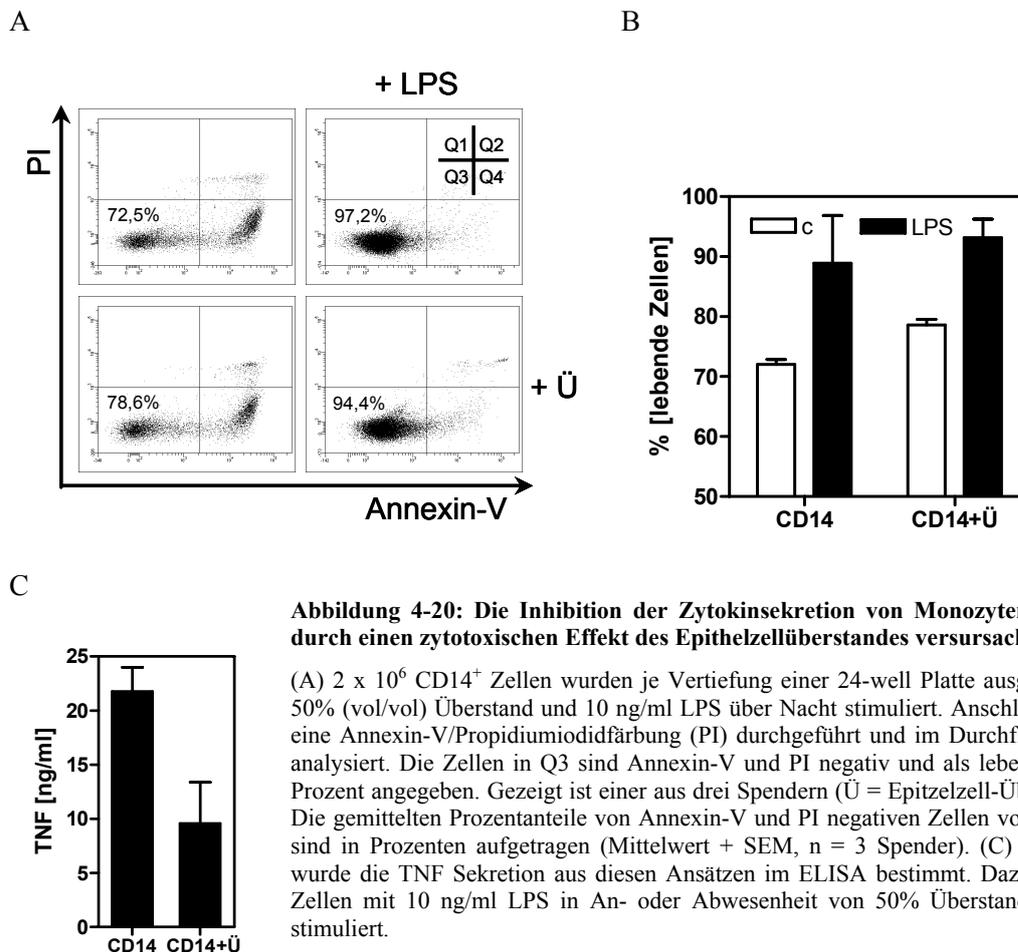
$2 \times 10^5$  BMDDCs wurden je Vertiefung einer 96-well Platte ausgesät und mit den angegebenen Mengen an 24 h altem primären Überstand aus murinen „Air-liquid-interface“ (ALI)-Kulturen inkubiert und mit 100 ng/ml über Nacht in Triplikaten stimuliert. Die Zytokinfreisetzung wurde in zellfreiem Überstand mittels ELISA vermessen (c = Kontrolle, Ü = Überstand, MW+SD, eins aus 3 Experimenten).

#### 4.7.5 Charakterisierung funktioneller Veränderungen professioneller Immunzellen in Anwesenheit von epitheliale Überstand

Bisher konnte der Einfluss des generierten epithelialen Überstandes auf die Zytokinfreisetzung von Monozyten und Dendritischen Zellen gezeigt werden. Weiter sollte untersucht werden, ob und wie der Epithelzellüberstand auf die Funktion (Phagozytoseaktivität und Regulation von kostimulatorischen Molekülen) von professionellen Immunzellen einwirken kann.

##### 4.7.5.1 Epithelzell-Überstand wirkt nicht zytotoxisch

Um auszuschließen, dass der inhibitorische Effekt des Überstandes die Folge einer zytotoxischen Wirkung auf Zellen des angeborenen Immunsystems ist, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit CD14<sup>+</sup> Zellen durchgeführt. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup> Zellen mit 50% Überstand und 10 ng/ml LPS über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände für ELISA-Messungen entnommen und die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und Annexin-V gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

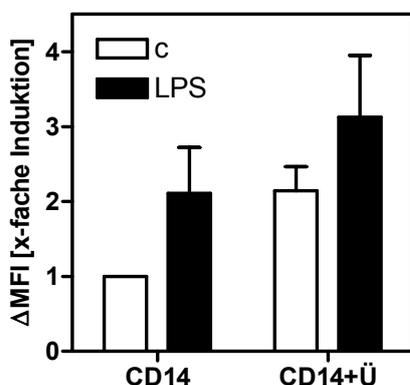


Die „dot-plot“ Darstellung (Abbildung 4-20 A) zeigt einen von drei Spendern. Es zeigte sich, dass nach LPS Stimulation mehr vitale Zellen (Q3 = 97,2% PI negativ/Annexin-V negativ) als bei der unstimulierten Kontrolle (72,5%) zu finden waren. Der epitheliale Überstand selbst hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen, umgekehrt wirkte er aber auch keineswegs zytotoxisch (78,6%). Überstand kombiniert mit LPS Stimulation führte zum Überleben von 94,4% der Zellen, was

ungefähr der LPS Stimulation in Abwesenheit von Überstand entsprach. In Abbildung 4-20 B sind die Mittelwerte der Ergebnisse dreier Spender dargestellt. Dazu wurden die Anteile an lebenden Zellen (PI negativ/Annexin-V negativ) der jeweiligen Spender gemittelt. Damit ist zu schließen, dass der negative Einfluss auf die TNF Sekretion (Abbildung 4-20 C) nicht auf einen zytotoxischen Effekt des Überstandes zurückzuführen ist.

#### 4.7.6 Phagozytotische Aktivität von Monozyten ist durch Epithelzellen nicht beeinflusst

Monozyten entwickeln sich nach Übertritt von Blut in Gewebe zu ortsständigen Makrophagen, die eine Überwachungsfunktion wahrnehmen. Makrophagen haben vielfältige Funktionen, insbesondere gehört dazu die Phagozytose, um Mikroben zu eliminieren und deren Antigene zu präsentieren. Bei der Phagozytose handelt es sich um einen energieverbrauchenden, Aktin-abhängigen Internalisierungsprozess von Partikeln. Zur Testung der Phagozytoseaktivität von Monozyten wurde ein Phagozytose-Assay mit Latex-Kügelchen benutzt. Um eine eventuelle Änderung der Funktion von Monozyten in Anwesenheit von Überstand zu überprüfen, wurden  $CD14^+$  Zellen in An- oder Abwesenheit von epithelalem Überstand mit LPS über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde bei  $37^{\circ}C$  für 45 min mit FITC-markierten Latex-Kügelchen inkubiert, die andere Hälfte bei  $4^{\circ}C$ . Bei  $4^{\circ}C$  kommen energieverbrauchende Prozesse zum Erliegen, daher kann keine Phagozytose stattfinden. Die Phagozytoseaktivität bei  $4^{\circ}C$  diente somit als Kontrolle. Nach Inkubation mit den Latex-Kügelchen wurden die Zellen im Durchflusszytometer bezüglich der FITC-Expression analysiert. Es wurde  $\Delta MFI$  ( $= MFI_{37^{\circ}C} - MFI_{4^{\circ}C}$ ) berechnet, die unstimulierte Kontrolle ohne Überstand auf 1 normiert (um Spendervarianzen einzubeziehen) und die x-fache Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bestimmt. Wie in Abbildung 4-21 ersichtlich, erhöhte die Stimulation mit LPS die Phagozytosekapazität von  $CD14^+$  Zellen (2,11 fache Induktion  $\pm$  0,61 SEM). Überstand ohne zusätzlichen Stimulus führte bereits zu einer erhöhten Aktivität (2,14  $\pm$  0,32), was mit LPS zusätzlich gesteigert werden konnte (3,12  $\pm$  0,82). Somit hatte der Epithelzell-Überstand keine hemmende Wirkung bezüglich der phagozytotischen Aktivität, sondern einen geringfügig aktivierenden Einfluss.



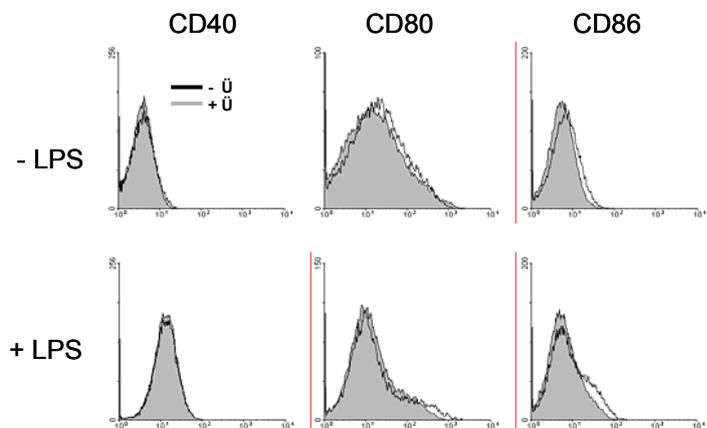
**Abbildung 4-21: Phagozytoseaktivität von Monozyten ist nicht durch Epithelzell-Überstand inhibiert**

$2 \times 10^6$   $CD14^+$  Zellen wurden je Vertiefung in eine 24-well Platte ausgesät und mit 50% (vol/vol) Epithelzell-Überstand (= Ü) und 10 ng/ml LPS über Nacht inkubiert. Ein Phagozytose-Assay mit FITC-markierten Latex-Kügelchen ( $1,0 \mu m$ ; 45 min) wurde durchgeführt und im Durchflusszytometer analysiert. Es wurde  $\Delta MFI$  ( $= MFI_{37^{\circ}C} - MFI_{4^{\circ}C}$ ) berechnet und die unstimulierte Kontrolle ohne Überstand auf 1 gesetzt. Aufgetragen ist die x-fache Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 3$  Spender; Ü = Überstand).

#### 4.7.7 Einfluss von epithelialem Überstand auf die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf professionellen Immunzellen

##### 4.7.7.1 Humaner Epithelzell-Überstand hat keine Auswirkung auf die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf Monozyten

Kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD40, CD80 und CD86 sind neben der Antigenpräsentation notwendig für die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen. Diese Aktivierungsmarker sind auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) nach inflammatorischer Reifung exprimiert. Zur Analyse der Regulation kostimulatorischer Moleküle wurden im humanen System CD14<sup>+</sup> Monozyten und im murinen System BMDDCs verwendet, um die Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation mit oder ohne epithelialem Überstand zu untersuchen. Abbildung 4-22 zeigt Histogramme von CD14<sup>+</sup> Zellen ohne Stimulation (obere Reihe) und nach Stimulation mit LPS (untere Reihe). Die in Anwesenheit von Überstand stimulierten Zellen sind durch grau unterlegte Histogramme gezeigt. CD40 zeigte eine deutliche Heraufregulation nach LPS Stimulation, was aber durch den Überstand unbeeinflusst blieb. CD80 hingegen zeigte nur eine geringfügig verstärkte Aktivierung nach Stimulation mit LPS. CD86 war im Beobachtungszeitraum unreguliert. Möglicherweise war mit 18 h für die Analyse der Regulation von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen nicht der optimale Zeitpunkt gewählt worden. Bei allen Oberflächenmarkern jedoch hatte der Überstand keinerlei Einfluss, sodass geschlossen wurde, dass in humanen CD14<sup>+</sup> Zellen die Regulation der Oberflächenmoleküle nicht durch Überstand beeinflusst wird.



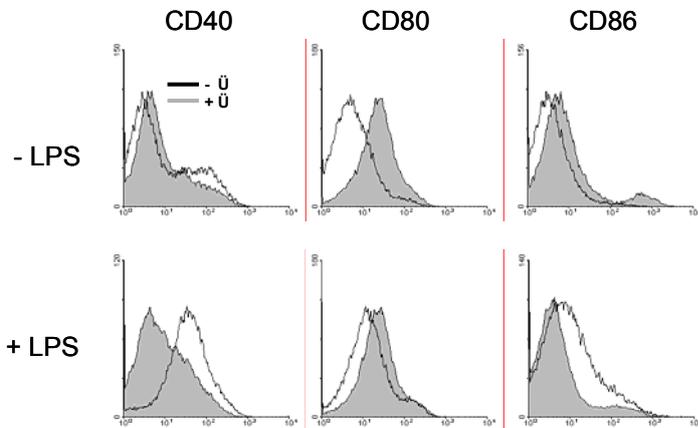
**Abbildung 4-22: Humaner Epithelzell-Überstand hat keine Auswirkung auf kostimulatorische Oberflächenmoleküle in Monozyten**

2 x 10<sup>6</sup> CD14<sup>+</sup> Zellen wurden je Vertiefung in eine 24-well Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml LPS für 18 h in An- oder Abwesenheit von 50% (vol/vol) epithelialem Überstand stimuliert (schwarze Linie – ohne Überstand; grau gefüllte Histogramme – mit Überstand). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD40, CD80 und CD86 untersucht. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (- LPS).

##### 4.7.7.2 Muriner Epithelzell-Überstand beeinflusst die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf BMDDCs

In Abbildung 4-23 sind Untersuchungen zum Einfluss des primären epithelialen Überstandes auf die Regulation von Oberflächenmolekülen in murinen BMDDCs dargestellt. In murinen DCs war die Regulation nach LPS Stimulation sehr viel deutlicher, wie für reife DCs beschrieben. Die Regulation von CD40 in stimulierten Zellen ohne Überstand (schwarze Linie) war deutlich sichtbar. Durch die Zugabe von Überstand aus ALI-Kulturen von primären Epithelzellen (grau unterlegtes Histogramm)

wurde die Heraufregulation von CD40 erheblich inhibiert. CD80 wurde ebenfalls nach Stimulation induziert, allerdings hatte hier der Überstand keine inhibitorische Wirkung, sondern wirkte stimulatив, wobei die basale Proteinexpression bereits bei unstimulierten Zellen erhöht war. Die Regulation von CD86 entsprach im Wesentlichen der von CD40. Nach Aktivierung durch LPS war die Expression gesteigert, worauf der Überstand einen hemmenden Effekt ausübte.



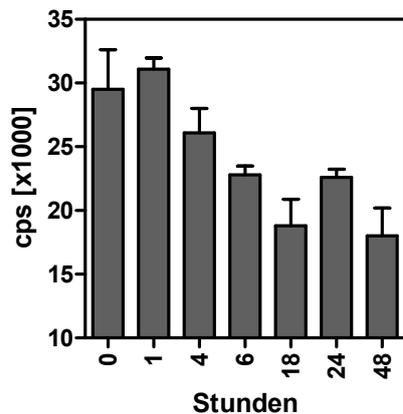
**Abbildung 4-23: Muriner Epithelzell-Überstand inhibiert die LPS induzierte Expression von Oberflächenmolekülen auf BMDDCs**

Je Vertiefung wurden  $2 \times 10^5$  BMDDCs in Triplikaten in eine 96-well Platte ausgesät und mit 100 ng/ml LPS für 18 h in An- oder Abwesenheit von 50% (vol/vol) 24 h konditioniert primären Überstand aus ALI-Kulturen stimuliert (schwarze Linie – ohne Überstand; grau gefüllte Histogramme – mit Überstand). Dann wurden die Überstände für ELISA Analysen abgenommen, die Zellen aus den Triplikaten entnommen und gemischt. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD40, CD80 und CD86 untersucht. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (- LPS).

#### 4.7.8 Epithelzell-Überstand inhibiert die DC-abhängige Induktion von T-Zell-Proliferation

Eine wichtige Aufgabe antigenpräsentierender Zellen ist die Aktivierung von Lymphozyten, die dann zu Effektorzellen oder zu Gedächtniszellen reifen. Für die Aktivierung von Lymphozyten werden zwei unterschiedliche Signale benötigt. Das Primärsignal erhält die T-Zelle durch die Antigenpräsentation einer APC über den MHC I/II-Komplex, der mit dem T-Zell Rezeptor interagiert. Das Sekundärsignal wird über kostimulatorische Moleküle vermittelt (CD80/CD86), die mit CD28 interagieren, was letztlich die T-Zelle zur Proliferation anregt. Aufbauend auf dem vorherigen Versuch sollte jetzt untersucht werden, ob DCs durch bronchiale Epithelzellen bzw. Epithelzell-Überstand bei der Induktion von T-Zell Proliferation Veränderungen aufwiesen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob es eine Rolle spielt, wie lange DCs mit dem epithelialen Überstand konditioniert wurden. Dazu wurden DCs und T-Zellen (im Verhältnis 1:10) in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) zusammen getestet. Die DCs wurden zuvor unterschiedlich lange (1 bis 48 h) mit epithelalem Überstand vorinkubiert, dreimal sorgfältig gewaschen, um den Epithelzell-Überstand zu entfernen und schließlich zu den CD3<sup>+</sup>-aufgereinigten T-Zellen eines allogenen Spenders gegeben. Die Proliferationsrate wurde nach 96 h mit Hilfe des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin während der Replikation der T-Zellen radiometrisch ermittelt. In Abbildung 4-24 ist gezeigt, dass DCs, die mit bronchialen Überstand inkubiert wurden, sich so verändert hatten, dass sie schlechter in der Lage waren, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Zusätzlich zeigte sich auch, dass die Dauer der Konditionierung zwischen DCs und bronchialen Epithelzellüberstand entscheidend war für die verminderte

Proliferationsinduktion durch DCs. Nach 48 stündiger Vorinkubation von DCs mit epitheliale Überstand war die geringste Induktion der Proliferationsrate von T-Zellen zu beobachten.



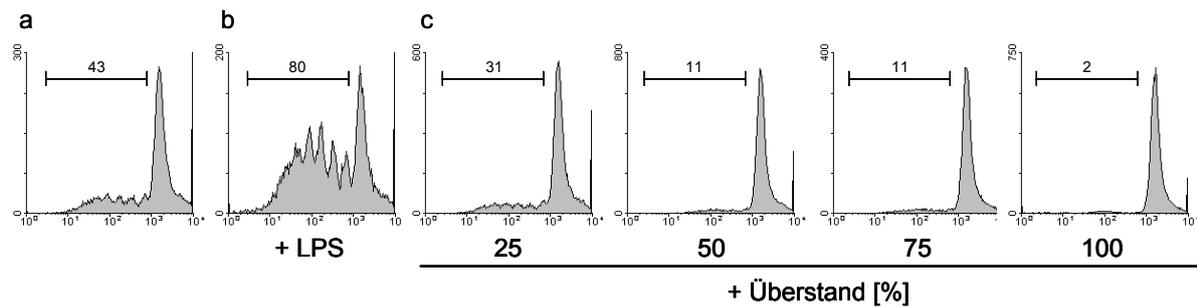
**Abbildung 4-24: Epithelzell-konditionierte DCs induzieren eine schwächere T-Zellproliferation**

$1 \times 10^4$  DCs wurden wie angegeben mit 50% (vol/vol) epitheliale Überstand vorinkubiert (0-48 h; 96-well Platte) und dreimal sorgfältig gewaschen. Dann wurden  $1 \times 10^5$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen eines allogenen Spenders hinzugegeben, nach 96 h mit 22,5 kBq <sup>3</sup>H-Thymidin gepulst und nach weiteren 18 h wurde die T-Zell Proliferationsrate im Szintillations-Messgerät bestimmt (cps = counts per second; MW+SEM, n = 3 Spender).

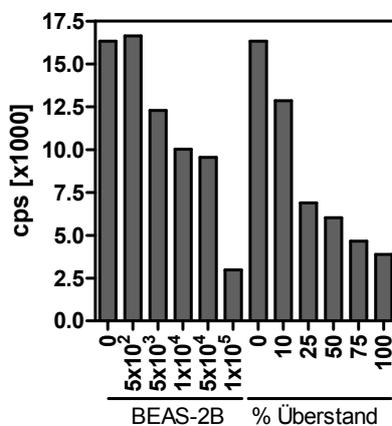
Um die Ergebnisse mit einem alternativen Test zu bestätigen, wurden T-Zellen mit CFSE markiert und die Teilung durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden DCs mit CFSE-markierten T-Zellen in Anwesenheit von 25 – 100% (vol/vol) Überstand für 96 Stunden inkubiert und die Proliferationsraten im Durchflusszytometer analysiert. In Abbildung 4-25 A (a) sind T-Zellen mit DCs dargestellt. DC Zugabe führte dazu, dass sich in unbehandelten Kulturen 43% der T-Zellen teilten. Wurden die DCs zuvor mit LPS aktiviert, so waren sie verstärkt in der Lage (80%), Proliferation zu induzieren (b). Inkubierte man DCs mit Lymphozyten in Anwesenheit von epitheliale Überstand, so inhibierte dieser die T-Zellproliferation (c). 25% (vol/vol) Überstand führte dazu, dass die Proliferation von 43% auf 31% reduziert wurde. Wurde der Überstand zu 50% (vol/vol) eingesetzt wurde die Teilungsrate auf 11% gesenkt, die mit 100% (vol/vol) Überstand nur noch 2% betrug. Die deutlich stärkere Inhibition in diesem Versuchsansatz (verglichen mit Abbildung 4-24) deutete darauf hin, dass Epithelzell-Überstand zusätzlich T-Zellen direkt beeinflussen kann.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde ein Proliferationsassay, bei dem der <sup>3</sup>H-Thymidin Einbau von T-Zellen während der Replikation detektiert wurde, durchgeführt. Zusätzlich wurden auch Epithelzellen mit APCs und Lymphozyten kokultiviert. Auch in diesem Ansatz wurde die Proliferationsrate der T-Zellen deutlich vermindert (Abbildung 4-25 B). Auffällig war, dass die Inhibition in der gemischten Leukozyten Reaktion, bei der der Überstand die ganze Zeit über anwesend war (somit auf DCs und T-Zellen wirken konnte), wesentlich deutlicher ausgeprägt war, als in Abbildung 4-24, bei der der Überstand nur auf die DCs selbst wirken konnte.

A



B

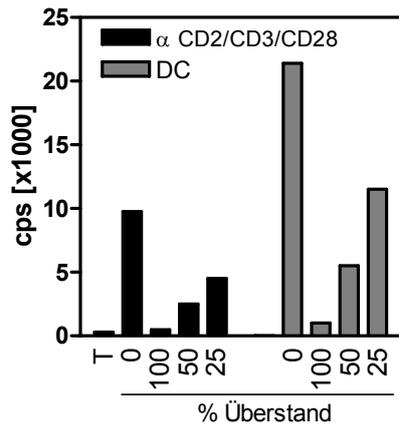


**Abbildung 4-25: Epithelzell-Überstand inhibiert die DC induzierte Proliferation von T-Zellen**

(A)  $2 \times 10^4$  DCs wurden mit  $2 \times 10^5$   $CD3^+$  sortierten T-Zellen, die zuvor CFSE markiert wurden, in Duplikaten in einer 96-well Platte inkubiert (a). Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit LPS (b). Außerdem wurden DCs und T-Zellen in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen an Überstand inkubiert (c). Nach 96 h wurden die Zellen gemischt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Zahlen geben jeweils die positiven Zellen (%) in der angegebenen Region an. (B) Es wurden  $1 \times 10^4$  DCs mit  $1 \times 10^5$  T-Zellen in 96-wells koinkubiert und BEAS-2B Zellen oder Überstand in den angegebenen Mengen zugegeben. Proliferation wurde nach 96 h mit Hilfe des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin während der Replikation der T-Zellen radiometrisch ermittelt. Nach 96-stündiger Koinkubation wurden die Zellen mit 22,5 kBq  $^3\text{H}$ -Thymidin gepulst und nach weiteren 18 h im Szintillations-Messgerät detektiert (cps = counts per second, eines aus drei Experimenten).

#### 4.7.9 T-Zellen werden durch Epithelzell-Überstand unmittelbar gehemmt

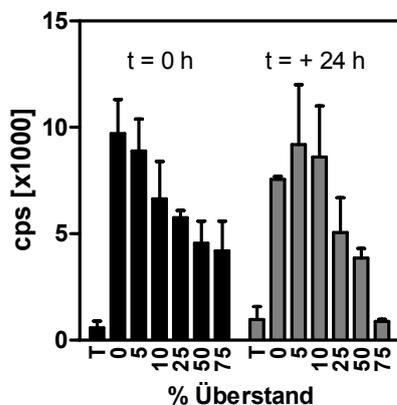
Um zu ermitteln, ob der epitheliale Überstand einen, von der DC Stimulation unabhängigen, Effekt auf die T-Zellen ausübt, wurden T-Zellen auf unterschiedliche Arten aktiviert. T-Zellen wurden entweder DC unabhängig aktiviert, indem diese mit Antikörper-gekoppelten Kügelchen inkubiert wurden, die gegen CD3, CD2 und CD28 gerichtet waren, oder klassisch mit DCs. Zusätzlich wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an Überstand versetzt und die Proliferation nach 96 Stunden gemessen (Abbildung 4-26). Es zeigte sich, dass sowohl auf die DC-aktivierten T-Zellen als auch auf die DC-unabhängig aktivierten T-Zellen ( $\alpha\text{CD2/CD3/CD28}$ ) der Überstand eine inhibitorische Wirkung hatte. Somit konnte festgestellt werden, dass der epitheliale Überstand sowohl auf DCs, als auch auf T-Zellen wirken konnte. Zum einen konnte der Epithelzell-Überstand die DCs dahingehend verändern, dass sie weniger in der Lage waren T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Abbildung 4-24). Zum anderen wirkte dieser auch auf die T-Zellen direkt inhibitorisch (Abbildung 4-26).



**Abbildung 4-26: Epithelialer Überstand inhibiert die Proliferation von T-Zellen direkt**

(A)  $1 \times 10^5$  T-Zellen wurden entweder mit  $1 \mu\text{l}$  der CD2/CD3/CD28-gekoppelten Kügelchen des T Cell Activation/Expansion Kits oder  $1 \times 10^4$  DCs für 96 h inkubiert. Zusätzlich wurde noch Überstand in den angegebenen Mengen hinzugegeben. Proliferation wurde nach 96 h mit Hilfe des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin während der Replikation der T-Zellen radiometrisch ermittelt. Nach 96-stündiger Koinkubation wurden die Zellen mit  $22,5 \text{ kBq } ^3\text{H}$ -Thymidin gepulst und nach weiteren 18 h im Szintillations-Messgerät detektiert (cps = counts per second, T = T-Zellen ohne Aktivierung; eines aus zwei Experimenten).

Zusätzlich wurde die Frage untersucht, ob der epitheliale Überstand auch eine bereits proliferierende T-Zellkultur hemmen kann. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  PBMCs (entspricht ca.  $1 - 2 \times 10^5$  T-Zellen) in die Vertiefungen einer 96-well Platte ausgebracht und mit den CD2/CD3/CD28-gekoppelten Kügelchen des „T Cell Activation/Expansion Kits“ aktiviert. Außerdem wurde gleichzeitig, oder 24 h später, in die bereits proliferierende Kultur Epithelzell-Überstand in den angegebenen Mengen hinzugegeben und nach 96 h die Proliferationsraten von T-Zellen mittels Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin im Szintillations-Messgerät bestimmt. Überraschenderweise konnte der Überstand auch 24 h nach erfolgter Aktivierung die T-Zell Proliferation noch inhibitorisch beeinträchtigen (Abbildung 4-27).



**Abbildung 4-27: Humaner Überstand inhibiert bereits proliferierende T-Zellen**

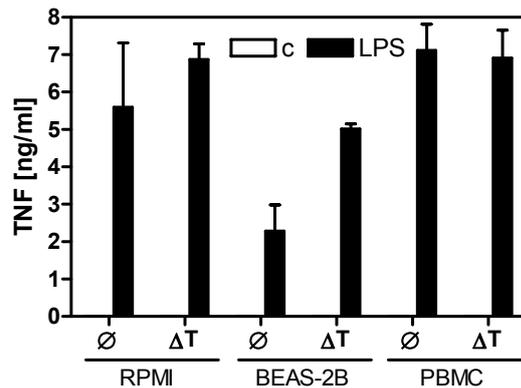
$1 \times 10^6$  PBMCs wurden mit  $1 \mu\text{l}$  der CD2/CD3/CD28-gekoppelten Kügelchen des „T Cell Activation/Expansion Kits“ in einer 96-well Platte inkubiert. Zusätzlich wurde sofort ( $t = 0 \text{ h}$ ) oder 24 h später ( $t = + 24 \text{ h}$ ) humaner Epithelzellüberstand in den angegebenen Mengen hinzugegeben und die Zellen für weitere 72 h inkubiert. Die Proliferationsrate der T-Zellen wurde mit Hilfe des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin während der Replikation radiometrisch ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit  $22,5 \text{ kBq } ^3\text{H}$ -Thymidin gepulst und nach weiteren 18 h im Szintillations-Messgerät detektiert (cps = counts per second, T = T-Zellen ohne Aktivierung; MW + SEM,  $n = 3$  Spender).

## 4.8 Partielle Charakterisierung des inhibitorischen Prinzips von epithelalem Überstand

### 4.8.1 Überprüfung der Sensitivität gegenüber Hitze

Um die Sensitivität des inhibitorischen Prinzips gegenüber Hitze zu testen, wurde Epithelzell-Überstand für 30 min bei  $100^\circ\text{C}$  gekocht. Das Erhitzen zerstört sämtliche Sekundärstrukturen und denaturiert somit Proteine. Das verwendete Medium (RPMI) und ein Kontrollüberstand (PBMC) wurden gleichartig behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-28 dargestellt. Die hitzebehandelten

Überstände wurde nach Abkühlung mit 50% Volumenanteil zu CD14<sup>+</sup> Zellen gegeben, welche anschließend mit LPS über Nacht stimuliert wurden. Es zeigte sich, dass das Medium und der PBMC-Kontrollüberstand überhaupt keinen Einfluss auf die TNF Freisetzung hatten. Dies wurde auch durch Erhitzen nicht verändert. Die inhibitorische Wirkung des Epithelzellüberstand jedoch ging durch das Erhitzen verloren. Die TNF-Freisetzung nach LPS Stimulation in Anwesenheit von hitzebehandeltem Epithelzell-Überstand (BEAS-2B  $\Delta T$ ) entsprach ungefähr der TNF Sekretion von unbehandelten Kontrollzellen (RPMI).

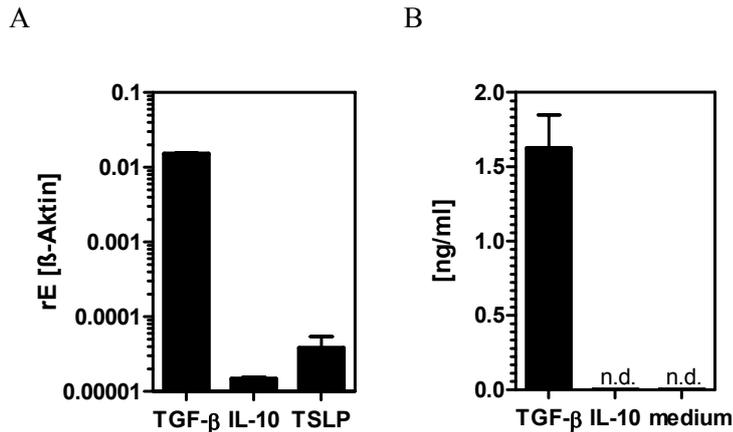


**Abbildung 4-28: Das inhibitorische Prinzip in epithelialen Überständen ist hitze-labil**

RPMI oder Überstände der angegebenen Zellen (BEAS-2B und PBMCs) wurden für 30 min bei 100°C inkubiert. Die hitzebehandelten Überstände wurden auf  $1 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> Zellen (50% vol/vol) gegeben, die zuvor in eine 96-well Platte ausgebracht worden waren. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit 10 ng/ml LPS stimuliert und die zellfreien Überstände auf TNF mittels ELISA untersucht. (Mittelwert + SEM, n = 2 Spender; c = unstimulierte Zellen, Ø = unbehandelte Überstände,  $\Delta T$  = hitzebehandelte Überstände).

#### 4.8.2 Expression und Proteinsekretion bekannter inhibitorischer Zytokine

Als negativ regulierende Zytokine sind TGF- $\beta$  und IL-10 bekannt. Zudem wurde TSLP in letzter Zeit eine regulierende Funktion auf DCs zugesprochen (Soumelis et al., 2002; Rimoldi et al., 2005; Zaph et al., 2007). Daher wurde zuerst die Expression dieser Zytokine auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time RT-PCR in unstimulierten BEAS-2B Zellen untersucht (Abbildung 4-29 A). Es zeigte sich, dass von allen drei untersuchten Genen in BEAS-2B Zellen mRNA vorhanden war. Zusätzlich gab es einen deutlich quantitativen Unterschied. TGF- $\beta$  wurde stark exprimiert, IL-10 und TSLP lagen nur in geringen Kopienzahlen vor. Die Spezifität der PCR wurde mittels „no RT-“ und „no template“-Kontrollen überprüft, in denen es zu keiner spezifischen Amplifikation kam. Daraufhin wurde das Vorhandensein dieser Proteine in dem 48 h Überstand von BEAS-2B Zellen, der üblicherweise für die hier durchgeführten Experimente benutzt wurde, untersucht (Abbildung 4-29 B). TGF- $\beta$  konnte mittels ELISA in großen Mengen nachgewiesen werden. Die TGF- $\beta$  Proteinmenge stieg über die Zeit an, und hatte nach 72 h ihr Maximum erreicht (Daten nicht gezeigt). In Überstand, der nur wenige Stunden konditioniert wurde (1-6 h) war kein TGF- $\beta$  Protein nachweisbar. IL-10 war im ELISA nicht nachweisbar. Für TSLP stand kein ELISA zur Verfügung



**Abbildung 4-29: Inhibitorische Zytokine werden in BEAS-2B Zellen exprimiert**

(A) cDNA aus BEAS-2B Zellen wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR auf die Expression von TGF-β, IL-10 und TSLP untersucht. Angegeben ist die relative Expression auf β-Aktin normiert (Mittelwert + SD, n = 2). (B) TGF-β und IL-10 Proteinsekretion wurde im 48 h Überstand von  $2.5 \times 10^4$  BEAS-2B Zellen überprüft (Mittelwert + SD, n = 2; n.d. = nicht detektierbar).

### 4.8.3 Die inhibitorische Wirkung von Epithelzellen auf Monozyten ist nicht durch TGF-β vermittelt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TGF-β das am prominentesten vertretene negativ-regulatorische Zytokin im Überstand von Epithelzellen war, wurde dessen Rolle bei der Überstand-vermittelten TNF Inhibition von CD14<sup>+</sup> Zellen untersucht (Abbildung 4-30 A). Dazu wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten mit 50% (vol/vol) epithelalem Überstand oder rekombinantem TGF-β und einem neutralisierenden Antikörper gegen TGF-β vorinkubiert (bzw. dem entsprechenden Isotyp). Anschließend wurde mit LPS stimuliert und am nächsten Tag die TNF Sekretion mittels ELISA untersucht. Der Überstand hemmte wie bereits beschrieben die Zytokinfreisetzung um 80%. Rekombinantes TGF-β, welches in einer Konzentration eingesetzt wurde, die in dem 48 h Überstand in Abbildung 4-29 gemessen worden war, inhibierte ebenfalls, wenn auch nur um 48%. Wurde der blockierende neutralisierende Antikörper hinzugegeben, so konnte dieser die Inhibition der TNF-Sekretion durch rekombinantes TGF-β neutralisieren, die Wirkung des Überstandes jedoch nicht. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden CD14<sup>+</sup> Zellen weiterhin mit 50% (vol/vol) Überstand und 0.3 μM SB431542 inkubiert. SB431542 ist ein selektiver Inhibitor der TGF-β Typ 1 Rezeptorkinasen. Anschließend wurde mit LPS über Nacht stimuliert (Abbildung 4-30 B). Es zeigte sich eine Hemmung der TNF-Freisetzung um 62% durch den epithelialen Überstand. Durch die Zugabe des Inhibitors reduzierte sich bereits die TNF-Sekretion von Monozyten. Diese Reduktion war vergleichbar in der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zu beobachten, was den Effekt von DMSO auf Monozyten widerspiegelt. Vergleicht man jedoch die TNF-Freisetzung der Lösungsmittelkontrolle mit den Zellen, die mit Epithelzell-Überstand und SB431542 inkubiert wurden, so konnte der Überstand die TNF-Sekretion ebenfalls um 64% hemmen. Die Befunde sprechen dafür, dass TGF-β als inhibitorischer Faktor auf Monozyten ausgeschlossen werden kann.

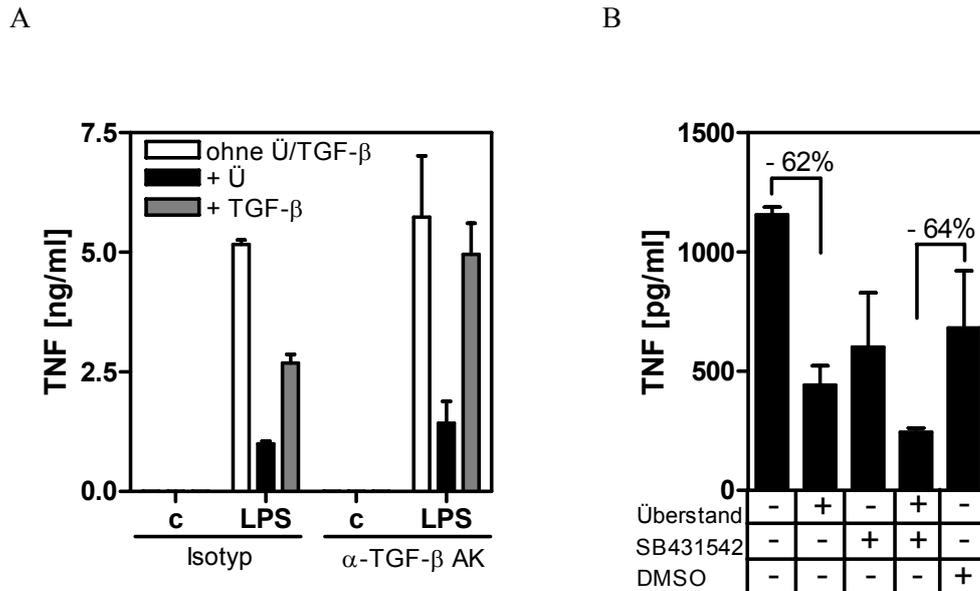
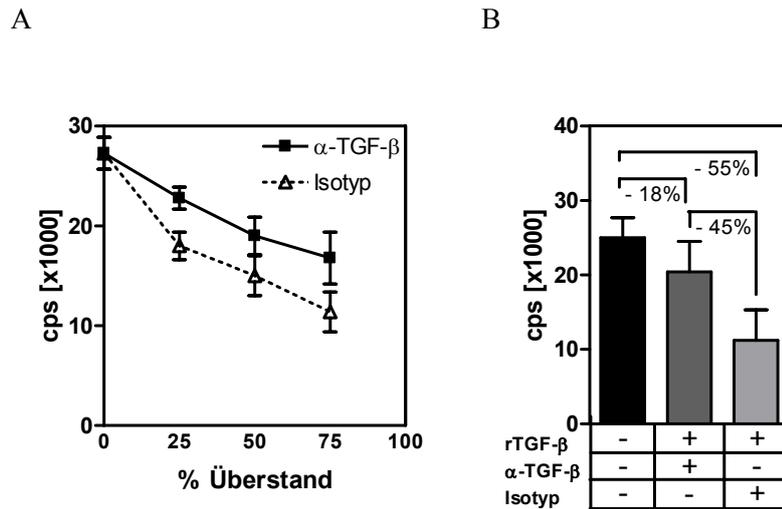


Abbildung 4-30: Die Inhibition von Monozyten ist nicht durch TGF-β vermittelt

(A)  $1 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96 well-Platte ausgebracht und für 1 h mit 50% (vol/vol) Überstand (= Ü), 1 ng/ml rekombinantes TGF-β und 25 µg/ml anti-TGF-β Antikörper (+ α-TGF-β AK) oder dem entsprechenden Isotyp vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 30 ng/ml LPS für 18 h stimuliert und die TNF Sekretion mittels ELISA bestimmt (Mittelwert + SD, n = 2; c = unstimulierte Zellen). (B) CD14<sup>+</sup> Zellen wurden für 2 h mit 0.3 µM SB431542 (ein selektiver Inhibitor der TGF-β Typ 1 Rezeptorkinasen) oder der entsprechenden DMSO Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50% (vol/vol) Epithelzell-Überstand und 30 ng/ml LPS für 18 h inkubiert. Die Zytokinfreisetzung wurde mittels ELISA gemessen (Mittelwert + SD, n = 2).

#### 4.8.4 Partiieller Einfluss von TGF-β auf die Proliferation von T-Zellen

TGF-β ist ein Zytokin, das stark inhibitorisch auf die T-Zell Proliferation wirkt (Li et al., 2006). Bei Monozyten wurde TGF-β bereits als Ursache für die Reduktion der Zytokinfreisetzung ausgeschlossen (Abbildung 4-30). Es wurde zusätzlich untersucht, ob TGF-β, welches im Überstand von bronchialen Epithelzellen enthalten ist, ursächlich für die inhibitorische Wirkung auf die T-Zellproliferation war. Dazu wurden T-Zellen in An- oder Abwesenheit von epithelalem Überstand (Abbildung 4-31 A) oder rekombinantes TGF-β (Abbildung 4-31 B) inkubiert. Zusätzlich wurde ein neutralisierender Antikörper gegen TGF-β (bzw. der entsprechende Isotyp) zugegeben. Rekombinantes TGF-β hatte eine hemmende Wirkung auf die Zellteilung von T-Zellen, was von dem neutralisierenden Antikörper beinahe komplett aufgehoben werden konnte. Der Isotyp dagegen zeigte keine neutralisierende Wirkung (Abbildung 4-31 B). Der neutralisierende Antikörper (α-TGF-β) konnte bei der Inkubation mit dem Überstand die reduzierende Wirkung auf die Teilungsrate nicht komplett aufheben (Abbildung 4-31 A). Es bestand jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen Isotyp und spezifischem Antikörper. Die Überstand-vermittelte Inhibition der T-Zellproliferation ist daher partiell auf TGF-β zurückzuführen.



**Abbildung 4-31: Die Inhibition von T-Zellproliferation durch epithelialen Überstand ist partiell TGF- $\beta$  abhängig**

$1 \times 10^4$  DCs wurden mit  $1 \times 10^5$  T-Zellen in 96-wells koinkubiert und epithelialer Überstand (A) oder 0,5 ng/ml rekombinantes TGF- $\beta$  zugegeben (B). Zusätzlich wurde noch mit 25  $\mu$ g/ml anti-TGF- $\beta$  Antikörper ( $\alpha$ -TGF- $\beta$ ) oder dem entsprechenden Isotyp koinkubiert. Proliferation wurde nach 96 h mit Hilfe des Einbaus von  $^3$ H-Thymidin während der Replikation der T-Zellen radiometrisch ermittelt. Dazu wurden nach 96-stündiger Koinkubation die Zellen mit 22,5 kBq  $^3$ H-Thymidin gepulst und nach weiteren 18 h im Szintillations-Messgerät vermessen (cps = counts per second). (A: MW+SEM, n = 3 Spender; B: MW+SD, einer aus drei Spendern).

#### 4.9 Isolation und Kultur primärer muriner trachealer Epithelzellen

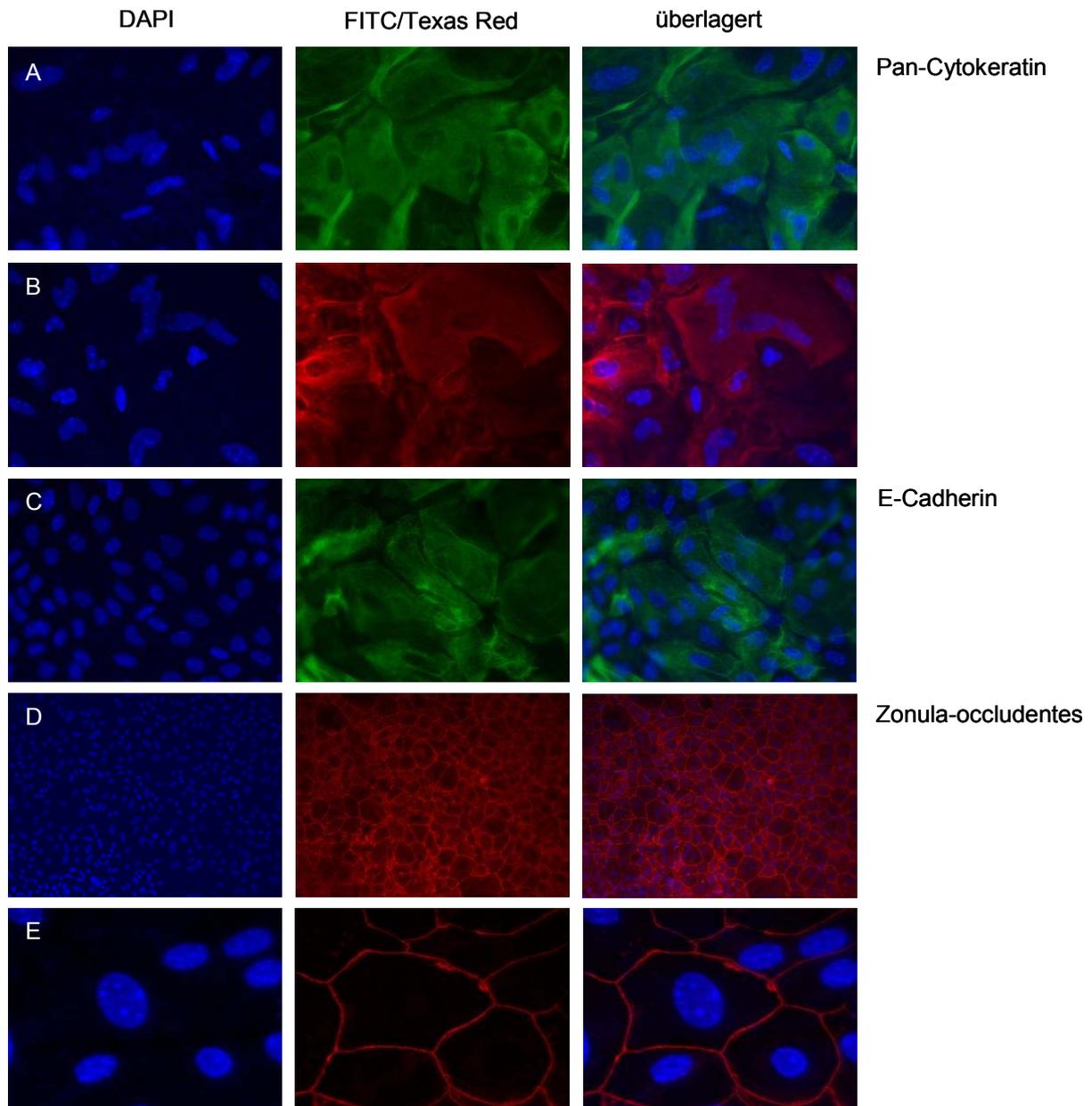
Primäre murine Epithelzellen wurden nach einem bereits etablierten Protokoll (Davidson et al., 2000) isoliert und in Kultur genommen. Zur Charakterisierung der gewonnenen Epithelzellen wurden Epithelzell-spezifische Proteine immunhistochemisch untersucht. Um die primären trachealen Zellen als Epithelzellen weiter zu charakterisieren wurde die Expression von spezifischen Genen wie Defensin- $\beta$ 1 und Defensin- $\beta$ 2, sowie des Chloridkanals CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) überprüft. Ein weiteres Charakterisierungsmerkmal für epitheliale Zellen sind „tight junctions“. Deren Ausbildung kann mit Hilfe des transepithelialen Widerstandes gemessen werden. Die Charakterisierung mittels qPCR und die Messungen des transepithelialen Widerstandes wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Mario Mühmer durchgeführt (Muehmer, 2006).

DefB1-Expression wurde in den isolierten Epithelzellen, nicht jedoch in RAW 264.7 Zellen nachgewiesen. DefB2 konnte nicht Epithelzellen nachgewiesen werden. CFTR war wie DefB1 nur in den primären trachealen Zellen nachweisbar. Das als Negativ-Kontrolle verwendete CD11b (ein auf myeloiden Zellen exprimiertes Oberflächenmolekül, was eine Kontamination der Epithelzellen anzeigen würde) wurde vor allem in den RAW 264.7 Makrophagen nachgewiesen. In den Epithelzellen konnte ebenfalls eine Expression nachgewiesen werden, die jedoch 2 Zehnerpotenzen geringer war als bei den RAW264.7 Makrophagen. Somit konnten Epithelzell-spezifische Markergene mittels qPCR nachgewiesen werden. Die Messung des transepithelialen Widerstandes ergab nach 7 Tagen im Mittel  $1160 \Omega \times \text{cm}^2$ . 15-16 Tage nach Isolation erreichten die Widerstände ihren

Maximalwert von  $1490 \Omega \times \text{cm}^2$ . Bei weiteren Messungen im Zeitraum von 22-28 Tagen sanken die transepithelialen Widerstände wieder auf  $1200 \Omega \times \text{cm}^2$ . Als Kontrolle wurde der Widerstand der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 ermittelt, der minimale Widerstandswerte von  $7 \Omega \times \text{cm}^2$  ergab.

#### 4.9.1 Immunhistochemische Charakterisierung

Zur Charakterisierung Epithelzell-spezifischer Marker wurden 30-50 Tage alte ALI-Kulturen verwendet. Die Fixierung erfolgte mit 90% eiskaltem Methanol im Transwell. Danach wurden die entsprechenden Antikörperverdünnungen zu 200  $\mu\text{l}$  auf das Transwell gegeben und in die untere Kavität PBS/1.5%FCS. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper und der DAPI-Gegenfärbung wurden die Transwell-Membranen mit einem Einmal-Skalpell herausgetrennt und analysiert. Um die Spezifität der Färbung zu überprüfen, wurde mit dem Sekundärantikörper alleine und entsprechenden Isotypen gefärbt. Es zeigten sich keine unspezifischen Färbungen (Ergebnisse nicht gezeigt). In Abbildung 4-32 sind die Ergebnisse der verwendeten Färbungen aufgeführt. „Pan-Cytokeratin“ färbt verschiedene epitheliale Zytoskelett-Proteine an. Die Färbung der Epithelzellen zeigte eine Färbung filamentöser Elemente unter Aussparung der Nuklei. (Abbildung 4-32 A, B). Morphologisch zeigte sich ein Zellverband, der aus polygonalen Zellen bestand. Außerdem lagen teilweise mehrkernige Zellen vor (Abbildung 4-32 B). E-Cadherin ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche, welches eine Kalzium abhängige Adhäsion zwischen epidermalen Zellen und anderen epithelialen Zelltypen vermittelt. E-Cadherin ist oft mit der Zonula adherens (verbindet Epithelzellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix) assoziiert und ist vermehrt an der Zellmembran zu finden. Die Färbung mit anti-E-Cadherin zeigte eine Nuklei-aussparende Färbung der Zellen, die partiell an der Zellmembran intensiver war. Ein wichtiges Merkmal von Epithelzellen ist die Ausbildung sogenannter „Tight Junctions“ (Zonula occludens). Dies sind schmale Bänder aus Membranproteinen, die den Zellzwischenraum von Epithelien umschließen und eine parazelluläre Barriere bilden. ZO-Proteine, nach der Zonula occludens benannt, sind mit diesen Barrieren assoziiert. Die Färbung von ZO-1 wies eine deutlich sichtbare membranäre Färbung auf. Abbildung 4-32 D ist in einer kleineren Vergrößerung aufgenommen (40x) und zeigt die gleichmäßige, flächenbedeckende Epithelzellschicht auf dem Transwell. Die höhere Vergrößerung (Abbildung 4-32 E) spiegelt die Ausbildung von „tight-junctions“ wider, was mit einer Zunahme des transepithelialen Widerstandes (Daten nicht gezeigt) einherging.

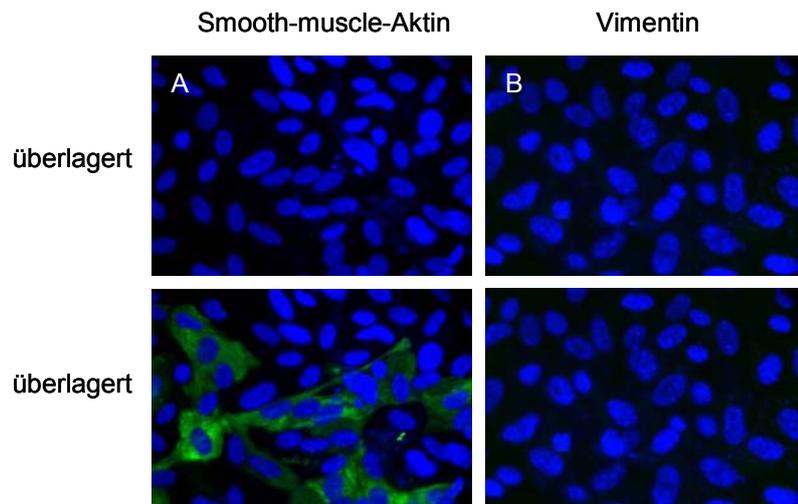


**Abbildung 4-32: Immunhistochemische Färbung von epithelialen Markerproteinen**

Primäre murine tracheale Epithelzellen, isoliert aus Balb/c Mäusen, wurden in Transwelleinsätzen mit anti-Pan-Cytokeratin (A, B), E-Cadherin (C), Zonula-occludentes (D-40x, E-63x) als Primärantikörper, FITC/Texas-Red markiertem Sekundärantikörper und DAPI gefärbt. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der DAPI-Färbung (linke Spalte), Aufnahmen der FITC/Texas-Red Färbung (mittlere Spalte) und die Überlagerung beider Aufnahmen (rechte Spalte). Die jeweiligen Sekundärantikörper waren hochspezifisch und wurden mit einer Färbung des Sekundärantikörpers alleine kontrolliert.

Um die Reinheit der ALI-Kulturen zu überprüfen, wurden die Zellen zusätzlich mit Antikörper gegen nicht-Epithelzell-spezifische Markerproteine gefärbt und von der Transwellmembran verschiedene Gesichtsfelder analysiert. „Smooth-muscle-Aktin“ ist eines von zwei Hauptproteinen (Aktin und Myosin), die für Zellmotilität zuständig sind und verschiedene zelluläre Prozesse, wie Fortbewegung, Sekretion, zytoplasmatische Bewegung und Phagozytose regulieren. „Smooth-muscle-Aktin“ wird in Muskelzellen, wie auch in Makrophagen exprimiert. Daher können eventuelle Kontaminationen bei der Epithelzellgenerierung angefärbt werden. Abbildung 4-33 zeigt zwei Gesichtsfelder eines Transwells

einer ALI-Kultur. Es zeigte sich, dass 95% der angefärbten Gesichtfelder keine kontamierenden Zellen aufwiesen (obere Reihe). In ca. 5% der Gesichtsfelder zeigten sich smooth-muscle-Aktin positive Zellen (untere Reihe), die einen Hinweis auf eine Kontamination durch nicht-Epithelzellen gaben. Vimentin ist ein Typ 3-Intermediärfilament, welches mit den Mikrotubuli und Aktinfilamenten das Zytoskelett der Zelle bildet. Vimentin kommt im Zytoplasma aller Zellen mesenchymalen Ursprungs vor (Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen). Es konnte in keiner Färbung nachgewiesen werden.



**Abbildung 4-33: Immunhistochemische Färbung von nicht-epithelialen Markerproteinen**

Primäre tracheale Epithelzellen, isoliert aus C3H/HeN Mäusen, wurden mit „Smooth-muscle-Aktin“ (A) und Vimentin (B) als Primäantikörper und mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der überlagerten Bilder. Obere Zeile: vorherrschendes Gesichtsfeld (>95%), untere Zeile: wenige Ausschnitte (<5%).

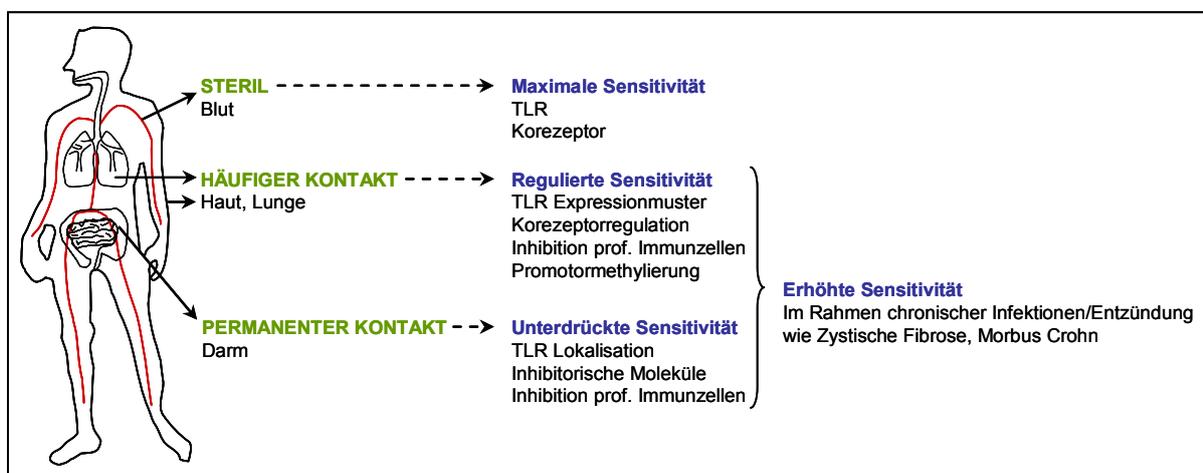
## 5 Diskussion

### 5.1 Epithelzellen als basale Immunzellen

Epithelien bilden die Grenzfläche zwischen Körperinnerem und belebter Umwelt. Die besondere Bedeutung von Epithelzellen zeigt sich in der massiv gesteigerten Infektionsgefahr bei großflächiger Zerstörung oder Beeinträchtigung der Epithelzellschicht z.B. im Rahmen einer Verbrennung. Mikrobieller Kontakt an Körperoberflächen führt nur selten zu Infektionen und im Gefolge zur Aktivierung des Immunsystems und zu Entzündungsreaktionen. Dies ist zum einen bedingt in den Eigenschaften der eindringenden Erreger, insbesondere der unterschiedlichen Ausprägung von Virulenzfaktoren (man unterscheidet dabei fakultativ und obligat pathogene Mikroorganismen). Zum anderen besitzen Epithelien äußerst wirksame Abwehrstrategien, deren Bedeutung bislang unterschätzt wurde. Epithelien spielen also eine wichtige Rolle in der Infektionsimmunologie, indem sie die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen bilden. Neben der konstitutiven mechanischen und chemischen Barrierefunktion sind Epithelzellen in der Lage, induzierbare Entzündungsmediatoren zu sezernieren. Um aktiv auf eindringende Keime zu reagieren und diese abwehren zu können, ist deren Erkennung essentiell. Dafür ist ein einfaches Fremd-/Selbsterkennungssystem notwendig. Über die Strategien der Erregererkennung in Epithelzellen war lange wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit und anderer (Greene et al., 2005; Becker et al., 2000; Hertz et al., 2003; Guillot et al., 2005; Groskreutz et al., 2006; Muir et al., 2004) zeigte sich, dass Epithelzellen für die Fremd/Selbsterkennung ein bekanntes Prinzip des angeborenen Immunsystems, die Expression von Mustererkennungsrezeptoren, welche konservierte molekulare Strukturen spezifisch erkennen, verwenden.

Die physiologische Funktion der Lunge besteht im Gasaustausch und bedingt einen regelhaften Kontakt mit luftgetragenen Erregern. Um eine permanente Entzündungsreaktion und epitheliale Dysfunktion zu vermeiden, haben Organe, die nicht primär steril sind (wie die Haut, die Lunge und der Darm) Strategien entwickelt, um eine Koexistenz zwischen Wirt und Erreger zu ermöglichen, was letztlich der Erhaltung von organspezifischen Aufgaben dient. Dieses Konzept der organspezifischen Regulation von Prinzipien des angeborenen Immunsystems wurde von E. Raz (Raz, 2007) formuliert und ist in Abbildung 5-1 schematisch dargestellt. Das Konzept besagt, dass angeborene Immunfunktionen organspezifisch adaptiert und moduliert werden, um die Integrität von Organen zu erhalten, die permanentem oder regelhaftem mikrobiellen Kontakt ausgesetzt sind. In sterilen Kompartimenten des Körpers, wie dem Blut und der Milz, führt jeder mikrobielle Kontakt zu einer Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems z.B. über TLRs. Es wird eine Entzündungsreaktion mit zellulären und humoralen Effektorleistungen induziert, die letztlich den Erreger eradizieren. Diese Entzündungsreaktion muss in nicht-sterilen Organen wie der Haut und den

oberen Atemwegen und einem mit kommensalen Bakterien besiedelten Organ wie dem Darm strikt reguliert sein. Diese Regulation, wird laut Raz et al. vermutlich durch multiple regulatorische Mechanismen gewährleistet, wobei Epithelien dabei eine besondere Rolle spielen (siehe auch 2.7.1): Dazu gehört zum einen eine unterschiedliche Sensitivität bzw. Aktivierungsschwelle von TLRs in den verschiedenen Organen. Eine weitere Stellgröße ist das Expressionsmuster von TLRs bzw. die unterschiedliche Expression von Korezeptoren in sterilen und nicht-sterilen Organen. Zusätzlich kann die Sensitivität gegenüber mikrobieller Stimulation durch Proteine, für die negativ-regulatorische Funktionen beschrieben wurden, verändert werden. Dieses Konzept der organspezifischen Regulation des angeborenen Immunsystems wird bislang vor allem durch Daten des Gastrointestinaltraktes untermauert. Für bronchiale Epithelzellen ist dazu bislang wenig bekannt. Zudem wurden die bislang publizierten Daten nicht im Rahmen eines organspezifischen Immunsystems betrachtet und diskutiert.



**Abbildung 5-1 Konzept der organspezifische Regulation des Immunsystems**

Die Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen molekulare Muster, die sowohl auf pathogenen als auch auf apathogenen Erregern exprimiert werden. Folglich kann das angeborene Immunsystem nicht zwischen kommensaler Flora und pathogenen Keimen unterscheiden. In Organen, die regelmäßig in Kontakt mit Mikroben kommen (Haut und Lunge) oder die mit einer residenten Flora besiedelt sind (Darm), existieren Kontrollmechanismen, um chronische Entzündungsprozesse und Dysfunktion zu vermeiden. Dazu sind verschiedenen Kompartimenten bzw. Organen unterschiedliche Mechanismen beschrieben worden, welche die Sensitivität gegenüber mikrobieller Exposition regulieren (prof. Immunzellen = professionelle Immunzellen) (Raz, 2007).

### 5.1.1 Expression von Mustererkennungsrezeptoren auf Epithelzellen

Um Pathogene zu erkennen und eine Pathogen-adaptierte Immunantwort induzieren zu können, exprimieren bronchiale Epithelzellen Toll-like Rezeptoren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels quantitativer real-time RT-PCR gezeigt werden, dass bronchiale Epithelzellen TLR1-6, TLR9 und TLR10 exprimieren, was im Verlauf dieser Arbeit von anderen Gruppen ebenfalls beschrieben wurde (Greene et al., 2005; Becker et al., 2000; Hertz et al., 2003; Guillot et al., 2005; Groskreutz et al., 2006; Muir et al., 2004). Es fiel allerdings auf, dass TLR2 in BEAS-2B Zellen in niedriger Kopienzahl exprimiert wurde, wohingegen die TLR2 Expression in primären Epithelzellen nur wenig schwächer als die Expression von TLR1-5 detektiert wurde. Funktional entsprechen die Daten von primären Zellen denen von BEAS-2B Zellen. So zeigte sich in den beiden Zellen eine mangelhafte Erkennung des TLR2 Liganden Lipoteichonsäure (jedoch nicht für Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> und R-FSL) und eine

Hyporesponsivität auf Stimulation mit *gram-positiven* Keimen. Somit konnten BEAS-2B Zellen als geeignetes Modell für bronchiale Epithelzellen betrachtet werden. Die Funktionalität der Rezeptoren wurde über die Stimulation mit hoch-reinen spezifischen Liganden nachgewiesen. Es konnte die funktionelle Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 durch Aktivierung mit diacylierten Lipopeptiden (TLR2+TLR6) und triacylierten Lipopeptiden (TLR1+TLR2) nachgewiesen werden. Eine Stimulation von TLR2 mit Lipoteichonsäuren, isoliert von verschiedenen gram-positiven Bakterien, konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Liganden für TLR3 (p(I:C)), TLR4 (LPS) und TLR9 (CpG) waren ebenfalls in der Lage, die Sekretion von IL-8 und IL-6 zu induzieren. TLR7 und TLR8 konnten mittels quantitativer real-time RT-PCR nicht detektiert werden. Dies bestätigte sich funktionell mit der fehlenden Stimulierbarkeit von bronchialen Epithelzellen mit R848. Ähnliche Ergebnisse wurden für A549-Zellen (Groskreutz et al., 2006; Tissari et al., 2005) und primäre bronchiale Epithelzellen (Sha et al., 2004) publiziert. Groskreutz et al. und Tissari et al. zeigten, dass die Stimulation mit p(I:C) und RSV, die TLR3 aktivieren, zu einer deutlichen IL-8 Sekretion in A549 Zellen führte, wohingegen keine Aktivierung mit R848 zu detektieren war. Sha et al. detektierten mRNA für TLR1-10 in BEAS-2B Zellen. Eine Aktivierung der Zellen konnte allerdings nur mit Liganden für TLR2, 3, 4, 5 und 9 gezeigt werden. Allen drei Publikationen ist gemeinsam, dass TLR3 der am höchsten exprimierte Toll-like-Rezeptor auf Atemwegsepithelzellen ist, was mit unseren Daten stimmig ist. Für Epithelzellen anderer Kompartimente konnten gleichartige Expressionsmuster beobachtet werden. So wurden in Keratinozyten ebenfalls TLR 1-6, TLR9 und TLR10 detektiert (Lebre et al., 2007) und in tubulären Epithelzellen der Niere konnten TLR1-4, TLR6 und TLR9 nachgewiesen werden (Anders et al., 2004). In intestinalen Epithelzellen wurde die Expression von TLR1-9 beschrieben (Cario et al., 2000; Gewirtz et al., 2001; Lee et al., 2006; Otte et al., 2004). Gegenteilige Befunde existieren für TLR7 und TLR8 Expression in 16-HBE Zellen (eine bronchiale Epithelzelllinie). Die Autoren zeigten mittels RT-PCR das Vorhandensein von TLR7 und TLR8, wobei die Expression von TLR8 kaum zu detektieren war. Allerdings wurde nur für TLR2 und TLR4 nach Stimulation mit spezifischen Liganden eine NF- $\kappa$ B Aktivierung gezeigt. Für TLR7 und TLR8 existieren keine funktionellen Daten (Muir et al., 2004; Sha et al., 2004). Zusätzlich konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere Transkripte für andere Mustererkennungsrezeptoren detektiert werden. So wurde mRNA für CD14, fMLP, Mannoserezeptor und NOD1 gefunden. Für NOD2 konnte keine Expression und keine Freisetzung von Chemokinen oder Zytokinen nach Stimulation mit MDP beobachtet werden. Für Lungenepithelzellen wurde in der Literatur eine NOD2 Expression beschrieben, aber auch hier wurde keine Chemokinsekretion durch den spezifischen Liganden induziert (Uehara et al., 2007). Die Funktionalität von NOD1 konnte durch Stimulation mit DAP (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003c) mit resultierender Freisetzung von IL-8 gezeigt werden. Der Mannoserezeptor war nicht mittels Mannan aktivierbar. Somit konnten auf primären Epithelzellen und BEAS-2B Zellen gleichermaßen die Funktionalität der Toll-like Rezeptoren 1-6 und 9, sowie von NOD1 gezeigt werden.

Die Rolle weiterer Mustererkennungsrezeptoren ist Gegenstand aktueller Forschung. RIG-I und MDA5 sind als intrazelluläre Rezeptoren, welche doppelsträngige, virale RNA erkennen, beschrieben worden (Kato et al., 2005; Kato et al., 2006). Deren Expression konnte in A549 Zellen nachgewiesen werden (Opitz et al., 2007). Über NALP1 und NALP3 in Atemwegsepithelzellen ist bislang wenig publiziert. Für NALP1 wurde eine Expression in bronchialen und trachealen Epithelzellen gefunden und auch in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes (Magen, Dünndarm und Dickdarm) nachgewiesen. NALP3 hingegen wurde in anderen Epithelien (Ösophagus, Gebärmutterhals und Blase) detektiert (Kummer et al., 2007).

Die Befunde sprechen dafür, dass unterschiedliche Zelltypen ein unterschiedliches Repertoire an Mustererkennungsrezeptoren exprimieren. Dies könnte darin begründet sein, dass verschiedene Organe auch in unterschiedlichem Ausmaß mikrobieller Exposition ausgesetzt sind. Epithelzellen verfügen über ein umfangreiches Repertoire an Rezeptoren, die üblicherweise auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert sind. Zudem können bronchiale Epithelzellen auf Kontakt mit mikrobiellen Erregern oder Liganden hin mit der Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Chemokine und Zytokine aktiv in eine Immunabwehr eingreifen (Martin and Frevert, 2005). Somit stellen bronchiale Epithelzellen einfache Immunzellen des angeborenen Immunsystems dar.

### **5.1.2 Rezeptorregulation als grundlegender Mechanismus zur Vermeidung unkontrollierter Entzündung und epithelialer Dysfunktion**

Im Gastrointestinaltrakt wurden bereits regulatorische Mechanismen beschrieben, die es den intestinalen Epithelzellen ermöglichen, eine chronische Entzündungsreaktion gegen kommensale Bakterien zu vermeiden. Das hat zur Folge, dass eine Koexistenz zwischen Wirtszelle und besiedelnden Mikroorganismen möglich wird, was zur Erhaltung organspezifischer Aufgaben beiträgt. Intestinale Epithelzellen exprimieren TLR4 und TLR5 nicht auf der apikalen Oberfläche, sondern umgehen eine permanente Aktivierung dieser Rezeptoren durch eine intrazelluläre (TLR4) und basolaterale (TLR5) Expression (Hornef et al., 2002; Gewirtz et al., 2001). Damit sind für den Fall einer invasiven Infektion die entsprechenden Erkennungsrezeptoren vorhanden. Die Regulation von Korezeptoren ist ein weiterer Mechanismus, um unkontrollierte Entzündungsreaktionen zu limitieren. So wurde in intestinalen Epithelzellen die Expression von MD2 (Korezeptor für TLR4) nicht auf der Oberfläche, sondern im Golgi-Apparat gezeigt (Abreu et al., 2001). Intestinale Makrophagen regulieren die Sensitivität gegenüber LPS indem diese kein CD14 (Korezeptor für TLR4) auf ihrer Oberfläche exprimieren (Smythies et al., 2005). Korezeptoren stellen somit eine wichtige Stellgröße für die Regulation organspezifischer Immunantworten in nicht-sterilen Kompartimenten dar.

TLR2 erkennt ein weites Spektrum bakterieller Zellwandbestandteile, was durch die funktionelle Beteiligung von mehreren Rezeptoren ermöglicht wird. So ist für Lipoteichonsäuren beschrieben, dass diese TLR2 unabhängig von TLR1 oder TLR6 aktivieren können (Schwandner et al., 1999; Lehner et al., 2001; Morath et al., 2002). Triacylierte Lipopeptide und deren synthetisch hergestelltes Analogon

Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> werden über das Heterodimer TLR1+TLR2 erkannt, wohingegen MALP-2, ein diacyliertes Lipopeptid, über TLR2+TLR6 Heterodimere stimuliert (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002; Ozinsky et al., 2000). Die durchgeführten Stimulationen mit verschiedenen TLR2 Liganden zeigten eine unterschiedliche Stimulativität der Liganden. Die prinzipielle Funktionalität von TLR2 auf bronchialen Epithelzellen konnte dadurch gezeigt werden, dass Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub>, und R-FSL in der Lage waren, die Zellen zu aktivieren. Im Gegensatz dazu waren eine LPS-Präparation von *Porphyromonas gingivalis*, für die eine TLR2 Aktivität beschrieben wurde (Hashimoto et al., 2004; Hirschfeld et al., 2001) und Lipoteichonsäuren aus drei verschiedenen *gram-positiven* Bakterien nicht stimulatив, was auch von anderen beobachtet wurde (Armstrong et al., 2004). Die Stimulation von humanen Typ II Alveolarepithelzellen mit LTA führte nur zu einer marginalen IL-8 Sekretion. Die verwendeten TLR2 Liganden wurden auf ihre TLR2 Abhängigkeit in TLR2 knockout Mäusen untersucht. Alle Liganden zeigten, verglichen mit Wildtypmäusen eine komplette TLR2 Abhängigkeit. Dabei zeigte sich auch, dass alle verwendeten Stimuli murine Knochenmarkszellen potent stimulieren konnten. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die Hyporesponsivität von BEAS-2B Zellen im Liganden selbst begründet ist. Lipopeptide und Lipoteichonsäuren stellen die wichtigsten, stimulativen molekularen Strukturen (PAMPs) *gram-positiver* Bakterien dar (Thiemermann, 2002; Morath et al., 2001; Morath et al., 2002), wohingegen LPS das stimulative Prinzip *gram-negativer* Bakterien repräsentiert (Rietschel and Brade, 1992; Poltorak et al., 1998). Die Hyporesponsivität bronchialer Epithelzellen bestätigte sich auch bei der Verwendung von verschiedenen *gram-positiven* Bakterienpräparationen, wohingegen alle verwendeten *gram-negative* Bakterien in der Lage waren, Epithelzellen zu aktivieren. Die Hyporesponsivität gegenüber *gram-positiven* Keimen war nicht auf die Zerstörung stimulativer Strukturen während der Inaktivierung zurückzuführen, da kein Unterschied in der Stimulativität zwischen lebenden und unterschiedlich inaktivierten Keimen bestand. Zusätzlich konnte nach Stimulation von CD14<sup>+</sup> aufgereinigten Blutmonozyten eine TNF-Freisetzung auf Stimulation mit *gram-positiven* als auch *gram-negativen* Bakterien beobachtet werden.

Als zugrunde liegender Mechanismus für die Hyporesponsivität bronchialer Epithelzellen gegenüber LTA und *gram-positiven* Bakterien konnte das niedrige Expressionsniveau von TLR2 und die fehlende Expression des Korezeptors CD36 identifiziert werden. Transfektionsexperimente mit Expressionsplasmiden für TLR2 und CD36 zeigten, dass bereits die Transfektion von TLR2 bronchiale Epithelzellen für LTA sensibilisierte. Ähnliche Befunde wurden auch für das intestinale Epithel gezeigt: Darmepithelzellen zeigen keine TLR2 Responsivität auf Grund niedriger TLR2 und TLR6 Expression und einem zusätzlich hohen Expressionsniveau des inhibitorisch wirkenden Proteins Tollip (Melmed et al., 2003). Die Autoren dieser Arbeit konnten ähnlich zu den hier gezeigten Daten belegen, dass transgene TLR2 Expression die TLR2 Responsivität wieder herstellte.

Im Rahmen der hier erhobenen Daten in bronchialen Epithelzellen spielte allerdings die Expression von CD36 eine zusätzliche Rolle. CD36 gehört zu den Typ B Scavenger Rezeptoren und erkennt Thrombospondin und Kollagen (Febbraio et al., 2001), oxidierte Lipoproteine (Endemann et al.,

1993), apoptotische Zellen (Franc et al., 1999) sowie das Pfemp Antigen von *Plasmodium falciparum* (Oquendo et al., 1989). CD36 wurde eine Rolle als Korezeptor für die Erkennung einiger TLR2 Liganden zugeschrieben. LTA und R-FSL zeigten eine verminderte Stimulativität in Makrophagen von CD36 defizienten Mäusen, wohingegen die Aktivierung der Zellen mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> und S-FSL CD36 unabhängig war (Hoebe et al., 2005). CD36 ist ebenfalls essentiell für die Phagozytose von *gram-positiven* Bakterien (Stuart et al., 2005). Eine Erhöhung des TLR2 Expressionsniveaus nach Stimulation mit TNF und IFN- $\gamma$  konnte auf mRNA Ebene gefunden werden (Homma et al., 2004) (Abbildung 5-2). Das resultierte jedoch nicht in einer erhöhten TLR2 Proteinmenge und der damit verbundenen gesteigerten Responsivität gegenüber LTA. Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> hingegen wirkte stimulativer nach der Vorinkubation mit TNF und IFN- $\gamma$ . CD36 Expression konnte auch nach Stimulation mit TNF und IFN- $\gamma$  nicht detektiert werden. Die durchgeführten Transfektionsexperimente mit Expressionsplasmiden für TLR2 und CD36 zeigten, dass die Transfektion von TLR2 alleine ausreichte, um Epithelzellen für LTA zu sensibilisieren. Die Transfektion mit CD36 alleine war diesbezüglich nicht ausreichend. Allerdings zeigte die Kotransfektion beider Rezeptoren einen synergistischen Effekt. Dies zeigt, dass eine ausreichende Menge beider Rezeptoren für eine Erkennung von *gram-positiven* Bakterien und LTA notwendig ist. Da TLR2 bereits in geringen Mengen auf bronchialen Epithelzellen exprimiert ist, lassen diese Daten den Schluss zu, dass das Expressionsniveau von TLRs eine wichtige Stellgröße in der TLR-Signalgebung ist. Das könnte ein genereller Mechanismus sein, um die Erkennung von Mikroorganismen den Anforderungen unterschiedlicher Kompartimente und Organe anzupassen. Solch ein Konzept wird auch von anderen postuliert (Raz, 2007) (siehe auch Abbildung 5-1). In primär sterilen Organen stellt jeder mikrobielle Kontakt eine potentielle Gefahr dar und muss von Zellen des Immunsystems erkannt werden. In Organen, die mit kommensalen Bakterien besiedelt sind, wie z.B. der Darm oder in denen häufiger Kontakt mit Erregern stattfindet (wie in der Lunge), sollten Erkennungs- und Aktivierungsmechanismen strikt kontrolliert werden. Tatsächlich findet sich in Enterozyten eine Verminderung der Oberflächenexpression von TLR4 und TLR5 (Abreu et al., 2001; Hornef et al., 2002; Gewirtz et al., 2001). Außerdem sind zentrale Signalmoleküle der TLR Signalgebung herunterreguliert (Lotz et al., 2006). Dies resultiert im intestinalen Epithel in einer reduzierten Erkennung apikal vorhandener Bakterien und zur Toleranz gegenüber der residenten Flora. Die hier erhobenen Daten unterstützen ein solches Konzept, in dem zum einen eine niedrige TLR2 Expression und zum anderen die fehlende CD36 Expression in Atemwegsepithelzellen essentiell für die Limitierung unkontrollierter Aktivierung durch luftgetragene, inhalierte Bakterien sind und somit einen Mechanismus für die Erhaltung epithelialer Integrität und Homöostase in der Lunge darstellt (siehe auch Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2).

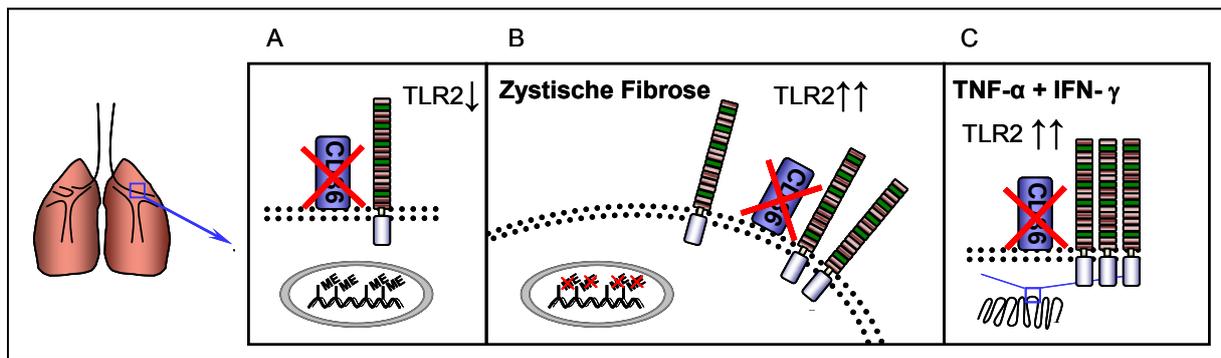
Mit der niedrigen TLR2 Expression und dem fehlenden Korezeptor CD36 geht einher, dass *gram-positive* Keime, die TLR2 Liganden an ihrer Oberfläche tragen (Melmed et al., 2003; Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999; Lien et al., 1999; Morath et al., 2001), bronchiale Epithelzellen nicht ausreichend aktivieren konnten. Im Gegensatz dazu konnten *gram-*

*negative* Bakterien mit typischem LPS an ihrer Oberfläche, die selten im Respirationstrakt zu finden sind, Epithelzellen potent stimulieren. Ein weiterer Mechanismus zur Kontrolle der TLR2 Aktivierung wurde kürzlich in bronchialen Epithelzellen beschrieben. Auf Chromatinebene kann die Rezeptorexpression und Sensitivität über eine Methylierung des TLR2 Promotors reguliert werden (Abbildung 5-2). Es zeigte sich, dass bei chronischen Entzündungsreaktionen wie der Zystischen Fibrose eine verminderte CG-Methylierung im TLR2 Promotorbereich zu finden war, was zu einer erhöhten TLR2 Sensitivität führte (Shuto et al., 2006; Muir et al., 2004). Diese Durchbrechung inhibitorischer Mechanismen bei chronischen Entzündungen wurde auch für Keratinozyten beschrieben. Dabei zeigten epidermale Epithelzellen von Psoriasis-Patienten eine erhöhte TLR2 Expression an der Oberfläche (Baker et al., 2003).

Die hier erhaltenen Ergebnisse sind zunächst schwierig in Einklang mit Daten zu bringen, die zeigen, dass humane bronchiale Epithelzellen oder IHAEo<sup>-</sup> Zellen mit Streptokokken (Schmeck et al., 2005) und Staphylokokken (Gomez et al., 2004) signifikant aktiviert werden konnten. Das konnte in diesem Ausmaß nicht beobachtet werden. Besonders hervorzuheben ist dabei die Genarray-Daten, die belegen, dass *Staphylococcus aureus* nicht in der Lage war, eine große Anzahl von Genen zu induzieren (vgl.5.1.3). Eine minimale Responsivität konnte jedoch detektiert werden, vor allem nach einem längeren Stimulationszeitraum (48 h). In dieser Arbeit wurden andere Stämme verwendet als der R6x-Stamm von *Streptococcus pneumoniae*. Darüber hinaus wurde eine Reihe unterschiedlicher Bakterien aus der Stammsammlung der Abteilung für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in Heidelberg verwendet. Darunter waren sowohl ATCC-Stämme (American Type Culture Collection) als auch etliche Patientenisolate von *gram-positiven* und *gram-negativen* Keimen, von denen beschrieben wurde, dass sie Erkrankungen der Atemwege verursachen können (Hahn et al., 2001). Das ermöglichte uns, die Stärke der Aktivierung zu vergleichen und zu evaluieren. Das Ausmaß der Stimulation mit *gram-positiven* Bakterien war durchweg niedrig, teilweise aber nicht komplett fehlend.

Interessanterweise scheinen ein paar *gram-negative* Bakterien der Mundhöhle einer Erkennung über TLR4 auszuweichen, indem sie eine atypische LPS Struktur synthetisieren, welches an TLR2 bindet. Das wurde z. B. für *Porphyromonas gingivalis* beschrieben (Kirikae et al., 1999; Coats et al., 2003).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Daten dieser Arbeit zeigen, dass zum einen eine niedrige TLR2 Expression und zum anderen die Abwesenheit des Korezeptors CD36 in bronchialen Atemwegsepithelzellen essentiell an der Limitierung unkontrollierter Aktivierung durch luftgetragene, inhalierte Bakterien beteiligt sind und somit die Erhaltung epithelialer Integrität und Homöostase in der Lunge gewährleistet wird (Abbildung 5-2).



**Abbildung 5-2 Regulation von TLR2 in bronchialen Epithelzellen**

(A) Die niedrige Expression von TLR2, die Methylierung im TLR2-Promotor und der fehlende Korezeptor CD36 sind die zugrunde liegenden Mechanismen für die Hyporesponsivität von bronchialen Epithelzellen für einige TLR2 Liganden und *gram-positive* Bakterien. (B) Bei chronischen Entzündungsprozessen wie der Zystischen Fibrose kommt es zur verminderten Methylierung im Promotorbereich, was zu einer erhöhten TLR2 Expression führt (Shuto et al., 2006). (C) Proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  führen zu einer vermehrten TLR2 Expression in Atemwegsepithelzellen (Homma et al., 2004).

### 5.1.3 Infektions-Transkriptom in Epithelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Epithelzellen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems exprimieren und im Atemwegsepithel eine unkontrollierte Aktivierung durch luftgetragene, inhalierte Bakterien durch Regulation der TLR2 und CD36 Expressionsniveaus verhindert wird, wurde eine genomweite Expressionsanalyse von BEAS-2B Zellen durchgeführt. Dazu wurden BEAS-2B für einen Zeitraum von 4 h mit drei Erregern stimuliert, die schwere respiratorische Erkrankungen verursachen können (Hahn et al., 2001). Mit einer Stimulationszeit von 4 h werden vor allem früh induzierte Gene („early response genes“) detektiert, die durch direkten Kontakt mit dem Erreger induziert werden. Dabei spielen verstärkend wirkende autokrine Faktoren keine Rolle. Verwendet wurden drei Modellpathogene, welche über TLR2 (*S. aureus*) (Takeuchi et al., 1999), TLR3 (*RSV*) (Groskreutz et al., 2006) und TLR4 (*P. aeruginosa*) (Faure et al., 2004) von den bronchialen Epithelzellen erkannt werden.

*RSV*, ein einzelsträngiges Virus mit Minus-Strang RNA aus der Familie der Paramyxoviridae, ist ursächlich für schwere Infektionen der Atemwege wie Bronchitis und interstitielle Pneumonie, vor allem bei Kindern und immungeschwächten Menschen (Openshaw, 2005). *Pseudomonas aeruginosa*, ein *gram-negatives* Stäbchenbakterium, ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der schwere Infektionen in beatmeten, immungeschwächten oder HIV-infizierten bzw. hämatologisch-onkologischen Patienten verursacht. Infektionen des Respirationstrakts mit *P. aeruginosa* gehen häufig in eine Sepsis über, die dann meist tödlich endet. *P. aeruginosa* ist auch ursächlich für die häufigste chronische Infektion bei Mukoviszidose-Patienten (Sadikot et al., 2005; Hahn et al., 2001). *S. aureus* gehört zu der Gattung *gram-positiver* Kugelbakterien und verursacht oberflächliche und tief-invasive eitrige Infektionen, Sepsis, Endokarditis und Pneumonien (nosokomial und ambulant). Der Pneumonie gehen meist Schädigungen durch Virusinfektionen, Aspiration, Immunsuppression oder Traumata voraus (Hahn et al., 2001). Die Effizienz bronchialer Abwehrmechanismen zeigt sich in der geringen Häufigkeit, in der schwere Infektionen der epithelialen Oberflächen in der Lunge gesunder Individuen auftreten. Voraussetzung für diese effiziente Wirtsabwehr sind funktionale Effektor-

Proteine, die in ausreichender Menge innerhalb eines bestimmten Zeitfensters vorliegen. Für diese benötigten Proteine kodieren Gene, deren Transkription mittels genomweiter Expressionsanalyse untersucht werden können.

Eine wichtige Erkenntnis der durchgeführten genomweiten Expressionsanalyse in stimulierten bronchialen Epithelzellen ist, dass sowohl eine gemeinsame Kernantwort als auch eine Pathogenspezifische Antwort in bronchialen Epithelzellen nach Stimulation mit *RSV*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* beobachtet werden kann. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Dendritischen Zellen nach Stimulation mit *E. coli*, *Candida albicans* und *Influenza A Virus* beobachtet werden (Huang et al., 2001). Diese Dendritischen Zellen zeigten sowohl eine gemeinsame Kernantwort als auch Pathogenspezifische Antworten. Zu den früh regulierten Genen (bis ca. 4 h; entspricht der Stimulationszeit der hier durchgeführten Experimente) der Kernantwort gehörten pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und Rezeptoren, welche Effektorzellen an den Ort der Entzündung locken (Huang et al., 2001). In murinen Makrophagen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expressionsmuster der eingesetzten Stimuli, LPS und CpG, differierten (Gao et al., 2002). Für bronchiale Epithelzellen ist eine solche vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen unterschiedlichen Erregern bislang nicht beschrieben worden.

Es fanden sich 520 individuelle Gene (701 probe sets), die auf mindestens einen der Stimuli reguliert waren. Zunächst war auffällig, dass *S. aureus* nur eine geringe Zahl an Genen regulierte und weitgehend inaktiv war. Das unterstreicht und bestätigt die vorherigen Ergebnisse einer Hyporesponsivität von bronchialen Epithelzellen auf Stimulation mit *gram-positiven* Bakterien oder manchen TLR2 Liganden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass *S. aureus* nicht in der Lage war, in bronchialen Epithelzellen eine zusätzliche Gruppe von Genen zu induzieren, die nicht primär mit der Abwehr von Infektionen assoziiert sind. Die Kernantwort, die durch *RSV* und *P. aeruginosa* reguliert wurde, bestand aus 86 individuellen Genen, die hauptsächlich drei Funktionen zugeordnet werden konnten: Inflammatorische Signalgebung, Chemoattraktion und Regulation von Apoptose. Dazu gehören vor allem Chemokine, proinflammatorische Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen. Viele der hier identifizierten Gene, die in einer Kernantwort reguliert wurden, entsprechen einer „allgemeinen Wirtsantwort“ nach Infektion, da diese Gene in vielen verschiedenen Zellarten (Makrophagen, DCs, PBMCs, Epithelzellen und Fibroblasten) nach Exposition mit unterschiedlichen Pathogenspezies induziert wurden (Jenner and Young, 2005). Obwohl verschiedene Zelltypen, sowohl professionelle Immunzellen, als auch Nicht-Immunzellen, spezialisiert sind für unterschiedliche Anforderungen, erfolgt als Antwort auf Pathogenkontakt die Heraufregulation eines universellen „Kern-Sets“ an Genen. Somit scheint ein stabiles transkriptionelles Programm, ein generelles Alarmprogramm für Infektionen, zu existieren. Dieses universelle „Infektions-Transkriptom“ beinhaltet Gene, die Entzündung vermitteln und die Immunantwort aktivieren oder limitieren (Jenner and Young, 2005). Zu den Entzündungs-vermittelnden Genen gehören Gene, die für Entzündungsmediatoren kodieren, z.B. TNF, IL1 $\beta$ , IL6, IL8, Chemokine wie CCL3, CCL4, CCL20, CXCL1, CXCL2 und

CXCL3, welche weitere Zellen an den Ort der Entzündung locken. Diese Gene werden von Makrophagen, DCs, Leukozyten, PBMCs, Vollblut und Epithelzellen nach mikrobieller Exposition hin induziert (Jenner and Young, 2005; Huang et al., 2001). In anderen Studien mit RSV-infizierten Epithelzellen wurden diese Gene ebenfalls identifiziert (Zhang et al., 2001; Harris and Werling, 2003; Martinez et al., 2007). Eine Vielzahl dieser Entzündungs-vermittelnden Gene wurden in der hier vorgelegten Arbeit ebenfalls stark induziert (CCL2, CCL20, IL6, IL8, CXCL2, 2, 3).

Gene, die eine Immunantwort aktivieren, kodieren für Komponenten der inflammatorischen Signalgebung und bestimmte Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören BCL3 (ein Koaktivator für NF- $\kappa$ B), die AP-1 Komponenten JUN, JUNB und FOSL2, IRF1, 4, 7, STATs, „cAMP-responsive-element“-bindende Proteine wie ATF3, ATF4 und CREM, sowie die Adaptoren MyD88 und TRAF6. Auch in dieser Kategorie wurden in den hier gezeigten Experimenten einige Gene induziert, wie z.B. ATF3, BCL3, IRF1 und JUNB, was ein Hinweis dafür ist, dass die Induktion einer Immunantwort über eine verstärkende Rückkoppelung („feed-back-loop“) kontrolliert wird, bei dem Aktivatoren der Transkription sich selbst und andere Gene aktivieren und induzieren. Weiter fanden sich Gene, die bei einem universellen Infektions-Transkriptionsprogramm als Negativ-Regulatoren einer Immunantwort beschrieben wurden (z.B. TNFAIP3, die DUSP-Proteine und BIRC3). Weitere Gene wie ICAM-1 und diversen Matrix-Metalloproteinasen wurden einem weiteren universellen Transkriptionsprogramm zugerechnet, welches Gene für Lymphozytenaktivierung (CD80, CD83, CD86 und CD40), Antigenpräsentation (HLA-E, HLA-F und HLA-G), Zelladhäsion (ICAM-1 und ITGA5) und Gewebeumbau (MMP1, 7, 10, 12, 14 und 19) enthält. Dieses universelle Transkriptionsprogramm könnte auch die große Anzahl der gleichartig regulierten Gene zwischen RSV und *P. aeruginosa* auf bronchialen Epithelzellen erklären. Zusätzlich wird das F-Protein von RSV vermutlich über TLR4 erkannt (Kurt-Jones et al., 2000), was den Epithelzellen eine Erkennung von RSV über TLR3 und TLR4 ermöglichen würde.

RSV regulierte wesentlich mehr Gene als *P. aeruginosa*. Die meisten durch RSV regulierten Gene sind in die Regulation von Transkription und Nukleinsäuremetabolismus und in antiapoptotische Signalkaskaden involviert, was die Notwendigkeit eines Virus zu replizieren widerspiegelt. Die vorgelegten Daten zeigen auch, dass RSV keine IFN-Antwort in bronchialen Epithelzellen induzieren konnte, wohingegen *P. aeruginosa* Gene induzierte, die durch IFN reguliert wurden (z.B. IFNAR2, ISG20 und IFIT1). Das ist ein Hinweis für die Aktivierung von bronchialen Epithelzellen über den TLR4-TRIF Signalweg. Für RSV wurde beschrieben, dass es in Atemwegsepithelzellen den IFN-JAK-STAT Signalweg über die Degradierung von STAT2 hemmen kann (Ramaswamy et al., 2004). In A549 Zellen konnte beobachtet werden, dass zu frühen Zeitpunkten nach der RSV Infektion (0-6 h) Gene reguliert wurden, die in folgende Prozesse eingeordnet werden konnten: Zellproliferation, Proteinmetabolismus und Zytoskelettorganisation. Interferon-induzierte Gene (ISGs) wurden erst zu späteren Zeitpunkten induziert (6-12 h), was erklären könnte, weshalb hier keine IFN-regulierten Gene nach Stimulation mit RSV festgestellt wurden. Dabei wurden Unterschiede zwischen verschiedenen

RSV-Stämmen beobachtet. Der hier verwendete A2-Stamm war dabei als schwacher Induktor von ISGs beschrieben worden (Martinez et al., 2007).

In bronchialen Epithelzellen konnte nach Kontakt mit *P. aeruginosa* beobachtet werden, dass zuerst Gene induziert wurden, die an der Regulation der Architektur des Zytoskeletts beteiligt sind, wie z.B. keratin 17, myosin IE, claudin 1 und endothelin 1. Das impliziert, dass Epithelzellen zuerst die physikalische Barriere verstärken um Infektionen abzuwehren (Vos et al., 2007). In den hier vorgelegten Daten konnte zudem eine massive Regulation verschiedener Matrix-Metalloproteinasen nach Stimulation mit RSV und *P. aeruginosa* beobachtet werden. Vos et. al konnten beobachten, dass eine weitere prominente Gruppe, die Chemokine, reguliert wurde, was sich ebenfalls in den hier gezeigten Daten widerspiegelt. Die massive Induktion von Chemokinen konnte ebenso in BEAS-2B Zellen nach Kontakt mit *B. pertussis* beobachtet werden (Belcher et al., 2000). Da *B. pertussis* wie *P. aeruginosa* zu der Gruppe der gram-negativen Stäbchen gehört, die beide über das an der Oberfläche exponierte LPS von TLR4 erkannt werden (Banus et al., 2006; Mann et al., 2005), ist die Induktion überlappender Genmuster nicht überraschend. Generell lässt sich feststellen, dass die Phase der früh induzierten Antwortgene in bronchialen Epithelzellen vor allem aus Zytokinen, Chemokinen, Proteinase Inhibitoren und Komponenten der epithelialen Barrierefunktion besteht (Vos et al., 2007).

Diese Daten sprechen Epithelzellen die Eigenschaft zu, eine Immunantwort zu induzieren, die teilweise pathogen-spezifisch ist und zum anderen einer universellen Kern-Antwort auf mikrobielle Exposition hin entspricht. Dies unterstreicht die Funktion von Epithelzellen als einfache Immunzellen, die neben den konstitutiven mechanischen und chemischen Schutzfunktionen auch aktiv in eine Immunantwort eingreifen können.

## 5.2 Mikromilieu „Bronchiale Grenzfläche“

Epithelien bilden die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen. Das mukosale Immunsystem besteht aus verschiedenen sekundären lymphatischen Geweben, die an unterschiedlichen Orten im Körper lokalisiert sind. Zu dem mukosalen lymphatischen Gewebe (MALT – mucosa-associated lymphoid tissue) werden unter anderem der Gastrointestinaltrakt (GALT – gut-associated lymphoid tissue) (McGhee et al., 2007) und die Bronchien (BALT – bronchus-associated lymphoid tissue) (Sminia et al., 1989) gezählt. Zu dem sich im Gastrointestinaltrakt befindenden sekundären lymphatischen Organen (GALT) gehören die Lymphknoten und Peyerschen Platten. Die Peyerschen Platten bestehen aus dicht aneinanderliegenden Lymphfollikel, in die Lymphozyten eingewandert sind. Das darüber lokalisierte intestinale Epithel weist spezialisierte Zellen (M-Zellen) auf, die Antigene aufnehmen und an die darunter gelegenen DCs oder Makrophagen weitergeben können (Neutra et al., 2001). Ein weiterer Mechanismus der Antigenaufnahme ist die Fähigkeit von ortsständigen DCs, die „tight junctions“ des intestinalen Epithels zu eröffnen, ihre Ausläufer durch die Epithelzellen in das Darmlumen hineinzuschieben und direkt Antigene aufzunehmen (Rescigno et al., 2001). Da der Darm von einer kommensalen Mikroflora besiedelt ist, welche potentiell den gleichen Besatz an TLR-Liganden tragen wie

pathogene Erreger, müssen regulatorische Mechanismen existieren, um eine permanente Entzündungsreaktion zu vermeiden und Homöostase im Darm bzw. epitheliale Integrität zu erhalten. Für mukosale DCs wurde beschrieben, dass diese in der Lage sind, vorzugsweise T-Zelldifferenzierung in Richtung  $T_{H2}$  zu begünstigen und B-Zellen zur Immunglobulin A Sekretion zu aktivieren. (Akbari et al., 2001; Lambrecht et al., 2000; Sato et al., 2003; Alpan et al., 2001; Iwasaki and Kelsall, 2001). Dies trägt maßgeblich zu einem anti-entzündlichen Mikromilieu bei. Dem Epithel wird dabei eine große Rolle zugeschrieben. Mukosale DCs werden durch lösliche Faktoren des intestinalen Epithels dahingehend konditioniert, dass diese verglichen mit DCs aus den Lymphknoten, weniger MHC-II, CD80 und CD86 exprimieren und mehr IL-10 und TGF- $\beta$  sezernieren. Zusätzlich zeigten diese konditionierten DCs eine geringere T-Zellaktivierung und bildeten weniger proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und TNF (Butler et al., 2006). Als mögliche modulierende Faktoren wurden TGF- $\beta$  und TSLP beschrieben (Butler et al., 2006; Rimoldi et al., 2005; Zhou et al., 2005; Zaph et al., 2007).

Die Haut unterliegt permanenter mikrobieller Exposition. Dennoch kommt es nicht zu einer chronischen T-Zellaktivierung in den efferenten Lymphknoten der Haut. Dazu wurde von Ritter et al. im Modell der Hautleishmaniose folgender Toleranzmechanismus vorgeschlagen (Ritter and Osterloh, 2007): Während der frühen Phase der Infektion mit *Leishmania major* transportieren Langerhans Zellen (eine Dendritenpopulation der Epidermis) Selbstantigene zu den regionalen Lymphknoten und induzieren dadurch Selbsttoleranz. Ortsständige Makrophagen phagozytieren die Parasiten und rekrutieren Dendritische Zellen aus dem Blut in die Dermis. Diese DCs prozessieren *L. major* Antigene, migrieren in die äußere Region des Parakortex im Lymphknoten und aktivieren antigenspezifische T-Zellen, die daraufhin proliferieren und zu  $T_{H1}$ -Zellen differenzieren. Diese T-Zellen wandern zu dem Ort der Infektion und aktivieren infizierte Makrophagen, die dann den Parasiten eradizieren. In der späten Phase der Infektion sind die meisten Parasiten eliminiert. Die Langerhans Zellen haben die Epidermis neu besiedelt und können dort freie *L. major* Antigene aufnehmen. Diese Zellen wandern dann ebenfalls in die äußere Region des Parakortex im Lymphknoten ein und präsentieren dort das Antigen. Dies führt zu einer Aktivierung von T-Zellen, welche T-Effektorzellen inhibieren können, was die gesamte Immunantwort abschaltet. Dieses Modell beschreibt einen Langerhans-Zell vermittelten Toleranzmechanismus der Epidermis, die permanent mikrobiellen Kontakt ausgesetzt ist. Erst wenn ein Erreger in die Dermis gelangt, wird eine Immunantwort aktiviert. Das führt letztlich zur Erhaltung der epidermialen Integrität und vermeidet unkontrollierte Entzündungsreaktionen. Welche Rolle die Epithelzellen dabei spielen ist bislang nicht ausreichend untersucht worden.

Die Lunge ist wie der Darm kein steriles Organ. Viele Bereiche der Atemwege kommen auf Grund des Luftstroms regelhaft mit Keimen in Kontakt. Auch in der Lunge gibt es Hinweise auf eine „anti-inflammatorische“ Umgebung, was veränderte alveolare DCs zur Folge hat und zur Homöostase der Lunge beiträgt (Bingisser and Holt, 2001; Takabayshi et al., 2006). Takabayshi et al. beschrieben einen kontaktabhängigen Inhibitionsmechanismus, bei dem Alveolar-Epithelzellen membran-ständiges

TGF- $\beta$  über Integrine den Alveolar-Makrophagen präsentieren. Das führt zu einer tonischen Inhibition der Makrophagen, die jedoch durch mikrobielle Aktivierung aufgehoben werden kann. Bronchiale Epithelzellen sind zudem in der Lage Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) zu sezernieren, von denen beschrieben wurden, dass sie sowohl auf T-Zellen und Alveolar-Makrophagen als auch auf Dendritische Zellen inhibierend wirken können (Bingisser and Holt, 2001).

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass bronchiale Epithelzellen einen Einfluss auf funktionelle und phänotypische Charakteristika von professionellen Immunzellen haben. Damit werden Konzepte der Immunregulation im Darm und in der Haut durch Epithelzellen auf das Kompartiment Lunge/Bronchien erweitert.

### **5.2.1 Homöostatische Inhibition professioneller Immunzellen durch bronchiale Epithelzellen**

Es zeigte sich, dass eine Koinkubation von BEAS-2B Zellen und gereinigten CD14<sup>+</sup> Blutmonozyten zu einer Inhibition der LPS induzierten TNF Sekretion von CD14<sup>+</sup> Zellen führte. TNF war ein geeigneter Messparameter, da bronchiale Epithelzellen selbst nicht in der Lage sind, TNF zu sezernieren. Die Inhibition nahm mit steigender Zahl bronchialer Epithelzellen zu. Die Koinkubation dieser beiden Zelltypen in einem Transwellsystem sollt Aufschluss darüber geben, ob der beobachtete inhibitorische Effekt durch einen löslichen, von den Epithelzellen sezernierten, Faktor vermittelt wurde. Tatsächlich war eine Hemmung im Transwellsystem zu beobachten, die allerdings schwächer ausfiel als bei zusätzlichem Zell-Zell Kontakt. Die Zellen befinden sich im Transwellsystem in räumlicher Trennung. Daher benötigt es eine gewisse Zeit, bis sich ein löslicher Faktor angereichert hat und auf die Monozyten wirken kann. In direkter Kokultur kann der sezernierte Faktor unmittelbar wirken. Wie sich herausstellte war jedoch auch die Dauer der Konditionierung des Epithelzellüberstandes entscheidend. Es zeigte sich, dass eine Zeitspanne von mindestens 48 h benötigt wurde, um einen ausreichend guten Hemmeffekt beobachten zu können. Der zuvor erwähnte Transwellversuch wurde für 24 h durchgeführt. Dieser Zeitraum scheint somit nicht ausreichend lange, damit bronchiale Epithelzellen genügend inhibitorischen Faktor konstitutiv in den Überstand sezernieren können. Dennoch war eine Hemmung der TNF-Freisetzung in einer Transwellkokultur zu beobachten, was auf einen löslichen Faktor schließen lässt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein direkter Zell-Zell Kontakt wie er von anderen beschrieben wurde (Takabayshi et al., 2006), als zusätzlichen Inhibitionsmechanismus eine Rolle spielt. Die Autoren dieser Arbeit konnten zeigen, dass Alveolar-Makrophagen über membranständiges TGF- $\beta$  auf alveolären Epithelzellen in ihrer Aktivität inhibiert wurden. Die Bedeutung eines sezernierten, inhibitorischen Faktors wurde in der Literatur für den Darm bereits postuliert (Butler et al., 2006; Smythies et al., 2005; Rimoldi et al., 2005). Der Effekt des konditionierten Überstandes war titrierbar. Dabei zeigte sich, dass humane Monozyten wesentlich sensibler reagierten als Dendritische Zellen. Der inhibitorische Effekt des Epithelzell-Überstandes konnte auch im murinen System verifiziert werden: Überstand von primären trachealen Epithelzellen hemmte die LPS-induzierte IL-12 und TNF-Freisetzung von knochenmarksgenerierten DCs.

Außerdem zeigte sich, dass die Inhibition professioneller Immunzellen spezifisch für epithelialen Überstand war. Dabei bestätigte sich der inhibitorische Effekt auf die Zytokinfreisetzung in Monozyten mit Überstand aus einer anderen humanen Epithelzelllinie (IHAEo<sup>+</sup>), sowie in den oben erwähnten murinen Versuchsansätzen. Dahingegen waren Überstände von Zellen anderer embryonaler Herkunft (HEK und PBMCs) nicht in der Lage, einen inhibitorisch wirkenden Faktor zu sezernieren. Das unterstreicht das Konzept von Eyal Raz (Raz, 2007), dass organspezifische Regulationsmechanismen existieren müssen, um in nicht-sterilen Organen eine permanente Entzündungsreaktion zu vermeiden. In sterilen Kompartimenten wie dem Blut stellen mikrobielle Substanzen eine Gefahr dar und müssen erkannt bzw. eliminiert werden. Daher sollten Monozyten und Lymphozyten (PBMCs) keinen inhibitorischen Faktoren ausgesetzt sein. Es liegt daher nahe, dass PBMCs keinen hemmend wirkenden Faktor in den Überstand freisetzen. Ähnlich verhält es sich bei Fibroblasten (HEK293-Zellen). Das Bindegewebe ist als steril zu betrachten und ist kein Kompartiment, das häufiger mikrobieller Exposition ausgesetzt ist. Daher muss kein anti-inflammatorisches und homöostatisches Milieu für professionelle Immunzellen geschaffen werden. Somit ist auch nicht zu erwarten gewesen, dass HEK293-Zellen einen auf professionelle Immunzellen inhibitorisch wirkenden Faktor in den Überstand sezernieren.

Als Zytotoxizität bezeichnet man die Fähigkeit von Substanzen, Gewebezellen zu schädigen. Dies lässt sich auch im Durchflusszytometer mittels Propidiumiodid und Annexin-V Färbung nachweisen (Vermees et al., 1995). Es zeigte sich, dass der epitheliale Überstand keinen negativen Einfluss auf das Überleben von Monozyten hatte, während gleichzeitig die Sekretion von TNF nach LPS Stimulation gehemmt wurde. Darüberhinaus führte der Epithelzellüberstand sogar zu einer leicht verbesserten Vitalität der Zellen. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits für DCs und Überstand aus Darmepithelzellen gemacht werden. Dabei wurde mittels einer Annexin-V/7AAD Färbung im FACS gezeigt, dass die Kokultur von humanen DCs und einer intestinalen Epithelzelllinie keinen Einfluss auf die Vitalität der DCs hatte, die bei über 90% lag (Butler et al., 2006). Der hier mit bronchialem Epithelzell-Überstand durchgeführte Zytotoxizitätsassay auf Monozyten zeigte ebenfalls über 90% lebende Zellen. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die beobachteten inhibitorischen Effekte auf eine zytotoxische Wirkung des Überstandes zurückzuführen waren.

### **5.2.2 Einfluss von Epithelzellen auf die funktionellen Eigenschaften antigen-präsentierender Zellen**

Es wurde für humane intestinale Makrophagen gezeigt, dass diese über TGF- $\beta$ , das von Stromazellen sezerniert wird, in ihrer Zytokinfreisetzung gehemmt wurden. Die Phagozytose- und bakterizide Aktivität hingegen blieb unbeeinflusst (Smythies et al., 2005). In der Lunge sind Alveolar-makrophagen die ersten phagozytierenden Zellen, die eindringende Mikroorganismen aufnehmen und prozessieren können. Die vorgelegte Arbeit zeigt ebenfalls, dass die Phagozytoseleistung von Monozyten durch Epithelzellüberstand nicht negativ beeinflusst ist. Der Überstand alleine führte bereits zu einer Erhöhung der Phagozytoseaktivität, welche mit LPS noch gesteigert werden konnte.

Die Initiation von T-Zellantworten benötigt mehrere Rezeptoren, die ihre Liganden auf den Antigenpräsentierenden Zellen erkennen: Der T-Zellrezeptor erkennt MHC-assoziierte Peptidantigene, CD4 oder CD8 Korezeptoren binden an das MHC Molekül und Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 binden an ICAM-1 auf der APC und verstärken somit die Bindung. Zusätzlich werden von der T-Zelle kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80 und CD86) auf den APCs erkannt (Grewal et al., 1996; Borriello et al., 1997). Kostimulatorische Moleküle werden nach Kontakt mit mikrobiellen Substanzen auf antigenpräsentierenden Zellen heraufreguliert und sind als Sekundärsignal essentiell für eine ausreichende und vollständige Aktivierung naiver T-Zellen.

Hier konnte beobachtet werden, dass die Stimulation von humanen CD14<sup>+</sup> Zellen mit LPS in einer deutlichen Heraufregulation von CD40 und einer schwachen Regulation von CD80 resultierte. CD86 hingegen blieb unbeeinflusst. Dabei wurde womöglich nicht für alle drei Moleküle der optimale Zeitpunkt gewählt. In unserer Arbeitsgruppe konnte die Beobachtung gemacht werden, dass für CD86 und MHC II auf murinen BMDDCs eine siebenstündige Stimulation bereits ausreichend war, um eine maximale Heraufregulation zu beobachten. Die Expression der beiden Oberflächenmoleküle war nach 20 stündiger Stimulationsdauer kaum noch zu beobachten (Spille, 2006).

Es zeigte sich, dass der Überstand aus bronchialen Epithelzellen keinen aktivierenden oder inhibierenden Einfluss auf die Regulation von CD40, CD80 und CD86 hatte, wie das zuvor für den Darm beschrieben wurde (Butler et al., 2006). Im murinen System hingegen inhibierte der Überstand aus primären trachealen Epithelzellen deutlich die LPS induzierte Regulation von kostimulatorischen Molekülen. BMDDCs zeigten auf LPS Stimulation hin eine vermehrte Expression von CD40 und CD86, was für Makrophagen und reife DCs bereits beschrieben wurde (Hoebe et al., 2003b; Banchereau and Steinman, 1998). CD80 wurde nach Stimulation mit LPS ebenfalls induziert, jedoch wirkte der Überstand schon ohne jegliche Stimulation aktivierend auf die Expression von CD80, was dafür sprechen könnte, dass der Überstand Substanzen enthält, welche die Zellen aktivieren können. Dennoch scheint der Überstand keine Reifung der DCs zu fördern, da der Überstand keine IL-12 Sekretion induzierte. Ähnliche Befunde wurden für Dendritische Zellen beschrieben, die mit konditioniertem Überstand aus intestinalen Epithelzellen inkubiert wurden. Diese DCs zeigten ebenfalls eine erhöhte CD80 und MHC II Expression nach Inkubation mit Epithelzell-Überstand. Die Expression konnte zudem durch Aktivierung mit *Salmonella typhimurium* noch gesteigert werden. Zusätzlich wurde keine Sekretion von IL-12 in Anwesenheit von epitheliale Überstand beobachtet (Rimoldi et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigten Butler et al., dass die Kokultur von intestinalen Epithelzellen mit DCs, die Zell-Zell Kontakte hatten, zu einer Reduktion der MHC II und CD86 Expression um 60% und 35% führte. Zudem konnten sie diese Inhibition auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auch auf Überstand-konditionierten DCs nachweisen (Butler et al., 2006). Der beobachtete Phänotyp dieser DCs korreliert stark mit dem *in situ* beobachteten Phänotyp im Gastrointestinaltrakt (Bell et al., 2001; Rigby et al., 2005). Für die Wirkung von bronchialen Epithelzell-Überständen auf DCs gibt es gegenteilige Befunde. Es wurde für bronchiale Epithelzellen auch beschrieben, dass in Kokultur mit unreifen DCs diese zu einer erhöhten Expression von CD80

und CD86 aktiviert werden. Zusätzlich scheinen bronchiale Epithelzellen zur Reifung von DCs beizutragen, da Oberflächenmoleküle wie CD83 und CCR7 verstärkt exprimiert wurden. (Pichavant et al., 2003). In dieser Arbeit wurde die Regulation kostimulatorischer Moleküle nicht auf DCs sondern auf humanen Monozyten untersucht. Der humane Epithelzell-Überstand scheint auf Monozyten keinen Einfluss auf die Regulation kostimulatorischer Oberflächenmoleküle zu haben. Die Regulation der kostimulatorischen Moleküle in murinen DCs hingegen scheint zum einen sehr viel deutlicher ausgeprägt zu sein und zum anderen durch epithelialen Überstand moduliert zu werden. Möglicherweise ist die konstitutive Sekretion eines inhibitorischen Faktors in den Überstand in den primären murinen Zellen deutlich ausgeprägter als in den verwendeten humanen Epithelzelllinien. Die primären murinen Zellen bilden im Gegensatz zu der humanen Zelllinie, eine ausdifferenzierte Epithelzellschicht. Es wäre daher sinnvoll, die inhibitorische Kapazität von Überstand aus primären humanen ALI-Kulturen (ALI: „air liquid interface“) auf die Expression kostimulatorischer Moleküle zu analysieren.

### 5.2.3 Einfluss von Epithelzellen auf T-Zellen

Eine verminderte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle, wie im vorherigen Kapitel geschildert wurde, müsste mit einer reduzierten Kapazität zur T-Zellaktivierung einhergehen. Die Proliferation von T-Zellen kann als Messparameter für die Aktivierung herangezogen werden. Dazu wurden DCs, die aus humanen CD14<sup>+</sup> Monozyten gereift wurden, mit Überstand aus bronchialen Epithelzellen für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Nach sorgfältigen Waschschritten wurden zu den konditionierten DCs T-Zellen eines allogenen Spenders gegeben und nach 96 h die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Dauer der Konditionierung der DCs mit dem epithelialen Überstands entscheidend war für die verminderte Fähigkeit, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Nach 48 stündiger Koinkubation von DCs mit epitheliale Überstand reduzierte sich die induzierte T-Zellproliferation um ein Drittel. Somit konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen durch das bronchiale Epithel so verändert werden können, dass diese eine reduzierte T-Zellaktivierung induzieren. Das entspricht Daten den Daten einer anderen Arbeitsgruppe (Butler et al., 2006), die den inhibitorischen Einfluss von intestinale Epithel auf Dendritische Zellen beobachten konnten. Die aus CD14<sup>+</sup> Zellen gereiften DCs wurden in der zitierten Arbeit entweder in einem Transwellssystem oder mit direktem Zellkontakt mit einer intestinalen Epithelzelllinie (Caco-2) inkubiert. Verglichen mit unbehandelten DCs waren sowohl die Überstand-konditionierten, als auch die über Zell-Zell Kontakt beeinflussten DCs schlechter in der Lage, in einer allogenen, gemischten Leukozytenreaktion T-Zellproliferation zu induzieren. Die hier erhobenen Ergebnisse wurden mit einem alternativen Test bestätigt, bei dem die T-Zellen mit CFSE angefärbt wurden und die Proliferationsrate im Durchflusszytometer bestimmt wurde. Es fiel auf, dass in diesem Versuchsansatz die Effizienz der Proliferationsinhibition deutlich stärker ausfiel. Da bei diesem Versuchsansatz sowohl DCs als auch T-Zellen in Anwesenheit des Überstandes inkubiert wurden, lag der Schluss nahe, dass der Epithelzellüberstand T-Zellen unmittelbar beeinflussen könnte. Um diese These weiter

zu stützen, wurden T-Zellen DC unabhängig aktiviert. Dazu wurden Kügelchen verwendet, an deren Oberfläche Antikörper gegen CD2, CD3 und CD28 gekoppelt waren. Diese Antikörper-gekoppelten Kügelchen imitieren antigenpräsentierende Zellen und können T-Zellen zur Proliferation anregen (Game et al., 2005; Oberg et al., 2006). Die Induktion der T-Zellproliferation fiel schwächer aus als mit DCs, war jedoch deutlich induzierbar. Der Einfluss des epithelialen Überstandes wurde in diesem experimentellen Ansatz untersucht. Tatsächlich zeigte sich, dass der Epithelzell-Überstand inhibitorisch auf die DC-unabhängig aktivierte T-Zellproliferation wirkte. Überraschenderweise war diese Inhibition auch 24 h nach erfolgter Aktivierung noch zu beobachten.

Die inhibitorische Wirkung des epithelialen Überstandes auf verschiedene professionelle Immunzellen könnte maßgeblich zur Regulation einer unkontrollierten Entzündungsreaktion in einem nicht sterilen Organ wie der Lunge beitragen und somit epitheliale Integrität und Homöostase gewährleisten.

### **5.3 Partielle Charakterisierung des inhibitorischen Prinzipes in Epithelzell-Überstand**

Die Transwellversuche und Übertragungsexperimente gaben Aufschluss darüber, dass es sich bei dem inhibitorischen Prinzip von bronchialen Epithelzellen um einen löslichen Faktor handelte. Als negativ regulierende Zytokine sind z.B. IL-10 und TGF- $\beta$  bekannt. Für die Lunge werden in der Literatur verschiedene weitere immunmodulierende Mechanismen über Zytokine, Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine (wie z.B. PGE<sub>2</sub>) oder über Zell-Zell-Kontakte diskutiert (Bingisser and Holt, 2001). Stickstoffmonoxid, welches in der Lunge von bronchialen Epithelzellen produziert werden kann, inhibiert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF von Alveolar-Makrophagen (Dinakar et al., 1999). NO supprimiert ebenso die T-Zellproliferation (Eriksson et al., 2005) und inhibiert die Reifung von Dendritischen Zellen (Paolucci et al., 2000). PGE<sub>2</sub> wird von bronchialen Epithelzellen sezerniert (Folkerts and Nijkamp, 1998), kann auf DCs wirken (Harizi and Gualde, 2006) und Alveolar-Makrophagen und T-Zellen deaktivieren (Kawano et al., 1999). TGF- $\beta$  kann in großen Mengen in der Lunge nachgewiesen werden. Für Alveolar-Makrophagen konnte ein inhibitorischer Mechanismus über membranständiges TGF- $\beta$  gezeigt werden. Dabei präsentieren Alveolar-Epithelzellen über Integrine TGF- $\beta$  den Alveolar-Makrophagen, die den TGF- $\beta$  Rezeptor an ihrer Oberfläche tragen. Damit befinden sich die Alveolar-Makrophagen in einem Zustand tonischer Inhibition. Mikrobielle Erreger werden von den Alveolar-Makrophagen erkannt, die darauf hin aktiviert werden. Das hat eine veränderte Zellstruktur zu Folge, welche die Bindung zwischen TGF- $\beta$  Rezeptor und TGF- $\beta$  bzw. Integrin unterbricht. Daraufhin wird der Alveolar-Makrophage aus der Inhibition entlassen (Takabayshi et al., 2006). Auch im Darm wurde TGF- $\beta$  als möglicher inhibitorischer Faktor diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Stromazellen TGF- $\beta$  produzieren, welches die LPS induzierte TNF Freisetzung in Monozyten inhibiert. Diese Inhibition konnte durch Zugabe eines blockierenden TGF- $\beta$  Antikörpers umgekehrt werden (Smythies et al., 2005). Im Darm wurde ein weiterer löslicher Faktor, TSLP, als ursächlich für die Induktion tolerogener DCs und

Erhaltung von Homöostase diskutiert (Soumelis et al., 2002; Rimoldi et al., 2005). TSLP konnte auch in der Lunge nachgewiesen werden (Lee and Ziegler, 2007; Al-Shami et al., 2005; Zhou et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass TSLP in der Lunge eine  $T_H2$  Differenzierung indirekt über veränderte DCs fördert und eine wichtige Rolle bei der Entstehung von entzündlichen und allergischen Reaktionen hat (Al-Shami et al., 2005; Zhou et al., 2005).

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Sensitivität der inhibitorischen Komponente gegenüber Hitze getestet, indem die verschiedenen Überstände bei 100°C gekocht wurden. Es zeigte sich, dass die Hitzebehandlung des Kontrollmediums und des Überstandes von PBMCs keine Veränderung bezüglich der LPS induzierten TNF Freisetzung von  $CD14^+$  Monozyten zeigten. Unbehandelte und hitzebehandelte Überstände zeigten keine Inhibition oder Aktivierung. Der epitheliale Überstand hingegen zeigte nach der Hitzebehandlung einen Rückgang der inhibitorischen Wirkung. Es werden durch die Erhitzung sämtliche Sekundärstrukturen zerstört und somit Proteine denaturiert, die in diesem Zustand möglicherweise nicht mehr von der Zelle erkannt werden können, sodass dies als Hinweis auf ein Protein als inhibitorischer Faktor betrachtet wurde.

IL-10 konnte als inhibitorischer Faktor schnell ausgeschlossen werden, da nur eine sehr geringe Kopienzahl mittels quantitativer RT-PCR detektiert werden konnte und im Überstand kein Protein nachgewiesen wurde.

Die oben diskutierten inhibitorischen Zytokine konnten ebenfalls mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass die vorliegende Kopienzahl von TGF- $\beta$  mehr als 100-fach höher war als die von TSLP. Die TGF- $\beta$  Proteinmenge stieg über die Zeit hin an und erreichte nach 48 Stunden einen durchschnittlichen Wert von 1 – 1,5 ng/ml. Werte in ähnlicher Größenordnung wurden von anderen in bronchialen Epithelzellen beschrieben (Mio et al., 1998). Für TSLP stand kein ELISA zur Verfügung.

### **5.3.1 Einfluss des in bronchialen Epithelzellüberstand enthaltenen TGF- $\beta$ auf Monozyten und T-Zellen**

Die Rolle von TGF- $\beta$  bei der inhibitorischen Wirkung auf Monozyten wurde mittels blockierender Antikörper und einem pharmakologischen Inhibitor untersucht. Der blockierende Antikörper hob die hemmende Wirkung von rekombinantem TGF- $\beta$  auf Monozyten auf. Der Isotyp zeigte keinerlei Wirkung auf rekombinantes TGF- $\beta$  und den epithelialen Überstand. Der spezifische Antikörper gegen TGF- $\beta$  konnte nicht den Hemmeffekt des Überstandes auf die TNF-Freisetzung von Monozyten aufheben. Die Ergebnisse wurden verifiziert, indem  $CD14^+$  Zellen mit SB431542 inkubiert wurden (einem selektiven Inhibitor der TGF- $\beta$  Typ 1 Rezeptorkinasen, wodurch die Signalgebung von TGF- $\beta$  unterdrückt wird). Die anschließende Zugabe von Überstand führte nach wie vor zu einer Hemmung der TNF-Sekretion, die vergleichbar war mit der Inhibition ohne SB431542. Das zeigte, dass TGF- $\beta$  keine Rolle in der Inhibition von Monozyten spielte. In der Literatur gibt es dazu unterschiedliche Befunde. Im Einklang mit der hier gezeigten Daten wird berichtet, dass die phänotypischen Veränderungen in intestinalen DCs durch die Zugabe eines blockierenden TGF- $\beta$ -Antikörpers nicht

verändert wurden (Butler et al., 2006). Andere jedoch zeigen eine klare Rolle für TGF- $\beta$  bei der Inhibition der Zytokinproduktion von intestinalen Makrophagen, wobei die Phagozytoseaktivität nicht durch TGF- $\beta$  beeinflusst wurde (Smythies et al., 2005). Die Autoren setzten im Gegensatz zu den hier gemachten Experimenten die 10-fache Antikörpermenge ein, zeigten jedoch keine Isotypkontrolle.

Zur Rolle von TGF- $\beta$  für Immunregulation und Erhaltung von Homöostase im adaptiven Immunsystem ist viel publiziert worden (Veldhoen and Stockinger, 2006; Li et al., 2006). TGF- $\beta$  ist essentiell für die Regulation von T-Zellantworten. TGF- $\beta$  hemmt T-Zellproliferation über eine Inhibition der IL-2 Sekretion. Des Weiteren inhibiert TGF- $\beta$  die Differenzierung von T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen und induziert regulatorische T-Zellen über die Induktion von FOXP3 Expression (Li et al., 2006; Wahl, 2007). Für TGF- $\beta$  ist auch beschrieben worden, dass es bei der Differenzierung der T<sub>H17</sub> Population eine entscheidende Rolle spielt (Wahl, 2007; Veldhoen et al., 2006; Li et al., 2006). Welche Rolle TGF- $\beta$ , welches in bronchialem Epithelzell-Überstand enthalten ist, bei der Suppression der T-Zellproliferation spielt, wurde mittels spezifischer, blockierender Antikörper untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle die Hemmung der T-Zellproliferation durch den spezifischen anti-TGF- $\beta$  Antikörper partiell neutralisiert werden konnte, was im Einklang mit der Literatur steht (Li et al., 2006). Jedoch konnte die Inhibition des epithelialen Überstandes auf T-Zellen nicht komplett durch die Anwesenheit von TGF- $\beta$  erklärt werden. Vielmehr scheint es sich dabei um ein multi-faktorielles Phänomen zu handeln, was nahelegt, dass wie bereits im Darm beschrieben (Soumelis et al., 2002; Rimoldi et al., 2005), weitere Faktoren, wie z.B. TSLP eine Rolle spielen könnten. Auch könnte die Inhibition durch NO verursacht werden, von dem beschrieben wurde, dass es von bronchialen Epithelzellen sezerniert wird und sowohl auf Alveolar-Makrophagen als auch auf T-Zellen deaktivierend wirkt (Paolucci et al., 2000; Dinakar et al., 1999; Eriksson et al., 2005). Ein weiterer möglicher löslicher Faktor, der von Atemwegsepithelzellen produziert wird und auf professionelle Immunzellen modulierend wirken kann ist PGE<sub>2</sub> (Folkerts and Nijkamp, 1998; Harizi and Gualde, 2006; Kawano et al., 1999).

#### **5.4 Etablierung der Isolation und Kultur muriner trachealer Epithelzellen**

Aufgrund der schwierigen Verfügbarkeit von primären humanen Epithelzellen und einer beträchtlichen Spendervarianz sollte im Rahmen meiner Doktorarbeit und der Diplomarbeit von Mario Mühmer (Muehmer, 2006) die Isolation und Kultur muriner trachealer Epithelzellen etabliert werden. Der Vorteil dieses Maus-Modells liegt in der leichten Zugänglichkeit muriner Zellen und langfristig in der Verwendung verschiedener „knock-out“ Modelle, um vor allem in Koinkubationsstudien mit professionellen Immunzellen differenzierte Fragestellungen zu bearbeiten. Dazu wurde nach dem Protokoll von Davidson et al. (Davidson et al., 2000) vorgegangen.

Um die Kulturen auf epitheliale Herkunft hin zu charakterisieren wurden immunhistochemische Färbungen durchführt, wobei sowohl Epithelzell-spezifische Marker als auch nicht-epitheliale Markerproteine angefärbt wurden.

Der Antikörper gegen "Pan-Cytokeratin" erkennt die humanen Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13, und 18 (Bartek et al., 1991; Fuchs et al., 1987), welche spezifisch für Zellen epithelialen Ursprungs sind. Die Zellen wiesen eine zytoplasmatische Färbung von filamentösen Zytoskelettstrukturen auf, die den Nukleus aussparte. In den meisten Präparationen konnten alle Zellen angefärbt werden, wobei es mit dieser Färbung schwierig war, eventuell kontaminierende Zellen zu identifizieren, da sich die Epithelzellen teilweise übereinander lagerten und einen sehr dichten Zellrasen bildeten.

Ein weiteres epitheliales Markerprotein ist E-Cadherin, von dem beschrieben wurde, dass es Adhäsion zwischen epithelialen Zellen vermittelt und mit der Zonula adherens assoziiert ist. Die Färbung mit E-Cadherin zeigte ebenfalls eine Nukleus-aussparende Färbung, die ebenfalls weitgehend alle Zellen anfärbte.

Ein weiteres Merkmal von Epithelzellen ist die Ausbildung von „tight junctions“. Das sind Zell-Zell Verbindungen, die eine parazelluläre Barriere bilden, sodass keine gelösten Stoffe frei diffundieren können. Damit assoziiert findet man ZO-Proteine (ZO: „Zonula occludens“), die mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers angefärbt wurden. Die Färbung war eindeutig nur an den Epithelzellgrenzen zu finden. Es war somit deutlich sichtbar, dass sich ein komplett geschlossener Zellrasen aus Epithelzellen gebildet hatte. Vereinzelt waren Zellen sichtbar, die keine membranäre Färbung aufwiesen, was vermutlich einer Kontamination durch Fibroblasten entspricht.

Um eventuelle zelluläre Kontaminanten zu identifizieren, wurden die Epithelzellkulturen mit nicht-epithelialen Markerproteinen gefärbt. Dazu verwendeten wir Antikörper gegen „smooth-muscle-Aktin“ und Vimentin. „Smooth-muscle-Aktin“ ist neben Myosin das Hauptprotein, welches für die zelluläre Fortbewegung, Phagozytose, Sekretionsapparat und sonstige zytoplasmatischen Bewegungen benötigt wird. „Smooth-muscle-Aktin“ wird vor allem in Muskelzellen und myeloiden Zellen wie Makrophagen exprimiert. Das sind beides Zelltypen, die bei der Isolierung trachealer Epithelzellen als Kontaminanten auftreten könnten. In Epithelzellen sollte „smooth-muscle-Aktin“ nicht nachweisbar sein (Davidson et al., 2000). Es wurden nach erfolgter Färbung verschiedene Gesichtsfelder einen Transwells ausgewertet. Es zeigte sich, dass in ca. 95% der ausgewerteten Gesichtsfelder ausschließlich „smooth-muscle-Aktin“-negative Zellen vorlagen. In ca. 5% konnten „smooth-muscle-Aktin“-positive Zellen beobachtet werden. Diese Zellen stellen vermutlich eine Kontamination durch myeloide Zellen dar.

Desweiteren wurde eine immunhistochemische Charakterisierung mit Vimentin durchgeführt, welches ein Typ-3 Intermediärfilament ist und zusammen mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli das Zytoskelett von Zellen bildet. Nach Ausdifferenzierung bleibt diese nur in Zellen mesenchymaler Herkunft erhalten, zu denen Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen zählen (Ferrari et al., 1986). Mit dieser Färbung können Fibroblastenkontaminationen sichtbar gemacht werden. Die isolierten trachealen Epithelzellen konnten nicht durch den Antikörper gegen Vimentin angefärbt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine Fibroblastenkontaminationen vorlagen. Die Spezifität des Antikörpers wurde in Mausfibroblasten (3T3-Zellen) überprüft, die Vimentin-positiv waren. Dabei wurde beobachtet, dass der Antikörper in der Lage war, Vimentin anzufärben (nicht gezeigte Daten).

Das ist in Übereinstimmung mit den Daten von Davidson et al., die ebenfalls keine Vimentin-positiven Zellen detektieren konnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die isolierten Epithelzellen nur geringfügig durch „smooth-muscle-Aktin“-positive Zellen kontaminiert waren. Im Wesentlichen lagen Pan-Cytokeratin, E-Cadherin und ZO-1-positiv, „smooth-muscle-Aktin“ und Vimentin-negative Zellen vor.

Weitere Charakterisierungen wurden mittels quantitativer RT-PCR und Messung des transepithelialen Widerstands durchgeführt. Es zeigte sich, dass der transepitheliale Widerstand über die Zeit zunächst anstieg, was ein Indiz für die Ausbildung von „tight-junctions“ war. „Tight-junctions“ sind charakteristisch für Epithelzellen, daher ist die Messung des transepithelialen Widerstandes eine zusätzliche Möglichkeit, um den isolierten Zellen Epithelcharakter zuzuschreiben (Davidson et al., 2000; Clarke et al., 1992). Im Mittel lagen die Werte bei  $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ . In der Literatur sind dabei Widerstandswerte von  $400 \Omega \times \text{cm}^2$  bis  $28 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$  zu finden (Davidson et al., 2000; Clarke et al., 1992). Wir verwendeten eine murine Makrohagenzelllinie (RAW 264.7), um Widerstandswerte zu ermitteln, die bei der Kultivierung von Zellen auftreten, die nicht in der Lage sind „tight-junctions“ auszubilden. Diese betragen  $7 \Omega \times \text{cm}^2$ , was schließen lässt, dass die Epithelzellen die charakteristischen Zell-Zell Verbindungen ausgebildet haben. Davidson et al. korrelierten den epithelialen Widerstand mit dem Grad der Differenzierung dieser Zellen, wobei Zellen mit niedrigen transepithelialen Widerstandswerten nicht in der Lage sein sollen, so zu differenzieren, dass sie Zilien ausbilden. Der Differenzierungsgrad der Epithelzellkultur wurde in dieser vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

Die Expression von Epithel-spezifischen Genen, wie  $\beta$ -Defensine und dem Chloridkanal CFTR konnte mittels quantitativer RT-PCR ausschließlich in den isolierten Epithelzellen nachgewiesen werden. Als Kontrollzellen dienten RAW 264.7 Zellen, in denen keine Expression nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde CD11b untersucht, welches spezifisch auf myeloiden Zellen exprimiert wird. Damit können geringfügige Kontaminationen von z.B. Makrophagen in der Epithelzellkultur detektiert werden. In der Tat konnte CD11b nicht nur in RAW Makrophagen gefunden werden, sondern auch in den isolierten Epithelzellen. Jedoch unterschied sich das Expressionsniveau um mehr als zwei Zehnerpotenzen, was letztlich auf eine minimale Kontamination schließen lässt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die unterschiedlichen Charakterisierungsmethoden den hier beschriebenen isolierten und kultivierten Zellen einen Epithelzellcharakter zuschreiben und die vorliegenden Kontaminationen als geringfügig betrachtet werden können. Die Etablierung der Isolation muriner trachealer Epithelzellen konnte erfolgreich abgeschlossen werden und steht somit für die Beantwortung verschiedener Fragestellungen zur Verfügung.

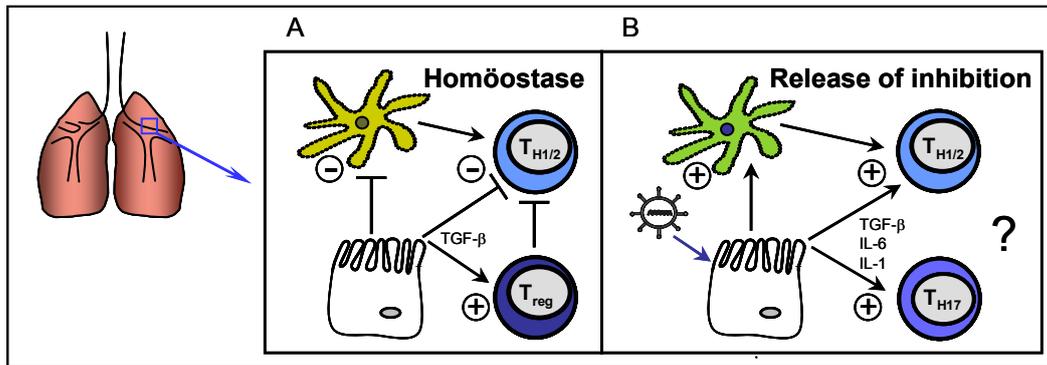
## 5.5 Ausblick

Die vorgelegten Daten schreiben bronchialen Epithelzellen neben einer rein physikalischen Barrierefunktion eine aktive Rolle in der Immunabwehr der Lunge zu. Es konnte gezeigt werden, dass sich Epithelzellen dabei eines bekannten Prinzip des angeborenen Immunsystems bedienen, der Expression von Mustererkennungsrezeptoren. Interessanterweise zeigte sich, dass bronchiale Epithelzellen über eine Regulation des Expressionsniveaus von TLR2 und der fehlenden CD36 Expression, bestimmte Erregerstrukturen und Erreger schlechter erkennen können. Dies könnte dazu beitragen, dass eine permanente, unkontrollierte Entzündungsreaktion in der Lunge vermieden wird. Zusätzlich bildet das Epithel ein anti-entzündliches Mikromilieu, in dem Monozyten, Dendritische Zellen und T-Zellen inhibitorisch beeinflusst werden, um Homöostase zu erhalten. Darüberhinaus konnte die Etablierung der Isolation und Kultivierung muriner, trachealer Epithelzellen erfolgreich abgeschlossen werden. Daraus ergeben sich weitere Forschungsfelder.

Die Frage des inhibitorischen Prinzips sollte weiter geklärt werden. Die Rolle von TSLP, NO und PGE<sub>2</sub> in dem hier benutzten System konnte bislang nicht zufriedenstellend geklärt werden. Dazu könnten blockierende Antikörper gegen TSLP in ähnlichem Ansatz wie bei TGF- $\beta$  verwendet werden. Zusätzlich könnte die Rolle von NO mittels e-NOS/i-NOS Inhibitoren untersucht werden. Die Beteiligung von PGE<sub>2</sub> bei dem inhibitorischen Einfluss epithelialen Überstandes auf professionelle Immunzellen wäre durch Behandlung der Epithelzellen mit Indomethazin (Prostaglandin-synthesehemmer) näher zu untersuchen.

Eine genauere Charakterisierung der Epithelzell-konditionierten DCs sollte vorgenommen werden. TSLP konditionierte DCs produzieren keine T<sub>H1</sub> polarisierende oder pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, IL-12, IFN, IP10 und IL-1 $\alpha/\beta$ ). Dafür produzieren diese Chemokine wie IL-8 und Eotaxin, welche Neutrophile und Eosinophile rekrutieren, sowie TARC und MDC, die T<sub>H2</sub> Zellen anlocken (Liu et al., 2006). Für die Wirkung von TSLP auf DCs wurde beschrieben, dass diese DCs vermehrt OX40L exprimieren, was zur Induktion von T<sub>H2</sub> Antworten beiträgt (Ito et al., 2005). Es sollte geklärt werden, ob die Epithelzell-konditionierten DCs einem „TSLP-DC“ Phänotyp gleichen.

Darüber hinaus wäre eine Charakterisierung der, durch epithelialen Überstand beeinflussten, T-Zellpopulationen sinnvoll. Für TGF- $\beta$  wurde beschrieben, dass es bei der Generierung von regulatorischen T-Zellen und T<sub>H17</sub> eine wichtige Stellgröße darstellt. Weiter ist beschrieben worden, dass dafür IL-1 und IL-6 ebenfalls essentiell sind. Beide Zytokine können von Epithelzellen nach Aktivierung durch einen mikrobiellen Stimulus sezerniert werden. Es wäre denkbar, dass epithelialer aktivierter Überstand eine Entstehung von T<sub>H17</sub> Zellen begünstigen könnte (Abbildung 5-3).



**Abbildung 5-3 Homöostatische Regulationsmechanismen der Lunge**

(A) Homöostase: Epithelzellen schaffen ein anti-entzündliches Mikromilieu und verhindern dadurch unkontrollierte Aktivierungsprozesse und Entzündungsreaktionen und damit verbundene epitheliale Dysfunktion. (B) „Release of inhibition“: Kommt es durch mikrobielle Exposition zu einer Aktivierung des bronchialen Epithels, so sezerniert bronchiales Epithel neben inhibitorischen Faktoren auch pro-inflammatorische Substanzen, die dann die strikte Regulation der DCs und T-Zellen aufheben könnten, was eine funktionierende Immunantwort zur Folge hätte, die den Erreger eliminieren könnte.

Daraus würde sich eine Arbeitshypothese ergeben, die als „release of inhibition“ bezeichnet wird. Unter homöostatischen Bedingungen bildet das Epithel ein Mikromilieu, welches DCs und T-Zellen reguliert. Wird das Epithel durch mikrobiellen Kontakt aktiviert, so sezerniert es, neben inhibitorischen Faktoren, auch pro-inflammatorische Substanzen (z.B. IL-1 und IL-6). Diese könnten dann die DCs und T-Zellen aus ihrer strikten Regulation entlassen und zur Elimination des Erregers beitragen (Abbildung 5-3). Damit würde auch die Induktion von TH17 Zellen einhergehen. Für diese weiterführenden Untersuchungen könnte das etablierte murine Epithelmodell verwendet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abbas, A. K. and A. H. Lichtman** (2004). Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System.

**Abreu, M. T., P. Vora, E. Faure, L. S. Thomas, E. T. Arnold and M. Arditi** (2001). "Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide." J Immunol **167**(3): 1609-16.

**Akbari, O., R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu** (2001). "Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen." Nat Immunol **2**(8): 725-31.

**Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho** (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.

**Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi** (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

**Al-Shami, A., R. Spolski, J. Kelly, A. Keane-Myers and W. J. Leonard** (2005). "A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model." J Exp Med **202**(6): 829-39.

**Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell** (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.

**Alpan, O., G. Rudomen and P. Matzinger** (2001). "The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses." J Immunol **166**(8): 4843-52.

**Anders, H. J., B. Banas and D. Schlondorff** (2004). "Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease." J Am Soc Nephrol **15**(4): 854-67.

**Armstrong, L., A. R. Medford, K. M. Uppington, J. Robertson, I. R. Witherden, T. D. Tetley and A. B. Millar** (2004). "Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(2): 241-5.

**Baker, B. S., J. M. Ovigne, A. V. Powles, S. Corcoran and L. Fry** (2003). "Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis." Br J Dermatol **148**(4): 670-9.

**Bals, R.** (2000). "Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection." Respir Res **1**(3): 141-50.

**Banchereau, J. and R. M. Steinman** (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.

**Banus, H. A., R. J. Vandebriel, H. de Ruiter, J. A. Dormans, N. J. Nagelkerke, F. R. Mooi, B. Hoebee, H. J. van Kranen and T. G. Kimman** (2006). "Host genetics of Bordetella pertussis infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology." Infect Immun **74**(5): 2596-605.

**Bartek, J., B. Vojtesek, Z. Staskova, J. Bartkova, Z. Kerekes, A. Rejthar and J. Kovarik** (1991). "A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: characterization and value in diagnostic histopathology." J Pathol **164**(3): 215-24.

- Basu, S. and M. J. Fenton** (2004). "Toll-like receptors: function and roles in lung disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(5): L887-92.
- Becker, M. N., G. Diamond, M. W. Verghese and S. H. Randell** (2000). "CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium." J Biol Chem **275**(38): 29731-6.
- Belcher, C. E., J. Drenkow, B. Kehoe, T. R. Gingeras, N. McNamara, H. Lemjabbar, C. Basbaum and D. A. Relman** (2000). "The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to Bordetella pertussis reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13847-52.
- Bell, S. J., R. Rigby, N. English, S. D. Mann, S. C. Knight, M. A. Kamm and A. J. Stagg** (2001). "Migration and maturation of human colonic dendritic cells." J Immunol **166**(8): 4958-67.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs** (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-1.
- Bingisser, R. M. and P. G. Holt** (2001). "Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells." Swiss Med Wkly **131**(13-14): 171-9.
- Blander, J. M. and R. Medzhitov** (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature **440**(7085): 808-12.
- Bluestone, J. A. and A. K. Abbas** (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." Nat Rev Immunol **3**(3): 253-7.
- Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Astrand and T. P. Speed** (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." Bioinformatics **19**(2): 185-93.
- Borriello, F., M. P. Sethna, S. D. Boyd, A. N. Schweitzer, E. A. Tivol, D. Jacoby, T. B. Strom, E. M. Simpson, G. J. Freeman and A. H. Sharpe** (1997). "B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **6**(3): 303-13.
- Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall and S. Gordon** (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-24.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell** (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Burns, K., J. Clatworthy, L. Martin, F. Martinon, C. Plumpton, B. Maschera, A. Lewis, K. Ray, J. Tschoop and F. Volpe** (2000). "Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor." Nat Cell Biol **2**(6): 346-51.
- Butler, M., C. Y. Ng, D. A. van Heel, G. Lombardi, R. Lechler, R. J. Playford and S. Ghosh** (2006). "Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium." Eur J Immunol **36**(4): 864-74.
- Buwitt-Beckmann, U., H. Heine, K. H. Wiesmuller, G. Jung, R. Brock, S. Akira and A. J. Ulmer** (2006). "TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides." J Biol Chem **281**(14): 9049-57.

- Cario, E., I. M. Rosenberg, S. L. Brandwein, P. L. Beck, H. C. Reinecker and D. K. Podolsky** (2000). "Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors." *J Immunol* **164**(2): 966-72.
- Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez and N. Inohara** (2003). "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid." *Nat Immunol* **4**(7): 702-7.
- Chen, Y., P. Thai, Y. H. Zhao, Y. S. Ho, M. M. DeSouza and R. Wu** (2003). "Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop." *J Biol Chem* **278**(19): 17036-43.
- Clarke, L. L., K. A. Burns, J. Y. Bayle, R. C. Boucher and M. R. Van Scott** (1992). "Sodium- and chloride-conductive pathways in cultured mouse tracheal epithelium." *Am J Physiol* **263**(5 Pt 1): L519-25.
- Coats, S. R., R. A. Reife, B. W. Bainbridge, T. T. Pham and R. P. Darveau** (2003). "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide antagonizes Escherichia coli lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells." *Infect Immun* **71**(12): 6799-807.
- Cross, A. S.** (2002). "Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective." *J Endotoxin Res* **8**(2): 83-98.
- Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein and J. D. Sedgwick** (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." *Nature* **421**(6924): 744-8.
- Davidson, D. J., F. M. Kilanowski, S. H. Randell, D. N. Sheppard and J. R. Dorin** (2000). "A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(4): L766-78.
- Delbridge, L. M. and M. X. O'Riordan** (2007). "Innate recognition of intracellular bacteria." *Curr Opin Immunol* **19**(1): 10-6.
- Diamond, G., D. Legarda and L. K. Ryan** (2000). "The innate immune response of the respiratory epithelium." *Immunol Rev* **173**: 27-38.
- Dinakar, C., A. Malur, B. Raychaudhuri, L. T. Buhrow, A. L. Melton, M. S. Kavuru and M. J. Thomassen** (1999). "Differential regulation of human blood monocyte and alveolar macrophage inflammatory cytokine production by nitric oxide." *Ann Allergy Asthma Immunol* **82**(2): 217-22.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein** (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.
- Endemann, G., L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White and A. A. Protter** (1993). "CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein." *J Biol Chem* **268**(16): 11811-6.
- Eriksson, U., U. Egermann, M. P. Bihl, F. Gambazzi, M. Tamm, P. G. Holt and R. M. Bingisser** (2005). "Human bronchial epithelium controls TH2 responses by TH1-induced, nitric oxide-mediated STAT5 dephosphorylation: implications for the pathogenesis of asthma." *J Immunol* **175**(4): 2715-20.
- Faure, K., T. Sawa, T. Ajayi, J. Fujimoto, K. Moriyama, N. Shime and J. P. Wiener-Kronish** (2004). "TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent Pseudomonas aeruginosa secreting type III secretory toxins." *Respir Res* **5**: 1.

- Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein** (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." J Clin Invest **108**(6): 785-91.
- Ferrari, S., R. Battini, L. Kaczmarek, S. Rittling, B. Calabretta, J. K. de Riel, V. Philiponis, J. F. Wei and R. Baserga** (1986). "Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene." Mol Cell Biol **6**(11): 3614-20.
- Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird and L. A. O'Neill** (2001). "Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction." Nature **413**(6851): 78-83.
- Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha and D. T. Golenbock** (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." J Exp Med **198**(7): 1043-55.
- Folkerts, G. and F. P. Nijkamp** (1998). "Airway epithelium: more than just a barrier!" Trends Pharmacol Sci **19**(8): 334-41.
- Franc, N. C., P. Heitzler, R. A. Ezekowitz and K. White** (1999). "Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*." Science **284**(5422): 1991-4.
- Fraser, I. P., H. Koziel and R. A. Ezekowitz** (1998). "The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity." Semin Immunol **10**(5): 363-72.
- Fuchs, E., A. L. Tyner, G. J. Giudice, D. Marchuk, A. RayChaudhury and M. Rosenberg** (1987). "The human keratin genes and their differential expression." Curr Top Dev Biol **22**: 5-34.
- Game, D. S., M. P. Hernandez-Fuentes and R. I. Lechler** (2005). "Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro." Am J Transplant **5**(3): 454-64.
- Ganz, T.** (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." Nat Rev Immunol **3**(9): 710-20.
- Gao, J. J., V. Diesl, T. Wittmann, D. C. Morrison, J. L. Ryan, S. N. Vogel and M. T. Follettie** (2002). "Regulation of gene expression in mouse macrophages stimulated with bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharide." J Leukoc Biol **72**(6): 1234-45.
- Gay, N. J., M. Gangloff and A. N. Weber** (2006). "Toll-like receptors as molecular switches." Nat Rev Immunol **6**(9): 693-8.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski and J. L. Madara** (2001). "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression." J Immunol **167**(4): 1882-5.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti and D. J. Philpott** (2003a). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." Science **300**(5625): 1584-7.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamailard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott and P. J. Sansonetti** (2003b). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." J Biol Chem **278**(11): 8869-72.

- Girardin, S. E., L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti and D. Mengin-Lecreulx** (2003c). "Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2." *J Biol Chem* **278**(43): 41702-8.
- Gomez, M. I., A. Lee, B. Reddy, A. Muir, G. Soong, A. Pitt, A. Cheung and A. Prince** (2004). "Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1." *Nat Med* **10**(8): 842-8.
- Greene, C. M., T. P. Carroll, S. G. Smith, C. C. Taggart, J. Devaney, S. Griffin, J. O'Neill S and N. G. McElvaney** (2005). "TLR-Induced Inflammation in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells." *J Immunol* **174**(3): 1638-46.
- Greene, C. M. and N. G. McElvaney** (2005). "Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**(5): 418-27.
- Grewal, I. S., H. G. Foellmer, K. D. Grewal, J. Xu, F. Hardardottir, J. L. Baron, C. A. Janeway, Jr. and R. A. Flavell** (1996). "Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis." *Science* **273**(5283): 1864-7.
- Groskreutz, D. J., M. M. Monick, L. S. Powers, T. O. Yarovinsky, D. C. Look and G. W. Hunninghake** (2006). "Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells." *J Immunol* **176**(3): 1733-40.
- Guillot, L., R. Le Goffic, S. Bloch, N. Escriou, S. Akira, M. Chignard and M. Si-Tahar** (2005). "Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-stranded RNA and Influenza A Virus." *J Biol Chem* **280**(7): 5571-80.
- Guillot, L., S. Medjane, K. Le-Barillec, V. Balloy, C. Danel, M. Chignard and M. Si-Tahar** (2004). "Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4." *J Biol Chem* **279**(4): 2712-8.
- Hacker, H., R. M. Vabulas, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira and H. Wagner** (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." *J Exp Med* **192**(4): 595-600.
- Hahn, H., D. Falke, S. H. E. Kaufmann and U. Ullmann** (2001). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*.
- Han, J. and R. J. Ulevitch** (2005). "Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity." *Nat Immunol* **6**(12): 1198-205.
- Harizi, H. and N. Gualde** (2006). "Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators." *Cell Mol Immunol* **3**(4): 271-7.
- Harris, J. and D. Werling** (2003). "Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response." *Cell Microbiol* **5**(10): 671-80.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson** (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." *Cell* **52**(2): 269-79.
- Hashimoto, M., Y. Asai and T. Ogawa** (2004). "Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*." *Int Immunol* **16**(10): 1431-7.

- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem** (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-103.
- Haziot, A., E. Ferrero, F. Kontgen, N. Hijiya, S. Yamamoto, J. Silver, C. L. Stewart and S. M. Goyert** (1996). "Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice." *Immunity* **4**(4): 407-14.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira** (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* **3**(2): 196-200.
- Henneke, P., S. Morath, S. Uematsu, S. Weichert, M. Pfitzenmaier, O. Takeuchi, A. Muller, C. Poyart, S. Akira, R. Berner, G. Teti, A. Geyer, T. Hartung, P. Trieu-Cuot, D. L. Kasper and D. T. Golenbock** (2005). "Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus." *J Immunol* **174**(10): 6449-55.
- Hertz, C. J., Q. Wu, E. M. Porter, Y. J. Zhang, K. H. Weismuller, P. J. Godowski, T. Ganz, S. H. Randell and R. L. Modlin** (2003). "Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2." *J Immunol* **171**(12): 6820-6.
- Hirschfeld, M., J. J. Weis, V. Toshchakov, C. A. Salkowski, M. J. Cody, D. C. Ward, N. Qureshi, S. M. Michalek and S. N. Vogel** (2001). "Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages." *Infect Immun* **69**(3): 1477-82.
- Hoebel, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler** (2003a). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." *Nature* **424**(6950): 743-8.
- Hoebel, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahringer and B. Beutler** (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." *Nature* **433**(7025): 523-7.
- Hoebel, K., E. M. Janssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, J. Han and B. Beutler** (2003b). "Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways." *Nat Immunol* **4**(12): 1223-9.
- Hoffmann, J. A.** (2003). "The immune response of Drosophila." *Nature* **426**(6962): 33-8.
- Homma, T., A. Kato, N. Hashimoto, J. Batchelor, M. Yoshikawa, S. Imai, H. Wakiguchi, H. Saito and K. Matsumoto** (2004). "Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**(4): 463-9.
- Hornef, M. W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark and A. Richter-Dahlfors** (2002). "Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells." *J Exp Med* **195**(5): 559-70.
- Hornef, M. W., B. H. Normark, A. Vandewalle and S. Normark** (2003). "Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells." *J Exp Med* **198**(8): 1225-35.
- Hornig, T., G. M. Barton, R. A. Flavell and R. Medzhitov** (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." *Nature* **420**(6913): 329-33.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann** (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **168**(9): 4531-7.

- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira** (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-52.
- Huang, Q., D. Liu, P. Majewski, L. C. Schulte, J. M. Korn, R. A. Young, E. S. Lander and N. Hacohen** (2001). "The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components." Science **294**(5543): 870-5.
- Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara** (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." J Exp Med **195**(11): 1507-12.
- Ito, T., Y. H. Wang, O. Duramad, T. Hori, G. J. Delespesse, N. Watanabe, F. X. Qin, Z. Yao, W. Cao and Y. J. Liu** (2005). "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand." J Exp Med **202**(9): 1213-23.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall** (2001). "Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells." J Immunol **166**(8): 4884-90.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov** (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Jack, R. S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Furll, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter and C. Schutt** (1997). "Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection." Nature **389**(6652): 742-5.
- Janeway, C. A., Jr.** (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr.** (1993). "How the immune system recognizes invaders." Sci Am **269**(3): 72-9.
- Jankovic, D., Z. Liu and W. C. Gause** (2001). "Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways." Trends Immunol **22**(8): 450-7.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto and A. Lanzavecchia** (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(11): 3388-93.
- Jenner, R. G. and R. A. Young** (2005). "Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling." Nat Rev Microbiol **3**(4): 281-94.
- Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov and P. W. Noble** (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." Nat Med **11**(11): 1173-9.
- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan and Y. J. Liu** (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.
- Kapsenberg, M. L.** (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.
- Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi and S. Akira** (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.

- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira** (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- Kawano, T., F. Ogushi, K. Tani, T. Endo, Y. Ohmoto, Y. Hayashi and S. Sone** (1999). "Comparison of suppressive effects of a new anti-inflammatory compound, FR167653, on production of PGE2 and inflammatory cytokines, human monocytes, and alveolar macrophages in response to endotoxin." J Leukoc Biol **65**(1): 80-6.
- Kedl, R. M., J. W. Kappler and P. Marrack** (2003). "Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation." Curr Opin Immunol **15**(1): 120-7.
- Kelly, D., J. I. Campbell, T. P. King, G. Grant, E. A. Jansson, A. G. Coutts, S. Pettersson and S. Conway** (2004). "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA." Nat Immunol **5**(1): 104-12.
- Kinugasa, T., T. Sakaguchi, X. Gu and H. C. Reinecker** (2000). "Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators." Gastroenterology **118**(6): 1001-11.
- Kirikae, T., T. Nitta, F. Kirikae, Y. Suda, S. Kusumoto, N. Qureshi and M. Nakano** (1999). "Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of Salmonella LPS." Infect Immun **67**(4): 1736-42.
- Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov and R. A. Flavell** (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." Cell **110**(2): 191-202.
- Kolls, J. K. and A. Linden** (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**(4): 467-76.
- Krieg, A. M., S. Matson and E. Fisher** (1996). "Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **6**(2): 133-9.
- Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann** (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.
- Kummer, J. A., R. Broekhuizen, H. Everett, L. Agostini, L. Kuijk, F. Martinon, R. van Bruggen and J. Tschopp** (2007). "Inflammasome Components NALP 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response." J Histochem Cytochem **55**(5): 443-52.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson and R. W. Finberg** (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol **1**(5): 398-401.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lambrecht, B. N., M. De Veerman, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, K. Thielemans and R. A. Pauwels** (2000). "Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation." J Clin Invest **106**(4): 551-9.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto** (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." Nat Immunol **1**(4): 311-6.

- Lebre, M. C., A. M. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. van Capel, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg and E. C. de Jong** (2007). "Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9." J Invest Dermatol **127**(2): 331-41.
- Lee, H. C. and S. F. Ziegler** (2007). "Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 914-9.
- Lee, J., J. H. Mo, K. Katakura, I. Alkalay, A. N. Rucker, Y. T. Liu, H. K. Lee, C. Shen, G. Cojocaru, S. Shenouda, M. Kagnoff, L. Eckmann, Y. Ben-Neriah and E. Raz** (2006). "Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells." Nat Cell Biol **8**(12): 1327-36.
- Lehner, M. D., S. Morath, K. S. Michelsen, R. R. Schumann and T. Hartung** (2001). "Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators." J Immunol **166**(8): 5161-7.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann** (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.
- Li, M. O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson and R. A. Flavell** (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." Annu Rev Immunol **24**: 99-146.
- Liang, H. and P. E. Lipsky** (2000). "Responses of human B cells to DNA and phosphorothioate oligodeoxynucleotides." Curr Top Microbiol Immunol **247**: 227-40.
- Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf and D. T. Golenbock** (1999). "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." J Biol Chem **274**(47): 33419-25.
- Liu, Y. J., V. Soumelis, N. Watanabe, T. Ito, Y. H. Wang, R. D. Malefyt, M. Omori, B. Zhou and S. F. Ziegler** (2006). "TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation." Annu Rev Immunol.
- Lotz, M., D. Gutle, S. Walther, S. Menard, C. Bogdan and M. W. Hornef** (2006). "Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells." J Exp Med **203**(4): 973-84.
- Mackey, D. and A. J. McFall** (2006). "MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity." Mol Microbiol **61**(6): 1365-71.
- Mahnke, K. and A. H. Enk** (2005). "Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells?" Curr Top Microbiol Immunol **293**: 133-50.
- Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A. H. Enk and H. Jonuleit** (2002). "Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells." Immunol Cell Biol **80**(5): 477-83.
- Mann, P. B., D. Wolfe, E. Latz, D. Golenbock, A. Preston and E. T. Harvill** (2005). "Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection." Infect Immun **73**(12): 8144-52.
- Martin, T. R. and C. W. Frevert** (2005). "Innate immunity in the lungs." Proc Am Thorac Soc **2**(5): 403-11.
- Martinez, I., L. Lombardia, B. Garcia-Barreno, O. Dominguez and J. A. Melero** (2007). "Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells." J Gen Virol **88**(Pt 2): 570-81.

- Matzinger, P.** (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-5.
- McGhee, J. R., J. Kunisawa and H. Kiyono** (2007). "Gut lymphocyte migration: we are halfway home." Trends Immunol **28**(4): 150-3.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." Cell **91**(3): 295-8.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr.** (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Melmed, G., L. S. Thomas, N. Lee, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, Y. Zhou, B. Hu, M. Arditi and M. T. Abreu** (2003). "Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut." J Immunol **170**(3): 1406-15.
- Miller, R. G.** (1987). Simultaneous statistical inference. New York, Springer-Verlag.
- Mio, T., X. D. Liu, Y. Adachi, I. Striz, C. M. Skold, D. J. Romberger, J. R. Spurzem, M. G. Illig, R. Ertl and S. I. Rennard** (1998). "Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts." Am J Physiol **274**(1 Pt 1): L119-26.
- Morath, S., A. Geyer and T. Hartung** (2001). "Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus." J Exp Med **193**(3): 393-7.
- Morath, S., A. Stadelmaier, A. Geyer, R. R. Schmidt and T. Hartung** (2002). "Synthetic lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus of cytokine release." J Exp Med **195**(12): 1635-40.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman** (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Muehmer, M.** (2006). Basale Immunfunktion des Atemwegsepithels. Dept. of Hygiene and Medical Microbiology. Heidelberg, University of Heidelberg.
- Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M. I. Gomez, A. Van Heeckeren and A. Prince** (2004). "Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(6): 777-83.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner** (2002). "The lineage decisions of helper T cells." Nat Rev Immunol **2**(12): 933-44.
- Murray, P. R., E. J. Barron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller and R. H. Tenover (2003). Manual of clinical microbiology. Washington, USA, ASM Press.
- Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano and Y. Iwakura** (2002). "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses." Immunity **17**(3): 375-87.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis and J. P. Kraehenbuhl** (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." Nat Immunol **2**(11): 1004-9.
- Noble, P. W. and D. Jiang** (2006). "Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity." Proc Am Thorac Soc **3**(5): 401-4.
- O'Neill, L. A.** (2003). "SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors." Nat Immunol **4**(9): 823-4.

- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie** (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.
- Oberg, H. H., D. Wesch, J. Lenke and D. Kabelitz** (2006). "An optimized method for the functional analysis of human regulatory T cells." Scand J Immunol **64**(3): 353-60.
- Openshaw, P. J.** (2005). "Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection." Proc Am Thorac Soc **2**(2): 121-5.
- Opitz, B., A. Rejaibi, B. Dauber, J. Eckhard, M. Vinzing, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp and T. Wolff** (2007). "IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein." Cell Microbiol **9**(4): 930-8.
- Oquendo, P., E. Hundt, J. Lawler and B. Seed** (1989). "CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes." Cell **58**(1): 95-101.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa and T. Seya** (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.
- Otte, J. M., E. Cario and D. K. Podolsky** (2004). "Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells." Gastroenterology **126**(4): 1054-70.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem** (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.
- Paolucci, C., P. Rovere, C. De Nadai, A. A. Manfredi and E. Clementi** (2000). "Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor alpha -regulated endocytosis of human dendritic cells in a cyclic GMP-dependent way." J Biol Chem **275**(26): 19638-44.
- Pasare, C. and R. Medzhitov** (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-6.
- Pichavant, M., Y. Delneste, P. Jeannin, C. Fourneau, A. Bricet, A. B. Tonnel and P. Gosset** (2003). "Outer membrane protein A from Klebsiella pneumoniae activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment." J Immunol **171**(12): 6697-705.
- Pivarcsi, A., L. Bodai, B. Rethi, A. Kenderessy-Szabo, A. Koreck, M. Szell, Z. Beer, Z. Bata-Csorgo, M. Magocsi, E. Rajnavolgyi, A. Dobozy and L. Kemeny** (2003). "Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes." Int Immunol **15**(6): 721-30.
- Platz, J., C. Beisswenger, A. Dalpke, R. Koczulla, O. Pinkenburg, C. Vogelmeier and R. Bals** (2004). "Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells." J Immunol **173**(2): 1219-23.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler** (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov** (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." Cell **118**(2): 229-41.

- Ramaswamy, M., L. Shi, M. M. Monick, G. W. Hunninghake and D. C. Look** (2004). "Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(6): 893-900.
- Raz, E.** (2007). "Organ-specific regulation of innate immunity." Nat Immunol **8**(1): 3-4.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl and P. Ricciardi-Castagnoli** (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." Nat Immunol **2**(4): 361-7.
- Rietschel, E. T. and H. Brade** (1992). "Bacterial endotoxins." Sci Am **267**(2): 54-61.
- Rigby, R. J., S. C. Knight, M. A. Kamm and A. J. Stagg** (2005). "Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli." Clin Exp Immunol **139**(2): 245-56.
- Rimoldi, M., M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena and M. Rescigno** (2005). "Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells." Nat Immunol **6**(5): 507-14.
- Ritter, U. and A. Osterloh** (2007). "A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis." Med Microbiol Immunol (Berl) **196**(1): 51-9.
- Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman and A. S. Prince** (2005). "Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **171**(11): 1209-23.
- Saitoh, T., M. Yamamoto, M. Miyagishi, K. Taira, M. Nakanishi, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto and S. Yamaoka** (2005). "A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling." J Immunol **174**(3): 1507-12.
- Sansonetti, P. J.** (2006). "The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling." Nat Immunol **7**(12): 1237-42.
- Sato, A., M. Hashiguchi, E. Toda, A. Iwasaki, S. Hachimura and S. Kaminogawa** (2003). "CD11b<sup>+</sup> Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells." J Immunol **171**(7): 3684-90.
- Schmeck, B., S. Huber, K. Moog, J. Zahlten, A. C. Hocke, B. Opitz, S. Hammerschmidt, T. J. Mitchell, M. Kracht, S. Rosseau, N. Suttorp and S. Hippenstiel** (2005). "Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- $\kappa$ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.
- Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe and C. J. Kirschning** (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." J Biol Chem **274**(25): 17406-9.
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette** (2005). "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response." Nat Immunol **6**(6): 551-7.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger** (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." Nat Rev Immunol **4**(6): 469-78.
- Sha, Q., A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck and R. P. Schleimer** (2004). "Activation of Airway Epithelial Cells by Toll-like Receptor Agonists." Am J Respir Cell Mol Biol.
- Shevach, E. M.** (2006). "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells." Immunity **25**(2): 195-201.

- Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens and A. M. Thornton** (2006). "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." Immunol Rev **212**: 60-73.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake and M. Kimoto** (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." J Exp Med **189**(11): 1777-82.
- Shuto, T., T. Furuta, M. Oba, H. Xu, J. D. Li, J. Cheung, D. C. Gruenert, A. Uehara, M. A. Suico, T. Okiyonedo and H. Kai** (2006). "Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells." Faseb J **20**(6): 782-4.
- Sminia, T., G. J. van der Brugge-Gamelkoorn and S. H. Jeurissen** (1989). "Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT)." Crit Rev Immunol **9**(2): 119-50.
- Smythies, L. E., M. Sellers, R. H. Clements, M. Mosteller-Barnum, G. Meng, W. H. Benjamin, J. M. Orenstein and P. D. Smith** (2005). "Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity." J Clin Invest **115**(1): 66-75.
- Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R. A. Kastelein and Y. J. Liu** (2002). "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP." Nat Immunol **3**(7): 673-80.
- Spille, M.** (2006). Bedeutung von Typ I Interferonen bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems via Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Dept. of Hygiene and Medical Microbiology. Heidelberg, University of Heidelberg.
- Stuart, L. M., J. Deng, J. M. Silver, K. Takahashi, A. A. Tseng, E. J. Hennessy, R. A. Ezekowitz and K. J. Moore** (2005). "Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain." J Cell Biol **170**(3): 477-85.
- Sturn, A., J. Quackenbush and Z. Trajanoski** (2002). "Genesis: cluster analysis of microarray data." Bioinformatics **18**(1): 207-8.
- Takabayshi, K., M. Corr, T. Hayashi, V. Redecke, L. Beck, D. Guiney, D. Sheppard and E. Raz** (2006). "Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds." Immunity **24**(4): 475-87.
- Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira** (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira** (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.
- Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda and S. Akira** (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**(7): 933-40.
- Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin and S. Akira** (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." J Immunol **169**(1): 10-4.
- Takeuchi, O., K. Takeda, K. Hoshino, O. Adachi, T. Ogawa and S. Akira** (2000). "Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades." Int Immunol **12**(1): 113-7.

- Thiemermann, C.** (2002). "Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: a structural and functional analysis." *Microbes Infect* **4**(9): 927-35.
- Tissari, J., J. Siren, S. Meri, I. Julkunen and S. Matikainen** (2005). "IFN- $\alpha$  Enhances TLR3-Mediated Antiviral Cytokine Expression in Human Endothelial and Epithelial Cells by Up-Regulating TLR3 Expression." *J Immunol* **174**(7): 4289-94.
- Traub, S., N. Kubasch, S. Morath, M. Kresse, T. Hartung, R. R. Schmidt and C. Hermann** (2004). "Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction." *J Biol Chem* **279**(10): 8694-700.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu** (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5116-21.
- Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase and H. Takada** (2007). "Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines." *Mol Immunol* **44**(12): 3100-11.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger** (2006). "TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* **24**(2): 179-89.
- Veldhoen, M. and B. Stockinger** (2006). "TGF $\beta$ 1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells." *Trends Immunol* **27**(8): 358-61.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger** (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J Immunol Methods* **184**(1): 39-51.
- Vollmer, J.** (2006). "CpG motifs to modulate innate and adaptive immune responses." *Int Rev Immunol* **25**(3-4): 125-34.
- Vos, J. B., N. A. Datson, K. F. Rabe and P. S. Hiemstra** (2007). "Exploring host-pathogen interactions at the epithelial surface: application of transcriptomics in lung biology." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**(2): L367-77.
- Wahl, S. M.** (2007). "Transforming growth factor- $\beta$ : innately bipolar." *Curr Opin Immunol* **19**(1): 55-62.
- Wang, G., B. L. Davidson, P. Melchert, V. A. Slepishkin, H. H. van Es, M. Bodner, D. J. Jolly and P. B. McCray, Jr.** (1998). "Influence of cell polarity on retrovirus-mediated gene transfer to differentiated human airway epithelia." *J Virol* **72**(12): 9818-26.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy** (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* **24**(6): 677-88.
- Xiao, H., M. F. Gulen, J. Qin, J. Yao, K. Bulek, D. Kish, C. Z. Altuntas, D. Wald, C. Ma, H. Zhou, V. K. Tuohy, R. L. Fairchild, C. de la Motte, D. Cua, B. A. Vallance and X. Li** (2007). "The Toll-Interleukin-1 Receptor Member SIGIRR Regulates Colonic Epithelial Homeostasis, Inflammation, and Tumorigenesis." *Immunity* **26**(4): 461-75.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira** (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." *Nat Immunol* **4**(11): 1144-50.
- Ying, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, K. Mallett, D. Cousins, D. Robinson, G. Zhang, J. Zhao, T. H. Lee and C. Corrigan** (2005). "Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in

asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity." J Immunol **174**(12): 8183-90.

**Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski and D. Golenbock** (1999). "Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2." J Immunol **163**(1): 1-5.

**Zal, T., A. Volkmann and B. Stockinger** (1994). "Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen." J Exp Med **180**(6): 2089-99.

**Zaph, C., A. E. Troy, B. C. Taylor, L. D. Berman-Booty, K. J. Guild, Y. Du, E. A. Yost, A. D. Gruber, M. J. May, F. R. Greten, L. Eckmann, M. Karin and D. Artis** (2007). "Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis." Nature **446**(7135): 552-6.

**Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell and S. Ghosh** (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.

**Zhang, G. and S. Ghosh** (2002). "Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip." J Biol Chem **277**(9): 7059-65.

**Zhang, H., P. N. Tay, W. Cao, W. Li and J. Lu** (2002). "Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling." FEBS Lett **532**(1-2): 171-6.

**Zhang, Y., B. A. Luxon, A. Casola, R. P. Garofalo, M. Jamaluddin and A. R. Brasier** (2001). "Expression of respiratory syncytial virus-induced chemokine gene networks in lower airway epithelial cells revealed by cDNA microarrays." J Virol **75**(19): 9044-58.

**Zhou, B., M. R. Comeau, T. De Smedt, H. D. Liggitt, M. E. Dahl, D. B. Lewis, D. Gyarmati, T. Aye, D. J. Campbell and S. F. Ziegler** (2005). "Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice." Nat Immunol **6**(10): 1047-53.

## 7 Anhang

### 7.1 Analyse der Genexpressionsdaten

**Tabelle 7-1: a-c, Regulierte Gene durch *P. aeruginosa* und RSV ( in Tukey HSD test signifikant reguliert gegenüber Kontrollzellen)**

Gen Name	Gen Symbol	<i>P. aerug</i> <sup>l</sup>	<i>RSV</i> <sup>l</sup>
<b>a, Gleichartig regulierte Gene durch <i>P. aeruginosa</i> und RSV</b>			
ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	ABTB2	1.71	4.35
ankyrin repeat domain 10	ANKRD10	1.67	2.63
aquaporin 3	AQP3	1.74	3.24
activating transcription factor 3	ATF3	1.33	24.11
B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	2.17	3.04
bradykinin receptor B1	BDKRB1	2.09	1.34
B-factor, properdin	BF	2.22	1.31
baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	4.83	2.16
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	BTG1	1.40	2.37
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	1.33	1.94
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	8.45	3.06
chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	11.28	5.10
CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	CD83	1.69	2.27
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	1.25	2.68
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	1.79	3.02
chromatin modifying protein 1B	CHMP1B	1.70	4.68
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	CXCL1	13.52	17.15
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	10.47	19.34
chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	1.82	2.62
distal-less homeo box 2	DLX2	1.82	4.23
ephrin-A1	EFNA1	2.45	6.30
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2RL1	1.64	3.32
hypothetical protein FLJ20125	FLJ20125	-1.42	-2.01
putative lymphocyte G0/G1 switch gene	G0S2	2.62	2.27
GABA(A) receptor-associated protein like 1 /// GABA(A) receptors associated protein like 3	GABARAP L1 /// GABARAP L3	1.44	3.50
GATA binding protein 6	GATA6	1.79	4.15
GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	GCH1	1.88	1.71
GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	GLIPR1	-1.16	-2.30
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	GPRC5B	1.11	1.65
human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	HIVEP2	1.53	3.25
intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	ICAM1	3.83	2.49
immediate early response 3	IER3	1.99	4.82
interleukin 11	IL11	2.19	3.99
interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	3.72	10.00
interleukin 8	IL8	25.36	20.47
inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	INHBA	1.57	5.22
interferon regulatory factor 1	IRF1	1.60	3.25
jun B proto-oncogene	JUNB	1.50	7.94
KIAA0247	KIAA0247	1.18	2.28
KIAA0746 protein	KIAA0746	-1.34	-2.24

Kruppel-like factor 4 (gut)	KLF4	3.83	17.47
Kruppel-like factor 6	KLF6	1.27	3.43
Kruppel-like factor 9	KLF9	3.57	4.13
keratin 17	KRT17	1.48	2.80
leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	LIF	1.90	4.79
leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 /// leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	LRIG1	1.87	1.99
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	MAFF	1.86	6.29
MCP-1 treatment-induced protein	MCPIP	1.78	10.63
hypothetical protein MGC5618	MGC5618	4.93	2.82
matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12	5.44	2.04
matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MMP3	2.93	8.25
myosin IE	MYO1E	-1.33	-2.13
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	NEDD4L	2.00	2.07
nuclear factor, interleukin 3 regulated	NFIL3	1.31	3.73
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB1	2.10	2.09
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	1.96	3.00
ninjurin 1	NINJ1	1.95	1.29
NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	NKX3-1	1.55	3.39
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NR4A3	1.65	57.04
oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	OLR1	2.39	1.84
pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PHLDA1	1.74	2.10
plasminogen activator, urokinase receptor /// plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	1.23	2.34
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	1.39	2.36
phosphatidic acid phosphatase type 2B	PPAP2B	1.31	1.97
prostaglandin E synthase	PTGES	1.93	1.36
protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	PTP4A1	1.44	2.31
pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	PTX3	4.85	3.09
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	REL	2.09	2.95
regulator of G-protein signalling 4	RGS4	-1.78	-1.82
regulator of G-protein signalling 7	RGS7	-2.38	-1.67
receptor-interacting serine-threonine kinase 4	RIPK4	1.72	2.48
runt-related transcription factor 3	RUNX3	1.54	1.95
spermidine/spermine N1-acetyltransferase	SAT	1.59	2.21
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	SERPINA3	2.17	1.69
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	SLC2A3	1.19	1.83
superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	3.78	2.21
sprouty homolog 4 (Drosophila)	SPRY4	1.28	2.65
stanniocalcin 1	STC1	1.47	3.59
stanniocalcin 2	STC2	2.23	1.64
TGFB-induced factor (TALE family homeobox)	TGIF	1.59	3.82
TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	TIPARP	4.48	5.51
transmembrane 4 L six family member 1	TM4SF1	1.68	1.43
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	TNFAIP2	3.96	1.84
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	5.81	9.39
tensin	TNS	-1.41	-1.61
TSC22 domain family 1	TSC22D1	1.54	2.02

**b, *P. aeruginosa* spezifisch regulierte Gene**

4-aminobutyrate aminotransferase	ABAT	1.48	
adrenomedullin	ADM	-2.34	
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3	2.68	
AMP-activated protein kinase family member 5	ARK5	-1.53	
BMP and activin membrane-bound inhibitor	BAMBI	-1.32	
BCL2-related protein A1	BCL2A1	2.85	
brain-derived neurotrophic factor	BDNF	-1.49	

bone morphogenetic protein 4	BMP4	-2.94
complement component 3	C3	2.46
chromosome 6 open reading frame 145	C6orf145	-1.15
Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	CBLB	1.43
CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	CDC42EP3	-1.46
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	1.59
claudin 1	CLDN1	2.33
connective tissue growth factor	CTGF	-1.63
chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	1.88
cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	4.95
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	-1.49
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	DDX58	2.08
deleted in liver cancer 1	DLC1	-1.36
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	-1.49
ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	ENC1	-2.03
four jointed box 1 (Drosophila)	FJX1	-1.27
hypothetical protein FLJ10901	FLJ10901	-1.30
hypothetical protein FLJ11259	FLJ11259	1.85
hypothetical protein FLJ23235	FLJ23235	2.24
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	-1.48
growth arrest-specific 1	GAS1	1.58
heparin-binding EGF-like growth factor	HBEGF	-1.24
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	HMGCS1	-1.48
inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2	-1.48
interferon induced with helicase C domain 1	IFIH1	1.97
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 /// interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	2.20
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFIT3	1.96
interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	IFNAR2	1.45
interleukin 1, alpha	IL1A	2.87
interleukin 1, beta	IL1B	3.93
insulin induced gene 1	INSIG1	-1.53
insulin receptor substrate 1	IRS1	-1.77
interferon stimulated gene 20kDa	ISG20	1.87
KIAA1609 protein	KIAA1609	1.34
likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene /// likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene	LBH	-1.35
LIM and cysteine-rich domains 1	LMCD1	-1.35
hypothetical protein LOC150759	LOC150759	1.45
Myelin basic protein	MBP	1.91
matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	3.49
myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) /// myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	MX1	2.75
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	NFKB2	2.09
2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1	1.77
periplakin	PPL	-1.24
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	PPP1R3C	-1.36
RAB11 family interacting protein 1 (class I)	RAB11FIP1	-1.55
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	RELB	2.05
Ras and Rab interactor 2	RIN2	-1.46
Rho family GTPase 3	RND3	-1.32
stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	-1.31
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	9.87
solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	SLC7A11	2.04
small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa	SNAPC1	-1.26

tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	1.90	
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	TNFRSF9	3.64	
TNFAIP3 interacting protein 1	TNIP1	1.87	
tuftelin 1	TUFT1	-1.63	
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	3.09	
zinc finger protein 238	ZNF238	-1.93	
<b>c, RSV spezifisch regulierte Gene</b>			
4-aminobutyrate aminotransferase	ABAT		-1.60
v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (arg, Abelson-related gene)	ABL2		2.74
adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	ADARB1		-1.93
adiponutrin	ADPN		1.81
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3		-1.72
Alstrom syndrome 1	ALMS1		-1.82
amphoterin induced gene 2	AMIGO2		3.46
angiomin like 2	AMOTL2		1.65
angiopoietin-like 4	ANGPTL4		2.64
ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	ANKRD1		8.15
ankyrin repeat domain 12	ANKRD12		-2.11
anthrax toxin receptor 1	ANTXR1		3.09
annexin A10	ANXA10		-1.40
activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC		2.80
arginase, type II	ARG2		1.68
AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	ARID5A		1.92
AMP-activated protein kinase family member 5	ARK5		3.61
ADP-ribosylation factor-like 7	ARL7		4.55
armadillo repeat containing 8	ARMC8		-2.27
actin-related protein 3-beta	ARP3BETA		-2.22
CD3-epsilon-associated protein; antisense to ERCC-1	ASE-1		2.23
asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM		-1.96
ataxia telangiectasia and Rad3 related	ATR		-1.95
arginine vasopressin-induced 1	AVPI1		2.17
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	BACH1		2.13
BCL2-associated athanogene 3	BAG3		4.58
BMP and activin membrane-bound inhibitor	BAMBI		4.74
branched chain aminotransferase 1, cytosolic	BCAT1		-2.23
B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	BCL6		3.12
BCL6 co-repressor	BCOR		2.96
brain-derived neurotrophic factor	BDNF		1.85
basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BHLHB2		8.25
bridging integrator 3	BIN3		-2.16
basonuclin 1	BNC1		2.00
BTG family, member 2	BTG2		2.72
chromosome 10 open reading frame 10	C10orf10		2.00
chromosome 10 open reading frame 28	C10orf28		-2.31
chromosome 11 open reading frame 17 /// chromosome 11 open reading frame 17 /// likely ortholog of rat SNF1/AMP-activated protein kinase /// likely ortholog of rat SNF1/AMP-activated protein kinase	C11orf17 /// SNARK		1.91
chromosome 13 open reading frame 22	C13orf22		2.03
chromosome 15 open reading frame 29	C15orf29		-2.18
Chromosome 20 open reading frame 111	C20orf111		2.13
chromosome 21 open reading frame 96	C21orf96		2.02
chromosome 2 open reading frame 26	C2orf26		2.69
chromosome 2 open reading frame 31 /// chromosome 2 open reading frame 31	C2orf31		1.83
chromosome 6 open reading frame 145	C6orf145		1.84
chromosome 9 open reading frame 77	C9orf77		1.84

caldesmon 1	CALD1	5.58
centrosome-associated protein 350	CAP350	-1.80
Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	CBLB	-2.07
cyclin E1	CCNE1	1.82
cyclin F	CCNF	-2.15
CCR4 carbon catabolite repression 4-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	CCRN4L	3.17
CD14 antigen /// CD14 antigen	CD14	1.62
CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44	3.53
CD58 antigen, (lymphocyte function-associated antigen 3)	CD58	-2.06
CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	CDC42EP3	1.55
Cyclin-dependent kinase 8	CDK8	-2.05
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	4.16
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	CDKN2B	2.70
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	2.26
CGI-12 protein	CGI-12	-1.90
chromodomain helicase DNA binding protein 9	CHD9	-2.55
cysteine-rich hydrophobic domain 2	CHIC2	2.04
chromatin modifying protein 1B	CHMP1B	4.05
cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing, zinc binding protein 1	CHORDC1	2.88
CDC-like kinase 1	CLK1	3.51
clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	CLU	1.66
chemokine orphan receptor 1	CMKOR1	4.41
cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 9, 33kDa	CRSP9	-1.79
crystallin, alpha B	CRYAB	6.71
connective tissue growth factor	CTGF	2.61
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	3.44
cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	-1.16
cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	CYP26B1	2.32
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	2.05
dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin ( <i>xenopus</i> )	DACT1	4.46
DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	2.25
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	DDX58	-1.71
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 35	DHX35	-2.04
Dicer1, Dcr-1 homolog ( <i>Drosophila</i> )	DICER1	-1.91
deiodinase, iodothyronine, type II	DIO2	-1.89
deleted in liver cancer 1	DLC1	1.83
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	DNAJB1	7.56
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	DNAJB4	2.41
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	DNAJB6	1.92
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	2.22
downregulated in ovarian cancer 1	DOC1	4.31
dedicator of cytokinesis 10	DOCK10	-2.82
down-regulated in metastasis	DRIM	-1.88
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	5.28
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	2.85
dual specificity phosphatase 4	DUSP4	2.37
dual specificity phosphatase 5	DUSP5	6.63
dual specificity phosphatase 6	DUSP6	1.86
dual specificity phosphatase 8	DUSP8	2.27
DNA segment on chromosome X and Y (unique) 155 expressed sequence	DXYS155E	1.79
Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	DYRK2	1.92
endothelin 1	EDN1	4.57
ephrin-B2	EFNB2	2.09
early growth response 1	EGR1	2.82
early growth response 3	EGR3	14.91

early growth response 4	EGR4	2.99
eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	EIF2AK3	2.01
elongation factor, RNA polymerase II, 2	ELL2	2.20
ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	ENC1	2.04
EPH receptor A2	EPHA2	1.75
EPH receptor A4	EPHA4	2.36
v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	ETS2	2.84
exostoses (multiple) 1	EXT1	-2.28
family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	1.92
family with sequence similarity 46, member C	FAM46C	2.82
F-box and leucine-rich repeat protein 14	FBXL14	1.96
fibroblast growth factor 18	FGF18	5.20
fibroblast growth factor 5	FGF5	1.67
Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	FGFR1	2.08
four jointed box 1 (Drosophila)	FJX1	1.61
Friend leukemia virus integration 1	FLI1	-1.98
hypothetical protein FLJ10901	FLJ10901	1.82
hypothetical protein FLJ11078	FLJ11078	2.66
hypothetical protein FLJ12700	FLJ12700	-2.58
hypothetical protein FLJ20010	FLJ20010	2.15
hypothetical protein FLJ20485	FLJ20485	-2.62
hypothetical protein FLJ20558	FLJ20558	-2.26
hypothetical protein FLJ21657	FLJ21657	-1.97
endo-beta-N-acetylglucosaminidase	FLJ21865	2.59
FLJ22624 protein	FLJ22624	-2.27
hypothetical protein FLJ22639	FLJ22639	1.87
hypothetical protein FLJ23235	FLJ23235	-1.36
hypothetical protein FLJ23556	FLJ23556	2.09
fibronectin 1	FN1	1.78
v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	25.00
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	FOSB	32.42
FOS-like antigen 1	FOSL1	3.03
FOS-like antigen 2	FOSL2	2.43
Forkhead box C1	FOXC1	2.53
forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	FOXC2	3.17
follistatin	FST	2.74
FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	-1.97
GABA(A) receptor-associated protein like 1	GABARAP L1	2.90
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	2.36
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	3.79
GATA binding protein 2	GATA2	2.01
GATA binding protein 3	GATA3	2.14
gastrulation brain homeo box 2	GBX2	1.92
GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM	11.18
GLI-Kruppel family member GLI2	GLI2	-2.92
GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	GLIPR1	-1.88
glomulin, FKBP associated protein	GLMN	-2.04
glutaminase	GLS	1.88
G patch domain containing 2	GPATC2	-2.28
G protein-coupled receptor 125	GPR125	-1.70
G protein-coupled receptor 56	GPR56	2.13
gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	GREM1	4.35
hemoglobin, alpha 2 /// hemoglobin, alpha 2	HBA2	3.38
heparin-binding EGF-like growth factor	HBEGF	3.26

histone deacetylase 5	HDAC5	2.02
headcase homolog (Drosophila)	HECA	1.88
homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HERPUD1	2.19
hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	HES1	3.45
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	HEY1	15.55
hematopoietically expressed homeobox	HHEX	2.03
histone 1, H3h	HIST1H3H	1.86
histone 2, H2be	HIST2H2B E	2.44
histone 3, H2a	HIST3H2A	1.57
human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	HIVEP1	1.89
lung cancer-related protein 8	HLC-8	-1.92
H2.0-like homeo box 1 (Drosophila)	HLX1	2.01
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	HMGCS1	1.59
heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	9.78
homeo box C11	HOXC11	2.09
heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	3.38
heat shock 70kDa protein 1B	HSPA1B	10.45
heat shock 70kDa protein 1-like	HSPA1L	2.65
heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	HSPA6	258.94
heat shock 22kDa protein 8	HSPB8	5.56
HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1	HSPBAP1	-2.02
heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSPH1	2.90
intercellular adhesion molecule 4, Landsteiner-Wiener blood group	ICAM4	1.93
inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2	3.89
Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	2.83
immediate early response 2	IER2	2.23
immediate early response 5	IER5	2.98
interferon-induced protein 44	IFI44	-1.90
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 /// interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	-1.42
interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	IFNAR2	-1.42
interferon-related developmental regulator 1	IFRD1	2.50
interleukin 11	IL11	2.25
interleukin 1 receptor accessory protein	IL1RAP	3.38
interleukin 27 receptor, alpha	IL27RA	-1.90
interleukin 7 receptor /// interleukin 7 receptor	IL7R	-2.14
insulin induced gene 1	INSIG1	1.67
interferon regulatory factor 8 /// interferon regulatory factor 8	IRF8	1.96
insulin receptor substrate 1	IRS1	1.69
insulin receptor substrate 2	IRS2	4.41
integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide) /// integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)	ITGAM	2.21
integrin, beta 4	ITGB4	1.79
influenza virus NS1A binding protein	IVNS1ABP	2.47
Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)	JAK2	-1.83
jumonji domain containing 1C	JMJD1C	2.15
jumonji domain containing 3	JMJD3	2.08
v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	6.81
jun D proto-oncogene	JUND	1.99
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	KCNJ12	1.80
KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	KHDRBS1	2.09
KIAA0232 gene product	KIAA0232	-2.10
KIAA0276 protein	KIAA0276	-2.13

KIAA0922 protein	KIAA0922	-2.23
KIAA0962 protein	KIAA0962	-1.98
KIAA0971	KIAA0971	-2.01
KIAA1240 protein	KIAA1240	-1.96
KIAA1609 protein	KIAA1609	-1.66
Kruppel-like factor 10	KLF10	6.22
Kruppel-like factor 2 (lung)	KLF2	3.72
Kruppel-like factor 4 (gut)	KLF4	5.18
Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	5.67
Kruppel-like factor 6	KLF6	3.48
hypothetical protein FLJ20604	KS	-2.15
likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene /// likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene	LBH	2.23
low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	LDLR	1.87
LIM and cysteine-rich domains 1	LMCD1	2.83
Hypothetical protein LOC149478	LOC149478	2.08
hypothetical protein LOC150759	LOC150759	-1.54
hypothetical protein LOC221362	LOC221362	1.75
hypothetical protein LOC283755 /// D15F37 gene /// hypothetical LOC440248	LOC283755 /// D15F37 /// LOC440248	-2.07
similar to SRR1-like protein	LOC402055	-2.01
LOC440118	LOC440118	2.91
hypothetical protein LOC51315	LOC51315	-2.22
C/EBP-induced protein /// C/EBP-induced protein	LOC81558	2.95
similar to RIKEN cDNA 2610307I21	LOC90806	-2.20
leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3	LRCH3	-1.96
low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	LRP8	-2.69
leucine zipper protein 1	LUZP1	2.44
LY6/PLAUR domain containing 1	LYPDC1	2.06
lysosomal trafficking regulator	LYST	-2.79
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	MAF	2.04
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	MAFB	4.88
mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP2K4	-2.05
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	4.52
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	2.18
Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2 (mouse)	MEIS2	-2.04
hypothetical protein MGC10993	MGC10993	-2.15
hypothetical protein MGC11308	MGC11308	-2.27
hypothetical protein MGC29875	MGC29875	1.95
hypothetical protein MGC3329	MGC3329	-2.18
monoglyceride lipase /// monoglyceride lipase	MGLL	-1.93
microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	MICAL2	-1.86
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10	MLLT10	-2.51
meningioma (disrupted in balanced translocation) 1	MN1	3.89
mutS homolog 5 (E. coli)	MSH5	-2.23
myotubularin related protein 9	MTMR9	-1.94
v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	3.32
myosin regulatory light chain interacting protein	MYLIP	2.98
myosin X	MYO10	-1.68
NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	NAB1	1.61
N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	-2.65
neuron navigator 3	NAV3	-1.98
N-myc downstream regulated gene 1	NDRG1	2.27
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	NEDD9	9.75

nuclear transcription factor, X-box binding 1	NFX1	-2.08
nuclear transcription factor Y, alpha	NFYA	-2.06
nerve growth factor, beta polypeptide	NGFB	2.09
NF-kappaB repressing factor	NKRF	2.33
NPD014 protein	NPD014	-2.16
neuronal pentraxin I	NPTX1	1.92
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NR4A1	2.35
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	18.26
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	32.53
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NR4A3	16.58
nuclear respiratory factor 1	NRF1	-2.00
neuregulin 1	NRG1	1.61
origin recognition complex, subunit 5-like (yeast)	ORC5L	-2.02
odd-skipped related 2 (Drosophila)	OSR2	2.56
polycomb group ring finger 3	PCGF3	-1.86
platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	PDGFB	1.85
PDZ and LIM domain 5	PDLIM5	-2.43
pellino homolog 1 (Drosophila)	PELI1	2.39
period homolog 1 (Drosophila)	PER1	2.18
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	2.68
placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	PGF	3.11
progesterone receptor membrane component 2	PGRMC2	1.89
phosphatidylinositol glycan, class L	PIGL	1.96
plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	2.16
pleckstrin homology domain containing, family A member 5	PLEKHA5	-2.15
pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2	PLEKHF2	2.00
polo-like kinase 3 (Drosophila)	PLK3	3.17
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	2.72
polymerase (DNA directed) iota	POLI	-1.86
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B	POLR3B	-2.23
phosphatidic acid phosphatase type 2B	PPAP2B	1.95
periplakin	PPL	1.87
protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform	PPM1B	-1.88
protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	PPM1D	1.82
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	PPP1R15A	2.96
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	PPP1R3C	1.69
protein kinase C binding protein 1	PRKCBP1	-2.71
phosphatidylserine receptor	PTDSR	2.69
phosphotriesterase related	PTER	-2.00
prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	PTGER2	2.49
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	PTGER4	2.10
parathyroid hormone-like hormone	PTH LH	3.95
protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	PTP4A1	1.82
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	PTPN3	-1.88
protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	PTPRE	-3.56
purine-rich element binding protein A	PURA	1.73
RAB11 family interacting protein 1 (class I)	RAB11FIP1	1.39
RAB11 family interacting protein 2 (class I)	RAB11FIP2	-1.88
RAB20, member RAS oncogene family	RAB20	1.73
RAB40B, member RAS oncogene family	RAB40B	-2.22
RAD54 homolog B (S. cerevisiae)	RAD54B	-2.82
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	RAPGEF6	-1.91
retinoic acid receptor, alpha	RARA	3.31
RAS p21 protein activator 2	RASA2	-1.98

response gene to complement 32	RGC32	2.99
regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	RGS2	10.20
regulator of G-protein signalling 20	RGS20	-2.54
ras homolog gene family, member B	RHOB	7.53
Ras and Rab interactor 2	RIN2	1.54
Rho family GTPase 3	RND3	1.72
ring finger protein 146 /// ring finger protein 146	RNF146	-2.23
RNA, U17D small nucleolar	RNU17D	-1.76
receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	ROR1	-2.02
ribosomal protein L31	RPL31	1.84
Ras-related associated with diabetes	RRAD	5.16
ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	RRBP1	3.45
ribosomal L1 domain containing 1	RSL1D1	2.19
runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)	RUNX1	1.89
runt-related transcription factor 3	RUNX3	2.69
RING1 and YY1 binding protein	RYBP	2.33
sin3-associated polypeptide, 18kDa	SAP18	1.86
sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL	1.57
stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	1.74
schwannomin interacting protein 1	SCHIP1	1.68
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	SEMA3C	2.04
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8	SERPINB8	-1.86
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	5.33
SET domain and mariner transposase fusion gene	SETMAR	-2.57
splicing factor, arginine/serine-rich 5	SFRS5	2.17
serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	2.09
single-minded homolog 1 (Drosophila)	SIM1	-2.30
SKI-like	SKIL	4.29
solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	SLC19A2	5.05
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	SLC25A15	-2.22
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	SLC2A3	1.87
solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	SLC7A11	-1.94
SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	SMAD7	4.95
SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	SMC4L1	2.15
snail homolog 1 (Drosophila)	SNAI1	11.78
snail homolog 2 (Drosophila)	SNAI2	4.82
small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa	SNAPC1	1.62
SNF1-like kinase /// SNF1-like kinase	SNF1LK	19.43
suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	2.65
SRY (sex determining region Y)-box 18	SOX18	15.22
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	3.47
SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	SOX9	4.53
spermatogenesis associated 2	SPATA2	2.13
secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1	2.66
sprouty homolog 2 (Drosophila)	SPRY2	2.86
SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1	SSB1	2.20
single-stranded DNA binding protein 1	SSBP1	3.36
START domain containing 13	STARD13	-2.56
stanniocalcin 1	STC1	4.10
syntaxin 11	STX11	1.95
suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)	SUV420H1	-2.44
synaptopodin	SYNPO	1.90
TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	-2.23

T-box 3 (ulnar mammary syndrome)	TBX3	8.14
transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	TFAP2C	2.49
tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	2.18
transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	TGM2	2.17
thrombomodulin	THBD	2.74
transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	1.84
transmembrane, prostate androgen induced RNA	TMEPAI	4.21
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	TNFSF9	1.67
TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	-1.89
TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	-2.12
tribbles homolog 1 (Drosophila)	TRIB1	4.45
tripartite motif-containing 38	TRIM38	-1.62
triple functional domain (PTPRF interacting)	TRIO	-2.86
transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	TRPC4	-2.61
TSC22 domain family 2	TSC22D2	2.56
TSC22 domain family 3	TSC22D3	1.85
tRNA splicing endonuclease 2 homolog (SEN2, S. cerevisiae)	TSEN2	-2.46
TPA-induced transmembrane protein	TTMP	2.03
tuftelin 1	TUFT1	2.89
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	-2.42
vascular endothelial growth factor	VEGF	2.09
vestigial like 4 (Drosophila)	VGLL4	1.99
WW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)	WBP4	-1.97
WD repeat domain 33	WDR33	2.31
WD repeat domain 47	WDR47	1.95
WEE1 homolog (S. pombe)	WEE1	2.64
zinc finger, A20 domain containing 2	ZA20D2	1.90
zinc finger and BTB domain containing 24	ZBTB24	-1.75
zinc finger CCCH type, antiviral 1	ZC3HAV1	2.10
zinc finger homeodomain 4	ZFHX4	-2.61
zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	ZFP36	2.43
zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	2.44
zinc finger, MYM domain containing 1	ZMYM1	-2.28
zinc finger protein 140 (clone pHZ-39)	ZNF140	-1.92
zinc finger protein 281	ZNF281	1.94
zinc finger protein 302	ZNF302	-2.22
zinc finger protein 331	ZNF331	4.72
zinc finger protein 432	ZNF432	-1.97
zinc finger protein 518	ZNF518	-2.70
zinc finger protein 544	ZNF544	-2.06
zinc finger and SCAN domain containing 5	ZSCAN5	-2.14

<sup>1</sup>x-fache Veränderung

Tabelle 7-1 d-f Gene Ontology Klassifizierungen von *P. aeruginosa* and RSV spezifisch regulierten Genen<sup>2</sup>

Begriff	ID	Beobachtet	Erwartet	Zscore
<b>d, Gleichartig regulierte Gene durch <i>P. aeruginosa</i> und RSV</b>				
response to wounding	GO:0009611	17	1.77	11.61
response to external stimulus	GO:0009605	19	2.29	11.24
inflammatory response	GO:0006954	11	0.99	10.17
response to other organism	GO:0051707	18	2.59	9.78
immune response	GO:0006955	22	3.75	9.7
defense response	GO:0006952	22	4.19	8.98
regulation of biological process	GO:0050789	40	13.92	7.78
regulation of cellular process	GO:0050794	38	12.89	7.72
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	13	2.21	7.39
chemotaxis	GO:0006935	6	0.56	7.31
regulation of cellular physiological process	GO:0051244	35	12.19	7.17
negative regulation of biological process	GO:0048519	16	3.31	7.16
humoral immune response	GO:0006959	7	0.78	7.07
response to chemical stimulus	GO:0042221	10	1.53	6.94
anti-apoptosis	GO:0006916	5	0.46	6.72
regulation of metabolism	GO:0019222	27	8.68	6.63
negative regulation of apoptosis	GO:0043066	5	0.53	6.17
cell-cell signaling	GO:0007267	12	2.5	6.13
cell ion homeostasis	GO:0006873	5	0.55	6.07
regulation of transcription	GO:0045449	23	7.73	5.82
ion homeostasis	GO:0050801	5	0.6	5.71
cell homeostasis	GO:0019725	5	0.64	5.49
behavior	GO:0007610	6	0.9	5.43
cell communication	GO:0007154	30	12.97	5.22
<b>e, <i>P. aeruginosa</i> spezifisch regulierte Gene</b>				
anti-apoptosis	GO:0006916	5	0.16	12.06
regulation of apoptosis	GO:0042981	8	0.49	10.8
negative regulation of biological process	GO:0048519	11	1.16	9.35
negative regulation of cellular process	GO:0048523	10	1.07	8.84
response to biotic stimulus	GO:0009607	12	1.53	8.75
negative regulation of physiological process	GO:0043118	9	1	8.18
defense response	GO:0006952	11	1.47	8.09
immune response	GO:0006955	10	1.32	7.77
response to other organism	GO:0051707	8	0.91	7.58
response to stimulus	GO:0050896	14	3.07	6.64
organismal physiological process	GO:0050874	13	2.91	6.28
response to stress	GO:0006950	9	1.63	5.97
response to wounding	GO:0009611	5	0.62	5.62
regulation of cellular physiological process	GO:0051244	14	4.28	5.14
regulation of biological process	GO:0050789	15	4.89	5.08
<b>f, RSV spezifisch regulierte Gene</b>				
regulation of physiological process	GO:0050791	123	45.99	12.59
response to protein stimulus	GO:0051789	12	0.85	12.24
regulation of transcription	GO:0045449	78	28.09	10.04
regulation of metabolism	GO:0019222	84	31.56	10.03
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	34	8.03	9.39
negative regulation of cellular process	GO:0048523	41	11.04	9.29
negative regulation of biological process	GO:0048519	43	12.02	9.23

negative regulation of physiological process	GO:0043118	39	10.32	9.19
cellular process	GO:0009987	233	161.92	8.93
biological_process	GO:0008150	246	180.07	8.62
metabolism	GO:0008152	170	103.13	8.46
cellular physiological process	GO:0050875	206	138.53	8.31
response to stress	GO:0006950	49	16.83	8.17
negative regulation of transcription	GO:0016481	16	2.76	8.08
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006357	21	4.6	7.78
physiological process	GO:0007582	217	154.77	7.75
development	GO:0007275	70	30.28	7.73
cell cycle	GO:0007049	36	11.2	7.64
negative regulation of cellular metabolism	GO:0031324	16	3.3	7.1
cell proliferation	GO:0008283	29	9	6.84
negative regulation of transcription, DNA-dependent	GO:0045892	11	1.89	6.7
negative regulation of metabolism	GO:0009892	16	3.79	6.38
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0000122	8	1.19	6.31
response to stimulus	GO:0050896	64	31.81	6.13
cell cycle arrest	GO:0007050	7	1.06	5.82
protein amino acid dephosphorylation	GO:0006470	10	2	5.72
protein folding	GO:0006457	13	3.23	5.52
dephosphorylation	GO:0016311	10	2.11	5.5
response to abiotic stimulus	GO:0009628	20	6.59	5.34
organ development	GO:0048513	25	9.47	5.18
enzyme linked receptor protein signaling pathway	GO:0007167	12	3.07	5.18
cell communication	GO:0007154	79	47.15	5.15

<sup>2</sup>Filter Kriterium: Anzahl der gefundenen Gene  $\geq 5$  und z-score  $\geq 5$ . Der "z-score" basiert auf hypergeometrischer Verteilung und wird folgendermaßen berechnet:  $z = (\text{beobachtet} - \text{erwartet}) / \sqrt{\text{Standardabweichung (beobachtet)}}$ . Der „z-score“ subtrahiert die Anzahl der beobachteten Gene in einer der drei Hauptkategorien der Gene Ontology (Molecular Function, Biological Process und Cellular Component) von der erwarteten Anzahl der Gene, die diesem Kriterium entsprechen. Diese Zahl wird dann noch durch die Standardabweichung der beobachteten Anzahl der Gene geteilt.

## 7.2 Veröffentlichungen und Präsentationen

### 7.2.1 Veröffentlichungen

- Juli 2002 Wintermantel, TM., **Mayer, AK.**, Schutz, G., Greiner EF.  
Targeting mammary epithelial cells using a bacterial artificial chromosome.  
Genesis. 2002 Jul;33(3):125-30.
- März 2007 **Mayer, AK.**, Muehmer, M., Mages, J., Gueinzus, K., Heeg, K., Bals, R., Lang, R., Dalpke, AH.  
Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells.  
J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):3134-42.
- März 2007 Steppan, S., Kupfer, K., **Mayer, A.**, Evans, M., Yamasaki, G., Greve, JM., Eckart, MR., Cassell, DJ.  
Genome wide expression profiling of human peripheral blood mononuclear cells stimulated with BAY 50-4798, a novel T cell selective interleukin-2 analog.  
J Immunother. 2007 Feb-Mar;30(2):150-68.

### 7.2.2 Präsentationen

- Oktober 2004 Posterpräsentation auf dem “Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI)”; Maastricht, Niederlande  
**Anja K. Mayer**, C. Beisswenger, R. Bals and Alexander H. Dalpke: Microbial pattern-recognition in bronchial epithelium.
- Februar 2005 Posterpräsentation auf der “Spring School on Immunology“; Ettal, Deutschland  
**Anja K. Mayer**, C. Beisswenger, R. Bals and Alexander H. Dalpke: Microbial pattern-recognition in bronchial epithelium.
- September 2005 Posterpräsentation auf dem “Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology”; Kiel, Deutschland  
**Anja K. Mayer**, R. Bals and Alexander H. Dalpke: Innate immune responses in bronchial epithelium.
- September 2006 Posterpräsentation auf dem “1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology”; Paris, Frankreich  
**Anja Mayer**, Holger Bartz, Klaus Heeg and Alexander Dalpke: Human bronchial epithelial cells modify function and phenotype of dendritic cells in inflammatory settings.
- Mai 2007 Vortrag im Rahmen des „First Congress of the Society of Innate Immunity on Integration of Innate Immunity and Biological Systems“; Ankara, Türkei  
**Anja K. Mayer**, Mario Muehmer, Jörg Mages, Klaus Heeg, Roland Lang, and Alexander H. Dalpke: Human bronchial epithelial cells variably recognize Toll-like receptor dependent microbial ligands.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Herrn **Prof. Dr. Alexander Dalpke** für hervorragende Betreuungsarbeit und Überlassung dieses spannenden Themas. Weiter möchte ich mich für sein aufrichtiges Interesse an meiner Arbeit und für seine kontinuierliche Unterstützung bedanken, bei der er immer mit einem offenen Ohr und sehr wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

Herrn **Prof. Dr. Klaus Heeg** danke ich sehr für die Aufnahme in sein Institut und besonders gute Arbeitsbedingungen. Bedanken möchte ich mich auch für die Möglichkeit, an zahlreichen Kongressen und Fortbildungsveranstaltungen teilnehmen zu dürfen.

Herrn **Prof. Dr. Ralf Bartenschlager** danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat, als Erstgutachter meiner Arbeit und als Mitglied in meinem PhD-Komitee zu fungieren.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn **Prof. Dr. Stephan Frings** und an Herrn **Prof. Dr. Rüdiger Hell**, die sich ebenfalls bereit erklärt haben, als Prüfer im Rahmen meiner Disputation teilzunehmen.

Danken möchte ich allen **Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Marburg und Heidelberg**, die dazu beigetragen haben, dass ich diese dreieinhalb Jahre meiner Doktorarbeit in „monschter subber“ Erinnerung behalten werde. Ein besonders „chilliger“ Dank geht an **Mirjam Peter, Florian Eberle, Julia Strebovsky, Dr. Holger Bartz, Dr. Konrad Bode, Markus Frey, Martina Spille, Andrea Bätz** und **Mario Mühmer**. Für technische Hilfe möchte ich bei **Aline Gierschke, Adelina Dillmann** und **Stefanie Penati** Dankeschön sagen. Besonderer Dank geht dabei an **Mirjam Peter** für jegliche Hilfe beim Formatieren und bei sämtlichen Word und Excel-Krisen.

Meinen Diplomanden und Doktoranden **Mario Mühmer** und **Fabian Fey** danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

**Martin Kuhn („Dr. in spe“)** und **Dr. Sonja Steppan** danke ich sehr für die hilfreiche Durchsicht und Korrekturen des Manuskriptes und die vielen aufmunternden Worte – auch was das Leben nach der Doktorarbeit betrifft... **Dr. Sven Miller** danke ich für den Tipp mit den Tabellen in Word und sonstigen Ratschlägen für die Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern **Heinz** und **Heide Mayer** weil sie mich in den letzten 29 Jahren in jeder möglichen Form unterstützt haben und immer vollstes Vertrauen hatten.