

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. Vogelmeier

Modulation der angeborenen Immunität der Lunge durch
Umwelteinflüsse und allergische Entzündung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt
von

Christoph Beißwenger
aus Tübingen

Marburg, im Mai 2005

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
15.08.2005**

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. R. Bals

Koreferent: Prof. Dr. med. Lohoff

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Einleitung	9
2.1	Immunantwort der Atemwege	9
2.2	Toll-like Rezeptoren	9
2.2.1	Struktur und Funktion der TLR/IL-1 Rezeptorfamilie	10
2.2.2	MyD88 abhängiger Signalweg	13
2.2.3	MyD88 unabhängiger Signalweg	14
2.2.4	TLR des Atemwegsepithels	15
2.3	Antimikrobielle Peptide	16
2.3.1	Defensine	17
2.3.1.1	α -Defensine	19
2.3.1.2	β -Defensine	19
2.3.1.3	θ -Defensine	20
2.3.2	Cathelizidine	20
2.3.3	Weitere antimikrobielle Peptide	21
2.3.4	Regulation antimikrobieller Peptide	21
2.3.5	Funktion antimikrobieller Peptide	23
2.3.5.1	Antimikrobielle Aktivität	23
2.3.5.2	Funktion antimikrobieller Peptide bei Entzündung, Chemotaxis, Zellaktivierung, Wundheilung und Angiogenese	25
2.3.6	Die Rolle antimikrobieller Peptide bei Erkrankungen des Respirationstrakts	28
2.4	COPD und angeborene Immunität	30
2.5	Fragestellung	32

3	Material und Methoden	33
3.1	Zelllinien, Bakterien, Zellkulturmedien und Reagenzien	33
3.2	Primärkulturen von humanen Atemwegsepithelzellen	33
3.3	<i>Air liquid interface</i> Kulturen	33
3.4	Stimulationsexperimente	35
3.5	Exposition von <i>air liquid interface</i> Kulturen mit Zigarettenrauch	35
3.6	Zytokin, LL-37/hCAP-18 und hBD-2 ELISA	36
3.7	Ursprung und Analyse der Atemwegssekrete	37
3.8	Western-Blot Analyse	38
3.9	Isolation von RNA und RT-PCR	39
3.10	Behandlung von primären Atemwegszellen mit einzelsträngigen Oligodeoxynukleotiden	40
3.11	Sensibilisierung, Allergen-Herausforderung und Infektion von BALB/c Mäusen	40
3.12	Aufbereitung der Bronchio-Alveolären-Lavage (BAL) von Mäusen	41
3.13	Statistische Analyse	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Faktoren der angeborenen Immunität im Respirationstrakt	43
4.1.1	Antimikrobielle Peptide werden in Atemwegssekrete abgegeben	43
4.1.1.1	Konzentrationen von antimikrobiellen Peptiden im Sputum sind während einer Exazerbation bei COPD Patienten erhöht	45
4.1.2	Expression von TLR in Atemwegsepithelzellen	46
4.1.3	Stimulation von humanen Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und TLR Liganden	47
4.2	Exposition von humanen Atemwegsepithelzellen mit Zigarettenrauch <i>in vitro</i>	49
4.2.1	Zigarettenrauchexposition führt zu einer gesteigerten Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen	49

4.2.2	Auswirkung von Zigarettenrauch in Kombination mit Bakterien	50
4.2.3	Die MAP Kinase p38 und NF- κ B sind an der durch Zigarettenrauch induzierten Entzündung beteiligt	51
4.2.3.1	Die durch Zigarettenrauch induzierte Abgabe von IL-6 wird durch antisense Oligonukleotide gegen die NF- κ B Untereinheit p65 gemindert	52
4.2.3.2	Die MAP Kinase p38 wird durch Zigarettenrauch aktiviert	52
4.2.4	Auswirkung von Zigarettenrauch auf die β -Defensin Expression	54
4.2.5	Auswirkung von reaktivem Sauerstoff auf die β -Defensin Expression	56
4.3	Effekt von Tabakmißbrauch auf die Konzentration von antimikrobiellen Peptiden bei Patienten mit Pneumonie	58
4.4	Einfluß einer allergischen Entzündung auf die angeborene Immunität des Respirationstrakts	60
4.4.1	Auswirkung von Th2-Zytokinen auf Faktoren der angeborenen Immunität von humanen Atemwegsepithelzellen <i>in vitro</i>	60
4.4.2	Interaktion zwischen bakterieller Abwehr und allergischer Entzündung im murinen Asthma-Modell	62
4.4.2.1	Die allergische Entzündung verursacht einen Abwehrdefekt	62
4.4.2.2	Die allergische Entzündung beeinflusst den Verlauf der Immunantwort bei einer bakteriellen Infektion	63
4.4.2.2.1	Die allergische Entzündung hemmt den Einstrom von neutrophilen Granulozyten	63
4.4.2.2.2	Die allergische Entzündung führt zu geminderten Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen in der Lunge	65
4.4.2.2.3	Die allergische Entzündung hemmt die Abgabe von CRAMP	67

5	Diskussion	69
5.1	Faktoren der angeborenen Immunität des Respirationstrakts und der Atemwegsepithelzellen	69
5.1.1	Atemwegsepithelzellen exprimieren TLR	69
5.1.2	Atemwegsepithelzellen werden durch TLR Liganden und Pathogene aktiviert	70
5.1.3	Antimikrobielle Peptide werden in Atemwegssekrete abgegeben	71
5.2	Zigarettenrauch wirkt sich auf die angeborene Immunantwort der Atemwege aus	72
5.2.1	Zigarettenrauch führt zu einer Entzündungsreaktion von Atemwegsepithelzellen <i>in vitro</i>	72
5.2.2	Zigarettenrauch moduliert die angeborene Immunität von Atemwegsepithelzellen <i>in vitro</i>	73
5.2.3	Rauchen hemmt die Abgabe von hBD-2 in den Rachenraum bei einer bakteriellen Infektion	74
5.3	Die allergische Entzündung des Respirationstrakts verursacht einen Abwehrdefekt	77
5.4	Schlußbemerkung	78
6	Literaturverzeichnis	80

1 Zusammenfassung

Die Atemwege des Menschen sind von einem mehrzelligen Epithel ausgekleidet. Dieses Atemwegsepithel ist nicht nur eine physikalische Barriere für Pathogene, sondern auch aktiv an der angeborenen Immunität beteiligt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Komponenten der angeborenen Immunantwort des Respirationstrakts und des Atemwegsepithels bei bakterieller Entzündung unter Einfluß von Zigarettenrauch und allergischer Entzündung zu charakterisieren.

Als erstes wurde die angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen *in vitro* untersucht. Es zeigte sich, daß Atemwegsepithelzellen Toll-like Rezeptoren (TLR) exprimieren und sich durch Pathogene sowie deren Bestandteile aktivieren lassen. Dies zeigte sich in der Induktion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden.

Als nächstes wurden die beiden antimikrobiellen Peptide LL-37/hCAP-18 und hBD-2 in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten und Patienten mit COPD (chronic obstructive pulmonary disease) basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel nachgewiesen. Im Fall der Patienten mit COPD ergab sich ein Zusammenhang zwischen Entzündung und den Konzentrationen von hBD-2 und LL-37/hCAP-18. Während einer Exazerbation waren die Konzentrationen von hBD-2 und von LL-37/hCAP-18 signifikant höher als nach dem Abklingen der Exazerbation.

Rauchen ist die wichtigste Ursache für chronische Bronchitis und COPD. Es wurde daher die Auswirkung von Zigarettenrauch auf die angeborene Immunität von Atemwegsepithelzellen untersucht. Es ergab sich, daß Zigarettenrauch *in vitro* einerseits zu einer MAP Kinasen und NF- κ B abhängigen Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine führte, andererseits aber Rauch die durch Bakterien induzierte Expression von β -Defensinen hemmte. Es zeigte sich weiter, daß an der geminderten β -Defensin Expression reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind. In Rachenspülwassern von Patienten mit einer Pneumonie ergab sich eine negative Korrelation zwischen der Konzentration des β -Defensins hBD-2 und den „Packyears“, d.h. der Menge an gerauchten Zigaretten.

Bei der allergischen Entzündung des Respirationstrakts spielen Th2-Zytokine eine Rolle. Die in dieser Studie durchgeführten *in vitro* Experimente zeigten, daß Th2-Zytokine die Expression von β -Defensinen bei Atemwegsepithelzellen hemmen. *In*

vivo Studien in einem murinen Asthma-Modell ergaben darüber hinaus, daß die allergische Entzündung zu einem Abwehrdefekt bei einer bakteriellen Infektion führt. Dieser Abwehrdefekt, der sich in einer verzögerten Klärung der bakteriellen Infektion zeigte, konnte auf eine geminderte Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine, einen geminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und eine geminderte Abgabe des antimikrobiellen Peptids CRAMP zurückgeführt werden.

Die vorliegende Studie zeigt, daß das Atemwegsepithel aktiv an der angeborenen Immunität beteiligt ist und daß äußere Einflüsse wie Zigarettenrauch aber auch eine allergische Entzündung das Abwehrsystem der Lunge beeinflussen.

2 Einleitung

2.1 Immunantwort der Atemwege

Der Respirationstrakt ist durch ein vielgestaltiges Abwehrsystem vor Keimen geschützt [1]. Dieses Abwehrsystem besteht sowohl aus einer physikalischen Barriere, die das zilientragende Atemwegsepithel darstellt, als auch aus den spezifischen Funktionen des Atemwegsepithels und der Zellen des Immunsystems. Verschiedene Zelltypen der angeborenen und adaptiven Immunantwort sind in der Lunge beschrieben: Alveolar-Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Eosinophile, dendritische Zellen, Mastzellen, natürliche Killerzellen und Lymphozyten [1;2]. Neben den Immunzellen leisten auch Atemwegsepithelzellen und Alveolarzellen einen Beitrag zu der Immunantwort. Die Sekrete der Atemwege enthalten Proteine und Peptide, die einerseits den Verlauf von Entzündungen beeinflussen, andererseits aber auch antimikrobiell für Mikroorganismen sind und Pathogene direkt abtöten können. Zu den klassischen Bestandteilen des Atemwegssekrets mit antimikrobieller Aktivität gehören zum Beispiel Lysozym, Lactoferrin und sekretorische Phospholipase A. Aber auch andere Faktoren wie das Komplementsystem, Surfactantproteine, Clarazellproteine (CC10, CCSP) und Proteine der PLUNC (palate, lung, and nasal epithelium clone) Familie tragen wahrscheinlich zu der Abwehr von Keimen bei [3;4]. In den letzten Jahren zeigte sich, daß neben den genannten Faktoren auch kationische antimikrobielle Peptide einen großen Anteil an der antimikrobiellen Aktivität des Atemwegssekrets haben [5].

2.2 Toll-like Rezeptoren

Lange Zeit wurde das angeborene Immunsystem als ein relativ unspezifisches System betrachtet. Die Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems schienen das Abtöten von Mikroorganismen und das Präsentieren von Antigenen für die Zellen der adaptiven Immunantwort zu sein [6]. In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, daß die angeborene Immunität wesentlich spezifischer als zuvor angenommen ist und zwischen körpereigenen Bestandteilen und Pathogenen

unterscheiden kann [7]. Die Möglichkeit zu unterscheiden, beruht im Wesentlichen auf einer Familie evolutionär konservierter Rezeptoren [8]. Diese Rezeptoren werden als Toll-like Rezeptoren (TLR) bezeichnet. Die Entdeckung der TLR hatte ihren Ursprung in der Identifizierung von Toll, einem Rezeptor, der bei der embryonalen Entwicklung von Insekten von Bedeutung ist [9]. Später wurde erkannt, daß Toll auch an der gegen Pilzinfektionen gerichteten angeborenen Immunantwort von Insekten beteiligt ist [10]. Die TLR bei Säugetieren wurden als Homologe von Toll mit Hilfe von Datenbankrecherche entdeckt [11]. Bei Menschen sind bisher mindestens 10 TLR bekannt [12]. TLR haben eine entscheidende Rolle in der schnellen Abwehr von Pathogenen. Darüber hinaus mehren sich die Hinweise, daß die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine Voraussetzung für die Induktion der adaptiven Immunität ist [13]. Dies scheint besonders für die Induktion einer T Helfer 1 (T_H1)-Zellantwort zu gelten.

Neben den TLR sind auch die zytosolischen Nod (nucleotide-binding oligomerization domain) Proteine, Nod1 und Nod2, Rezeptoren der angeborenen Immunität. Nod1 spielt eine Rolle bei der Erkennung von LPS und Murein im Zytosol. Die Stimulation von Nod1 führt zur Aktivierung von NF- κ B und MAP Kinasen [14;15]. Nod2 ist ein Rezeptor für Peptidoglycan und kann ebenfalls den NF- κ B abhängigen Signalweg aktivieren [16].

2.2.1 Struktur und Funktion der TLR/IL-1 Rezeptorfamilie

Toll-like Rezeptoren sind integrale Membranglycoproteine. Aufgrund ihrer Homologie in der zytoplasmatischen Region bilden die TLR eine Superfamilie mit den Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R). TLR und IL-1R haben eine konservierte cytoplasmatische Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne, wobei besonders drei konservierte Bereiche in der TIR Domäne für die Signaltransduktion von Bedeutung sind. Auf der anderen Seite unterscheiden sich die extrazelluläre Regionen der TLR und der IL-1R. Während TLR in der extrazellulären Region Wiederholungen mit zahlreichen Leucinen (LRR) besitzen, enthält die extrazelluläre Region der IL-1R drei Immunoglobulin ähnliche Domänen. Obwohl die LRR konserviert sind, können unterschiedliche TLR eine Vielzahl strukturell nicht miteinander verwandter Liganden

erkennen (Tab. 1), wie zum Beispiel Lipoprotein und Peptidoglycan (TLR2/TLR6), doppelsträngige RNA (TLR3), LPS (TLR4), Flagellin (TLR5), Zymosan (TLR6), einzelsträngige RNA (TLR8) und CpG enthaltende DNA (TLR9) [12;17;18].

TLR	Ligand (Ursprung)	Signalweg
TLR1	Triacyllipopetide (Bakterien)	MyD88 abhängig
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide (verschiedene Pathogene) Peptidoglycan (Gram-positive Bakterien) Lipoteichonsäure (Gram-positive Bakterien) Lipoarabinomannan (Mycobakterien) Glycoinositolphospholipide (<i>Trypanosoma cruzi</i>) Glycolipide (<i>Treponema maltophilum</i>) Porine (<i>Neisseria</i>) Zymosan (Pilze) HSP70 (Wirt)	MyD88 abhängig
TLR3	Doppelsträngige RNA (Viren) mRNA (Wirt)	MyD88 unabhängig
TLR4	LPS (Gram- negative Bakterien) Taxol (Pflanzen) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) HSP60 (Wirt) HSP70 (Wirt) Fibrinogen (Wirt)	MyD88 unabhängig MyD88 abhängig
TLR5	Flagellin (Bakterien)	MyD88 abhängig
TLR6	Diacyllipopetide (<i>Mycoplasma</i>)	MyD88 abhängig
TLR7	Imidazoquinoline (synthetisch) Loxoribine (synthetisch) Bropirimine (synthetisch)	MyD88 abhängig
TLR8	einzelsträngige RNA (HIV)	?
TLR9	CpG DNA (Bakterien)	MyD88 abhängig
TLR10	?	?

Tabelle 1: TLR und ihre Liganden: TLR können verschiedene und strukturell unterschiedliche Bestandteile von Mikroorganismen, Viren und des Wirts erkennen [19] und über Aktivierung des MyD88 abhängigen oder des MyD88 unabhängigen Signalwegs die Zellen aktivieren und eine Immunantwort induzieren.

Einige TLR sind an der Zellmembran lokalisiert (z.B. TLR1, TLR2 und TLR4) und werden nach ihrer Aktivierung mit ihren Liganden abgeschnürt und zum Phagosom rekrutiert. TLR können auch polarisiert an der Zelloberfläche exprimiert werden. Darmepithel, das apikal in ständigem Kontakt mit Mikroorganismen steht, lässt sich beispielsweise nur basolateral nicht aber apikal mit Flagellin aktivieren. TLR5 scheint polarisiert nur basolateral an der Zelloberfläche lokalisiert zu sein [20]. Bei Atemwegsepithelzellen hingegen, die ständig Bestandteilen von Pathogenen wie LPS ausgesetzt sind, scheint sich TLR4 hingegen in intrazellulären Kompartimenten zu befinden [21]. Auch TLR3 wird in Atemwegsepithelzellen nicht an der Zelloberfläche, sondern intrazellulär exprimiert [22]. Neben der für HEK293 Zellen beschriebenen Lokalisation von TLR9 an der Zelloberfläche [23], ist auch eine intrazelluläre Lokalisation für TLR9 bei Makrophagen beschrieben [24]. TLR9 befindet sich im endoplasmatischen Retikulum und wird nach Stimulation mit CpG-enthaltender DNA zum Lysosom rekrutiert [25].

Aktivierung von TLR führt zur Expression und Abgabe von verschiedenen Effektorproteinen, insbesondere von Zytokinen und Chemokinen (z.B. TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- β), aber auch von antimikrobiellen Peptiden (z.B. hBD-2). In der Zelle nimmt die Signaltransduktion ihren Anfang an der TIR-Domäne der TLR, an die verschiedene Adapterproteine binden können. Aufgrund der beteiligten Adapterproteine werden zwei Signalwege unterschieden: der MyD88 abhängige Signalweg und der MyD88 unabhängige Signalweg (Abb.1 und Tab. 1)[26].

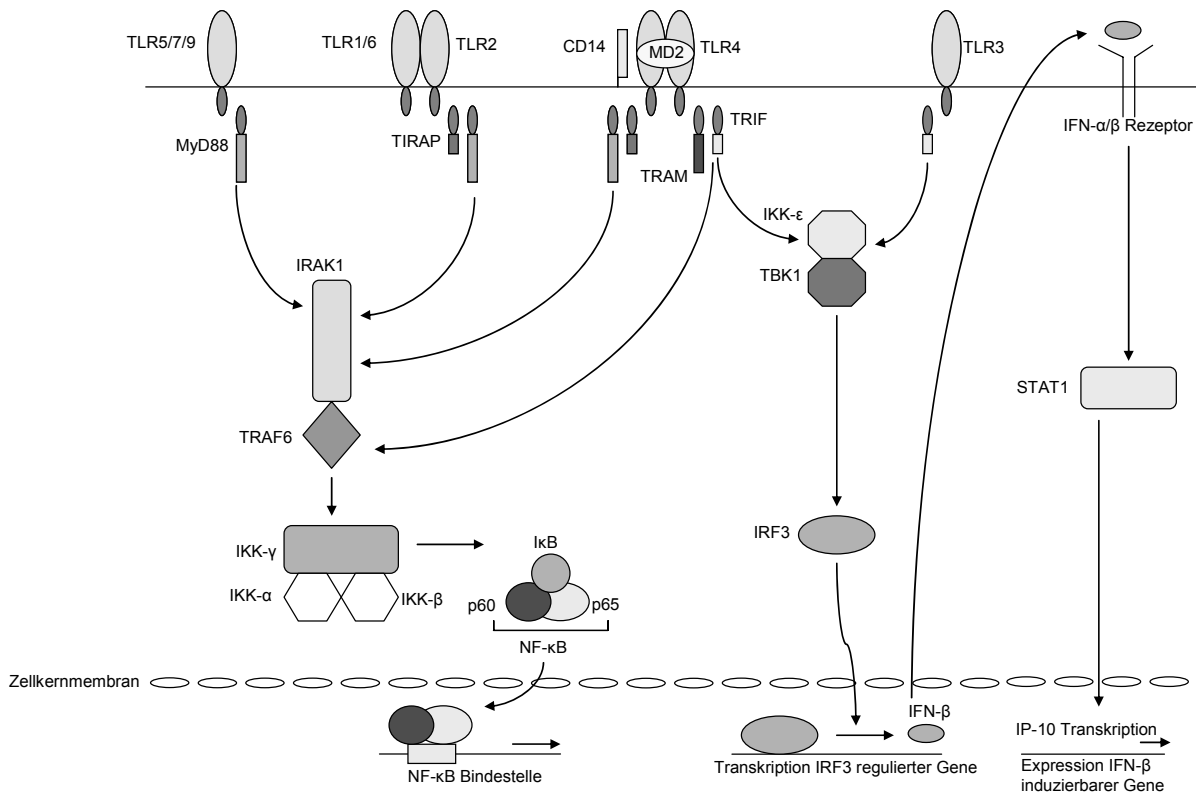


Abb. 1: Signalwege der TLR. Stimulation eines TLR kann je nach TLR zu der Aktivierung des MyD88 abhängigen oder auch des MyD88 unabhängigen Signalwegs führen. Der MyD88 abhängige Weg beinhaltet die frühe Aktivierung von NF- κ B, was zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Der MyD88 unabhängige Weg aktiviert IRF3. Dies führt zur Induktion von IFN- β und IFN- β induzierbarer Gene. Darüber hinaus kommt es zu einer späten Aktivierung von NF- κ B. TLR 1, 2, 5, 6, 7, 8 und 9 aktivieren den MyD88 abhängigen Weg, während TLR4 sowohl den MyD88 abhängigen als auch den unabhängigen Signalweg aktivieren kann. TLR3 aktiviert nur den MyD88 unabhängigen Weg [6].

2.2.2 MyD88 abhängiger Signalweg

Das erste bekannte Adapterprotein von TLR war MyD88 [27]. Wie alle bisher entdeckten Adapterproteine ist MyD88 ein zytoplasmatisches Protein und besitzt eine TIR-Domäne. Stimulation eines TLR oder IL-1R mit einem Liganden (z.B. TLR4 durch LPS) führt zur Bindung von MyD88 an die cytoplasmatische Region. Diese Bindung geschieht über die beiden TIR-Domänen. Nach der Rekrutierung von MyD88 an den TLR interagiert MyD88 über die sogenannten *death* Domänen mit IRAK-4 (IL-1 receptor-associated kinase). IRAK-4 seinerseits rekrutiert IRAK-1 zu diesem Komplex, was zur Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK-1 führt. IRAK-1 und

IRAK-4 verlassen nun den Rezeptor und interagieren mit TRAF-6, das darauf TAB-1 und TAB-2 an den Komplex rekrutiert. Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Kinase TAK-1. TAK-1 aktiviert nun Kinasen, die im Signalweg oberhalb der MAP Kinasen p38 und JNK liegen. Am Ende des Signalwegs steht die Aktivierung von NF- κ B [6;28-33]. Im Fall von TLR2 und TLR4 ist darüber hinaus das Adapterprotein TIRAP (auch MAL genannt), das ebenfalls eine TIR-Domäne besitzt, an der MyD88 abhängigen Signaltransduktion beteiligt [34]. Bis auf TLR3 scheinen alle TLR den MyD88 abhängigen Weg aktivieren zu können.

2.2.3 MyD88 unabhängiger Signalweg

In MyD88 defizienten Zellen ist nach Stimulation der TLR in den meisten Fällen keine oder eine stark verminderte NF- κ B Aktivierung vorhanden. Im Fall von TLR4 führt die Stimulation mit LPS über TLR4 jedoch zu einer zeitverzögerten Aktivierung von NF- κ B in MyD88 defizienten Zellen. Die durch LPS hervorgerufene Induktion der Interferon (IFN) induzierten Gene ist allerdings nicht beeinflusst oder verzögert [35]. Es können also zwei durch LPS induzierbare Signalwege unterschieden werden: Der oben beschriebene MyD88 abhängige Weg und der MyD88 unabhängige Weg, der mit der Aktivierung der IFN-induzierbaren Gene und einer langsamen NF- κ B Aktivierung in Verbindung gebracht wird. Nach Stimulation von TLR3 mit doppelsträngiger RNA ist ebenfalls eine MyD88 unabhängige Aktivierung von NF- κ B und Expression IFN-induzierter Gene zu beobachten [36]. Es zeigte sich, daß das Adapterprotein TRIF (TIR domain-containing inducing IFN- β ; auch TICAM1 genannt), das ebenfalls eine TIR-Domäne enthält, die verzögerte NF- κ B Aktivierung und die Expression der IFN-induzierten Gene vermittelt [37]. Für TLR3 ist TRIF der hauptsächliche Adapter. Die TRIF abhängige NF- κ B Aktivierung erfolgt über Interaktion von TRIF mit TRAF6. Die Induktion von IFN- β und der IFN- β induzierbaren Gene bedarf der Interaktion von TRIF mit den Kinasen TBK1 (TANK binding kinase-1) und IKK- ϵ . Die TRIF abhängige Aktivierung von TBK1 führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (interferon regulatory factor). Phosphoryliertes IRF3 bildet Dimere und wandert in den Zellkern, wo es die Transkription von IFN- β bewirkt [38-40]. Im Fall von TLR4 scheint TRIF an den Rezeptor nicht direkt zu binden, sondern über das Adapterprotein TRAM (Trif-related

adaptor molecule; auch TICAM2 genannt), das ebenfalls eine TIR-Domäne enthält [41;42]. Der MyD88 unabhängige Signalweg ist bisher nur für TLR3 und TLR4 beschrieben.

2.2.4 TLR des Atemwegsepithels

In Atemwegsepithel konnte die mRNA aller zehn TLR nachgewiesen werden [43]. *In vitro* Studien haben gezeigt, daß Atemwegsepithel sowohl durch spezifische TLR Liganden, als auch durch Mikroorganismen über TLR aktiviert wird. Bakteriell Lipopeptid stimuliert zum Beispiel TLR2 abhängig die Induktion von β -Defensin-2 in Atemwegsepithelzellen [44]. Experimente mit TLR4 defizienten murinen Atemwegszellen zeigten, daß TLR4 die Aktivierung von Atemwegsepithelzellen durch LPS vermittelt [21]. Darüber hinaus ist die Aktivierung von Atemwegsepithelzellen durch LPS MyD88 abhängig. Bakterielle DNA und CpG-Motive enthaltende DNA führen zur Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine [45]. *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin aktiviert hingegen Atemwegsepithelzellen über TLR2 und TLR5 [43;46]. Darüber hinaus ist TLR3 bei Atemwegsepithelzellen direkt an der Immunantwort auf den Influenza A Virus und doppelsträngige RNA beteiligt [22]. Die Aktivierung von Atemwegsepithelzellen durch Influenza A Viren über TLR3 wird MyD88 unabhängig über TRIF und über MAP Kinasen vermittelt. Des weiteren resultiert die Infektion mit dem respiratorischen Syncytial Virus in einer Hochregulation von TLR4. Dies sensibilisiert das Epithel für LPS [47], welches der Ligand für TLR4 ist.

2.3 Antimikrobielle Peptide

Der Ausdruck antimikrobielle Peptide (AMP) steht für Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften. Als AMP in einem weiteren Sinn werden alle Oligopeptide und Polypeptide bezeichnet, die Mikroorganismen abtöten oder deren Wachstum inhibieren. Mehr als 700 AMP wurden bereits isoliert und können aufgrund ihrer Synthese in der Zelle in zwei Gruppen unterteilt werden: Peptide, die nicht von Ribosomen synthetisiert werden und solche, die von Ribosomen synthetisiert werden [48]. Von Ribosomen synthetisierte AMP kommen bei fast allen Lebewesen vor und sind ein bedeutender Bestandteil des Abwehrsystems. AMP bei Wirbeltieren sind Effektormoleküle der angeborenen Immunantwort. Einerseits wirken AMP antimikrobiell und können Keime z.B. durch Interaktion mit der Zellmembran direkt lysieren und abtöten, andererseits sind AMP aber auch Entzündungsmediatoren mit einer Vielzahl von Eigenschaften [49-52]. So sind viele AMP chemotaktisch für Leukozyten und an der Regulation der Zellproliferation, Angiogenese, Wundheilung und adaptiven Immunantwort beteiligt.

Antimikrobielle Peptide können aufgrund ihrer Größe, Konformation und Struktur oder der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren gruppiert werden. AMP treten jedoch in einer sehr großen Vielfalt auf, so daß eine allgemein akzeptierte Klassifizierung schwierig ist [53-55]. Im Respirationstrakt sind die hauptsächlichen AMP Defensine und Cathelicidine. Verschiedene antimikrobielle Peptide wie z.B. LL-37/hCAP-18, die α -Defensine HNP1-4 und die β -Defensine hBD-1 und hBD-2 werden von verschiedenen Zelltypen in die Atemwege abgegeben (Abb. 2) [56-59].

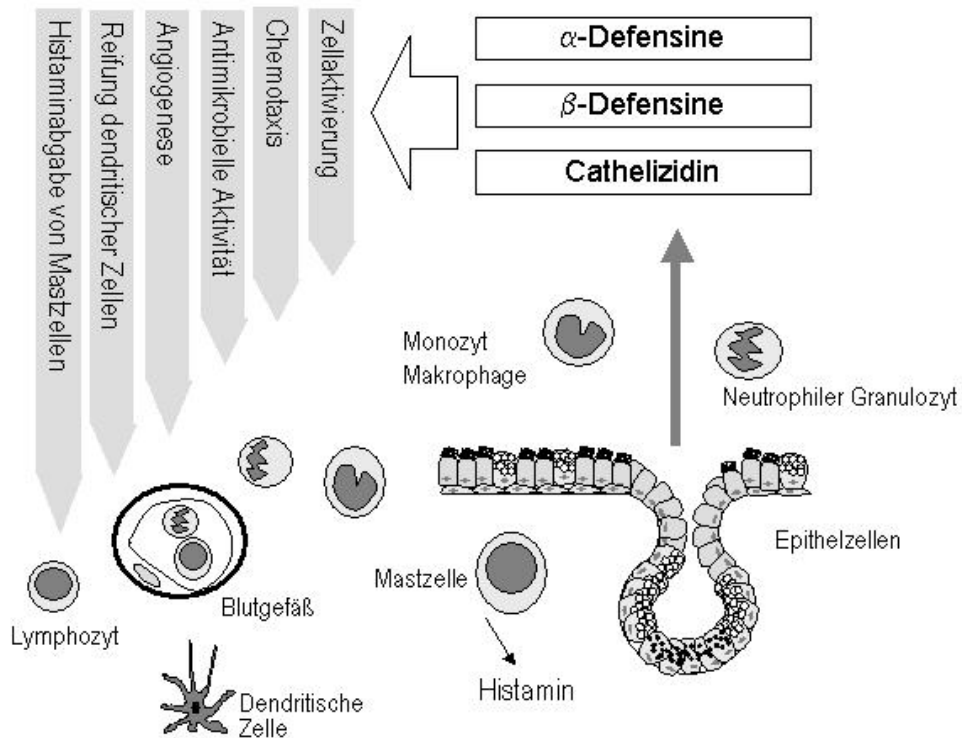


Abb. 2: AMP sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems: Atemwegsepithelzellen und Immunzellen geben AMP in die Atemwege ab. Einige AMP werden konstitutiv exprimiert, wie z.B. LL-37/hCAP-18 und das β -Defensin hBD-1 von Atemwegsepithelzellen; die Expression und Abgabe anderer AMP wie z.B. hBD-2 wird hingegen durch Mikroorganismen oder Entzündungsmediatoren induziert. Neben ihrer antimikrobiellen Aktivität haben AMP zahlreichen weitere Funktionen bei Wundheilung, Angiogenese und der Modulierung der Immunantwort, die teilweise durch spezifische Rezeptoren vermittelt werden.

2.3.1 Defensine

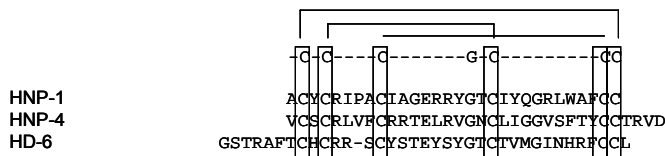
Die Defensine der Säugetiere sind kationische, nicht glykosylierte Peptide mit einer molekularen Größe von 3,5 bis 4,5 kD. Sie sind reich an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin und enthalten sechs Cysteine, die drei charakteristische intramolekulare Disulfidbrücken bilden [60]. Defensine können aufgrund der Anordnung ihrer Cysteine und ihrer Disulfidbrücken und der allgemeinen molekularen Struktur in drei Klassen eingeteilt werden: α -Defensine, β -Defensine und θ -Defensine (Abb. 3). Die Gene für alpha- und beta-Defensine sind in einem Cluster auf Chromosom 8p23 lokalisiert [61]. Ein Gen für HNP-2 wurde hier

nicht gefunden, was darauf hindeutet, daß HNP-2 ein proteolytisches Produkt von HNP-1 oder HNP-3 sein könnte. AMP von Insekten und Pflanzen werden auch als Defensine bezeichnet, haben jedoch andere strukturelle Merkmale als die Defensine der Wirbeltiere [62;63]. Durch Datenbankrecherchen wurde eine große Anzahl von möglichen Genen für weitere Defensine gefunden [64;65]. Ob die genomischen Sequenzen tatsächlich in bioaktive Proteine translatiert werden, ist allerdings nicht bekannt.

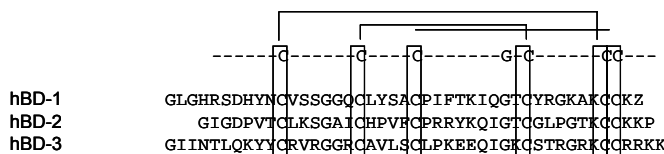
Cathelizidine

LL-37/hCAP-18 LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

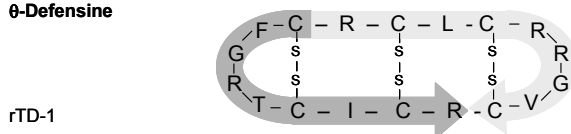
α-Defensine



β-Defensine



θ-Defensine



Dermcidin

DCD-1 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGGKAVHADVKDVLDSV

Abb. 3: Aminosäuresequenz und Struktur einiger wichtiger AMP: LL-37 ist der aktive C-terminale Teil von hCAP-18. Es ist das einzige bekannte Cathelizidin bei Menschen. Die Defensine bilden die größte Gruppe von AMP bei Menschen. θ-Defensine wurden allerdings bei Menschen bisher nicht gefunden. Dermcidin wird in der Haut gebildet und ist mit den anderen hier gezeigten AMP nicht verwandt. Während das Cathelizidin LL-37/hCAP-18 und Dermcidin keine Disulfidbrücken enthalten, besitzen α-, β- und θ-Defensine jeweils drei charakteristisch angeordnete Disulfidbrücken.

2.3.1.1 α -Defensine

α -Defensine sind etwa 29-35 Aminosäuren groß. Die sechs Cysteine bilden die drei Disulfidbrücken in einer 1-6, 2-4, 3-5 Anordnung. α -Defensine haben eine dreisträngige β -Faltblatt Struktur mit einer β -Haarnadel, die kationische Aminosäuren enthält. Das erste menschliche α -Defensin wurde 1985 aus neutrophilen Granulozyten isoliert [66]. Bis heute wurden beim Menschen sechs α -Defensine entdeckt. Die menschlichen neutrophilen Granulozyten Peptide 1-4 (HNP1-4) sind in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert, wo sie das hauptsächliche Protein ausmachen und zum Sauerstoff unabhängigen Abtöten von phagozytierten Mikroorganismen beitragen [66;67]. Zwei weitere α -Defensine (HD 5--6) werden in erster Linie in den Paneth-Zellen des Dünndarms gefunden [68;69]. In den Atemwegssekreten findet man die HNP1-4, die von in den Respirationstrakt eingewanderten neutrophilen Granulozyten abgegeben wurden.

2.3.1.2 β -Defensine

β -Defensine bestehen aus 36 bis 42 Aminosäuren. Die sechs Cysteine bilden die drei Disulfidbrücken in einer 1-5, 2-4, 3-6 Anordnung aus. Das erste humane β -Defensin, humanes β -Defensin 1 (hBD-1), wurde aus einem großen Volumen Hemofiltrat isoliert [70]. hBD-1 wird konstitutiv von Epithelzellen der Atemwege gebildet [57;71;72]. Menschliches β -Defensin 2 (hBD-2) wurde erstmals aus Haut isoliert und wird von verschiedenen Epithelien der inneren und äußeren Oberfläche des menschlichen Körpers wie z.B. denen der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts gebildet [58;73]. Die Konzentrationen von hBD-1 und hBD-2 in Sekreten der Atemwege liegen etwa bei 1 μ g / ml. hBD-3 wurde durch Bioscreening und parallel durch Datenbankrecherche entdeckt [65;74;75]. hBD-4 wurde nur durch die Suche in genomischen Datenbanken entdeckt [76]. Des Weiteren sind bis zu 28 neue humane und 43 neue murine β -Defensin Gene in fünf chromosomalen Regionen durch Recherchen in genomischen Datenbanken bekannt [64]. Viele dieser neuen Gene werden in der Epididymis exprimiert [77;78]. Menschliche β -Defensine haben gemeinsame strukturelle Merkmale [79]. Die Tertiärstruktur von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 ist ähnlich, mit einem kurzen helikalen Segment, das

einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt vorangeht. Es wird angenommen, daß hBD-3 als Dimer vorliegt, während hBD-1 und hBD-2 Monomere sind. Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie zeigte, daß hBD-1, hBD-2 und die Mausdefensine mBD-7 und mBD-8 ohne signifikante Übereinstimmung in ihrer Sequenz ähnlich in der Sekundärstruktur und der Tertiärstruktur sind [80].

2.3.1.3 θ -Defensine

Aus neutrophilen Granulozyten von Rhesusaffen wurde eine weitere Klasse von Defensinen isoliert, die wegen ihrer zirkulären molekularen Struktur θ -Defensine genannt werden [81]. Das Rhesus- θ -Defensin-1 (RTD-1) wird durch posttranslationale Ligation von zwei verkürzten α -Defensinen gebildet [82]. Beim Menschen enthalten die homologen Gene Stop Mutationen, die eine vollständige Translation und somit funktionsfähige Proteine unterbinden [83]. Bemerkenswerterweise blockiert ein chemisch synthetisiertes Peptid, das mit dem genetisch inaktivierten Peptid übereinstimmt, die Replikation von HIV-1 [84].

2.3.2 Cathelizidine

AMP der Cathelizidin Familie enthalten einerseits eine hoch konservierte Signalsequenz und Pro-Region (genannt "cathelin" = Cathepsin L Inhibitor), andererseits sind sie aber äußerst heterogen in der C-terminalen Domäne. Die Cathelin Proregion hat signifikante antimikrobielle Aktivität und wirkt als Antiprotease [85]. Die C-terminale Domäne stellt das eigentliche AMP dar und ist zwischen 12 und 80 Aminosäuren groß [86;87]. Das einzige bekannte menschliche Cathelicidin, LL-37/hCAP-18, wurde aus menschlichem Knochenmark isoliert [88-90]. Dieses Peptid wird hauptsächlich in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet, wo es in Granula gespeichert wird. Es wird aber auch von einigen Epithelzellen synthetisiert. In den Atemwegen wird LL-37/hCAP-18 von Epithelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten gebildet und in das Atemwegssekret abgegeben [56]. LL-37 wurde sowohl in Überständen von Gewebekulturen von Atemwegszellen nachgewiesen, als auch in Lungenspülungen

bei Patienten [56;91]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, wie LL-37/hCAP-18 in der Lunge prozessiert wird. Bei neutrophilen Granulozyten wird das Protein als Pro-Peptid in den spezifischen Granula gespeichert. Nachdem das Pro-Peptid von der Zelle abgegeben wird, wird es durch die Protease 3 geschnitten, wodurch das aktive LL-37 entsteht [92]. In Seminalplasma wird hCap-18 durch die Protease Gastricin, die aus der Prostata kommt, prozessiert. Hierbei entsteht das um eine Aminosäure längere AMP ALL-38 [93]. Die antimikrobielle Aktivität von ALL-38 ist der von LL-37 gleich. LL-37 kann auch im Plasma nachgewiesen werden und bindet dort an das Plasmaprotein A-1 [94;95]. Das LL-37/hCap-18 Gen besteht aus vier Exons und ist auf Chromosom drei lokalisiert. Cathelicidine wurde auch aus Maus (CRAMP), Ratte (rCRAMP), Schwein (Protegrin, PMAP-23, PR-39), Affe (rhLL-37, RL-37) und Schaf (SMAP 29, SMAP 34) isoliert.

2.3.3 Weitere antimikrobielle Peptide

Granulysin wird von humanen zytolytischen T-Lymphozyten und NK-Zellen gebildet [96]. Es ist gegen eine Vielzahl von Mikroben wie Gram negative und Gram positive Bakterien, Pilze und Parasiten aktiv. Obwohl es funktionell mit anderen antimikrobiellen Peptiden wie den Defensinen und Cathelizidinen verwandt ist, unterscheidet sich Granulysin in seiner Struktur.

Dermcidin ist ein AMP mit einem breiten Wirkungsspektrum [97]. Dermcidin hat keine Homologie zu anderen bekannten AMP. Es wird in Schweißdrüsen der Haut gebildet und in den Schweiß abgegeben.

Psoriasin wird von der Haut gebildet und hemmt spezifisch das Wachstum von *Escherichia coli*, indem es Zink-Ionen abfängt [98].

2.3.4 Regulation antimikrobieller Peptide

Die Expression und Abgabe von AMP ist genau reguliert. AMP werden von Geweben und in Entzündungszellen, die sich an der Abwehr von Pathogenen beteiligen, gebildet. Einige Peptide wie zum Beispiel hBD-1 werden konstitutiv exprimiert [99], andere werden erst nach Kontakt mit mikrobiellen Produkten oder pro-

inflammatorischen Entzündungsmediatoren gebildet. Die Expression und Abgabe von hBD-2, hBD-3, hBD-4 und einigen anderen AMP lassen sich *in vitro* durch bakterielle Produkte oder pro-inflammatorische Mediatoren induzieren [74;100-104]. In Atemwegsepithelzellen ist hBD-2 beispielsweise durch LPS [105], durch bakterielle DNA [106] und durch *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha und IL-1 induzierbar [104]. Der Promotor von hBD-2 enthält Bindestellen für NF-κB, AP-1, STATs und NF-IL-6 [104]. Mehrere Studien zeigen, daß NF-κB und MAP Kinasen an der Induktion der Expression von hBD-2 durch Mikroorganismen und pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 maßgeblich beteiligt sind [102;103;107-111]. TLR2 vermittelt die hBD-2 Induktion durch Lipoprotein [110;112]. Bei Epithelzellen ist der Transkriptionsfaktor MEF unabhängig von NF-κB ein Transaktivator von hBD-2 [113]. Darüber hinaus sind AP-1 und intrazelluläres Kalzium an der Expression von hBD-2 in Atemwegsepithelzellen beteiligt [114;115]. Atemwegsepithelzellen können auch von Makrophagen, die mit LPS stimuliert wurden, veranlaßt werden, hBD-2 zu exprimieren. Dies wird in erster Linie über die Zytokine IL-1 und TNF-α vermittelt, die von den Makrophagen abgegeben werden [108]. Auch neutrophile Elastase induziert hBD-2 Expression in Atemwegsepithelzellen [116].

Chronische Entzündungen können hingegen im Zusammenhang mit verminderter Expression von Defensinen und LL-37 stehen. Ein Beispiel hierfür ist die atopische Dermatitis. Atopische Dermatitis ist eine Hauterkrankung, bei der Th2-Zytokine erhöht sind. Die Expression von LL-37, hBD-2, hBD-3 und pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8 ist hingegen bei atopischer Dermatitis vermindert [117;118]. Die verminderte Expression von β-Defensinen und LL-37 bei atopischer Dermatitis scheint eine Folge der Hochregulation von Th2-Zytokinen und der verminderten Expression pro-inflammatorischer Zytokine zu sein [117]. Die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8 wird auch in Atemwegszellen durch Th2-Zytokine gehemmt [119;120]. Auch Gastrointestinale *Shigella dysenteriae* Infektionen bei Menschen werden mit verminderter LL-37 Expression in Epithelzellen in Verbindung gebracht [121].

Über die Inaktivierung von antimikrobiellen Peptiden ist wenig bekannt. Die antimikrobielle Aktivität von LL-37 in Sekreten der Atemwege wird durch Bündelbildung mit F-Actin und DNA inhibiert [122]. Elastolytische Cathepsine

scheinen am Abbau von hBD-2 und hBD-3 beteiligt zu sein [123]. Proteasen, die von gewöhnlichen pathogenen Bakterien abgegeben werden, können LL-37 abbauen und inaktivieren [124].

2.3.5 Funktion antimikrobieller Peptide

2.3.5.1 Antimikrobielle Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität von peptidischen Antibiotika wurde von *in vitro* Tests abgeleitet, bei denen die Wirkung aufgereinigter Faktoren auf Mikroorganismen untersucht wurde. AMP haben eine breite Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, gegen Pilze und gegen eingehüllte Viren. Die minimalen hemmenden Konzentrationen dieser Peptide reichen von 0,1 bis 10 µg/ml. Die antimikrobielle Aktivität basiert auf verschiedenen Mechanismen. In den meisten Fällen ist für die antimikrobielle Aktivität die Interaktion zwischen dem Peptid und der Oberflächenmembran des Zielorganismus von besonderer Bedeutung. Es wird angenommen, daß für die Bindung von AMP an die Zielzelle elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen AMP und den negativ geladenen Molekülen an der Oberfläche der Zielzelle von Bedeutung sind. In einem zweiten Schritt werden die biophysikalischen Eigenschaften der Membran der Zielzelle durch Wechselwirkung mit den AMP verändert [125;126]. Dies scheint letztlich zu Ionen durchlässigen Kanälen in der Membran zu führen, was mit einem Zusammenbruch des Membranpotentials und dem Verlust der Zelle von Ionen und Metaboliten einhergeht. Die Selektivität von AMP für prokaryotische Zellen scheint an der im Vergleich zu eukaryotischen Zellen unterschiedlichen Zusammensetzung der zur Membran zu liegen.

In den letzten Jahren sind verschiedene Forschungsergebnisse veröffentlicht worden, die die Bedeutung antimikrobieller Peptide bei der Abwehr von Pathogenen *in vivo* untermauern. Indirekte *in vivo* Beweise für die Beteiligung von AMP an der Abwehr von Bakterien lieferte eine Studie mit Mäusen, bei denen das Gen für Matrilysin (Matrix Metalloprotease 7) unterbrochen war. Matrilysin reguliert die Aktivierung von α -Defensinen im Darm, indem es von den Vorläuferproteinen der

reifen α -Defensine das Pro-Segment abschneidet. Mäuse ohne Matrilysin waren anfälliger für Infektionen von Enteropathogenen [127]. Studien an einem humanen bronchialen Xenograft Modell zeigten, daß die Inhibierung von hBD-1 mit Hilfe von antisense Oligonukleotiden zu einer geminderten antimikrobiellen Aktivität im Atemwegssekret führte [71]. Mäusen, denen das β -Defensin-1 fehlt, zeigten eine verzögerte Klärung einer *Haemophilus influenza* Infektion in der Lunge [128] und mehr Bakterien im Harntrakt bei Staphylokokken infektion [129]. Mäuse, bei denen das Gen für CRAMP, das murine Homolog zu LL-37, ausgeschaltet ist, zeigten eine stärkere und langsamer abheilende bakterielle Infektion der Haut [130]. Die antimikrobielle Aktivität von Mastzellen wird teilweise durch CRAMP vermittelt [131]. Mastzellen aus Mäusen, denen CRAMP fehlte, hatten im Vergleich zu Mastzellen aus Wildtyp Mäusen eine verminderte Fähigkeit, Bakterien abzutöten. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von LL-37 mittels viralen Gentransfers im bronchialen Zystische Fibrose Xenograft Modell zu einer Verstärkung der angeborenen Abwehr [56;132]. Die transgene Expression eines humanen Defensins aus dem Darm in Mäusen schützte die Tiere vor Infektion mit Salmonellen [133].

Resistenzen bei Mikroorganismen gegen AMP kommen selten vor, sie sind jedoch ein indirekter Hinweis auf die antimikrobielle Aktivität von AMP *in vivo*. Ein erhöhter Anteil an Phosphorylcholin an der Zelloberfläche von *Haemophilus influenzae* kann deren Anfälligkeit gegenüber LL-37 vermindern [134]. *Staphylococcus aureus* erreicht Resistenz gegenüber kationischen AMP hingegen durch die Modifizierung des anionischen Phosphatidylglycerols mit positiv geladenen L-Lysin, was zu einer Abstoßung der ebenfalls positiv geladenen AMP führt [135]. Mutanten, die ihr Phosphatidylglycerol nicht modifizieren können, sind weniger resistent gegenüber kationischen AMP [135]. Darüber hinaus produzieren einige *S. aureus* Stämme das Exoprotein Staphylokinase. Staphylokinase induziert die Sekretion von α -Defensinen aus neutrophilen Granulozyten, formt mit ihnen einen Komplex und neutralisiert so ihre bakteriozide Wirkung [136]. *P. aeruginosa* Bakterien können in den Atemwegen von Patienten mit Zystischer Fibrose die Struktur ihres LPS in der äußeren Membran verändern [137]. Diese Veränderungen vermindern die Anfälligkeit der Bakterien gegenüber kationischen AMP.

2.3.5.2 Funktion antimikrobieller Peptide bei Entzündung, Chemotaxis, Zellaktivierung, Wundheilung und Angiogenese

Neben der antimikrobiellen Aktivität haben AMP noch weitere biologische Funktionen. Aufgrund ihrer Eigenschaften an Biomembranen sind AMP abhängig von ihrer Konzentration toxisch für eukaryotische Zellen. In Sekreten von Patienten mit Zystischer Fibrose [138] und Patienten mit chronischer Bronchitis [139] sind hohe Konzentrationen von α -Defensinen gefunden worden. Diese α -Defensine leisten wahrscheinlich einen Beitrag zu der starken Entzündung bei Patienten mit Zystischer Fibrose. α -Defensine induzieren die Bildung und Abgabe von IL-8 in respiratorischen Zellen [140] und können zur Lyse von Epithelzellen führen [141]. Des Weiteren binden α -Defensine an Proteaseinhibitoren der Serpin Familie wie z.B. α 1-Antitrypsin und inhibieren deren Antiprotease-Aktivität [142].

Neben diesen nicht spezifischen Effekten, binden AMP auch spezifisch an Rezeptoren und sind an der Regulation von Chemotaxis und der Aktivierung von Immunzellen beteiligt (Tab. 2). Viele AMP sind chemotaktisch für Leukozyten. HNP-1-3, hBD-1, hBD-2, hBD-3, mBD-2 und mBD-3 sind chemotaktisch für unreife dendritische Zellen [52]. Maus β -Defensin 2 ist als Fusionsprotein nicht nur chemotaktisch für CCR6 exprimierende unreife dendritische Zellen [143], sondern auch ein TLR4 Ligand für diese Zellen [144], was zur Hochregulierung von CD40, CD80, MHC Klasse II und des Chemokinrezeptors CCR7 und zur Reifung der dendritischen Zellen führt. hBD-1 und hBD-2 können an den Chemokinrezeptor CCR6 binden [145]. Dieser Rezeptor ist bei unreifen dendritischen Zellen und Gedächtnis T Zellen (CD4+/CD45RO+) vorhanden. Defensine scheinen über CCR6 die angeborene Immunität mit der adaptiven Immunität zu verbinden. hBD-2 induziert Pertussistoxin sensitive und Phospholipase C abhängige Migration von Mastzellen [146]. hBD-3 und hBD-4 sind chemotaktisch für Monozyten, die daran beteiligten Rezeptoren sind allerdings nicht bekannt [74;76]. Humane α -Defensine sind über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor chemotaktisch für Lymphozyten und Monozyten [147;148]. LL-37 kann an den FPRL1 (formyl peptide receptor like 1) binden und ist durch die Aktivierung dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors chemotaktisch für neutrophile Granulozyten, Monozyten und CD4 T-Zellen [149]. Bei humanen Monozyten, aber nicht bei B- und T-Lymphozyten, aktiviert LL-37 die MAP

Kinasen ERK und p38 über einen G-Protein Rezeptor unabhängigen aber weiter noch nicht näher bekannten Mechanismus [150]. Darüber hinaus können LL-37 und hBD-2 über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und in Abhängigkeit von Phospholipase C Mastzellen aktivieren [151], was die Ausschüttung von Histamin zur Folge hat. LL-37 führt auch zur P2X Rezeptor vermittelten Abgabe von IL-1 aus Monozyten [152]. LL-37 beeinflusst darüber hinaus die Differenzierung dendritischer Zellen und die durch dendritische Zellen verursachte T-Zell Polarisierung [153]. Dendritische Zellen, die aus Monozyten unter dem Einfluß von LL-37 generiert wurden, haben eine erhöhte Endozytosekapazität, eine veränderte Expression von Rezeptoren, die an der Phagozytose beteiligt sind, und eine verstärkte Abgabe der Th-1 Antwort induzierenden Zytokine [153].

Des weiteren sind AMP auch an Wundheilung, Angiogenese, Vaskularisierung, Epithelialisierung und Proliferation beteiligt. Humane neutrophile Granulozyten Defensine induzieren Proliferation von humanen Atemwegsepithelzelllinien mittels eines EGF-Rezeptor unabhängigen, jedoch MAP Kinase abhängigen Signalwegs [154]. Darüber hinaus verstärken neutrophile Defensine den Wundschluß von Lungenepithelzellen und die Expression von Muzinen *in vitro*.

LL-37 scheint einer der Faktoren zu sein, mit denen neutrophile Granulozyten die Aktivität von Epithelzellen modulieren. Die durch LL-37 hervorgerufene Aktivierung von Atemwegsepithelzellen beinhaltet die Aktivierung der MAP Kinase ERK und eine gesteigerte Abgabe von IL-8 [155]. LL-37 transaktiviert den EGF-Rezeptor mittels Metalloproteinasen, die in der Zellmembran verankerte EGF-Rezeptorliganden schneiden und freisetzen [156]. LL-37 ist auch am Wundschluß und an der Reepithelialisierung menschlicher Haut beteiligt [157]. LL-37 wird in verletzter Haut verstärkt gebildet. Inhibierung von LL-37 mit Antikörpern mindert die Reepithelialisierung in *ex vivo* Wundheilungsmodellen [157].

LL-37 stimuliert Angiogenese bei Endothelzellen durch die Aktivierung von FPRL1 [158]. Dies führt zu einer gesteigerten Proliferation und Bildung von Gefäß ähnlichen Strukturen *in vitro*. Mäusen, denen CRAMP fehlt, zeigen verminderte Vaskularisierung von Wunden.

Interessanterweise haben auch einige der durch Interferon induzierbaren Chemokine antimikrobielle Aktivität [159]. Das Chemokin CCL20/MIP- α hat antimikrobielle

Aktivität gegen *Escherichia coli* und *S. aureus* und bindet genau wie hBD-1 und hBD-2 an CCR6. Es gibt jedoch zwischen MIP- α und β -Defensinen neben den zahlreichen positiv geladenen Gruppen, den vorhandenen Disulfidbrücken und anderen strukturellen Ähnlichkeiten keine klaren Übereinstimmungen in der Sequenz [160]. In der letzten Zeit wurden mehr als 17 humane Zytokine entdeckt, die antimikrobielle Aktivität *in vitro* haben [161]. Diese Ergebnisse unterstreichen die strukturelle und funktionelle Beziehung zwischen antimikrobiellen Peptiden und Chemokinen.

Die biologische Bedeutung der *in vitro* beobachteten Rezeptor vermittelten Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden ist bis heute noch unklar. Viele AMP zeigen die beschriebenen Effekte nur bei relativ hohen und mitunter unphysiologischen Konzentrationen. Es ist nicht eindeutig, ob AMP die eigentlichen Liganden für die erwähnten Rezeptoren sind oder AMP nur die Aktivität anderer Liganden beeinflussen. Auch wenn antimikrobielle Peptide von Wirbeltieren eine Vielzahl von weiteren Funktionen neben ihrer antimikrobiellen Aktivität haben, ist die Rolle dieser nicht antimikrobiellen Funktionen bei Krankheiten vollkommen spekulativ.

Familie	Name	Ursprungszelle	Rezeptor	Funktion
α -Defensin	HNP-1-4	neutrophile Granulozyten	nicht bekannt	Antibiotisch; IL-8 Sekretion von Epithelzellen; Chemoattraktion von T-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten; gesteigerte Proliferation von Epithelzellen; Aktivierung von Mastzellen
	HD5-6	Atemwegsepithelzellen	nicht bekannt	Antibiotisch
β -Defensin	hBD-1-4	Atemwegsepithelzellen, Makrophagen, Type II Pneumozyten	CCR6 (hBD-1, hBD-2); nicht bekannt (hBD-3, hBD-4)	antibiotisch; Chemoattraktion von T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen; Aktivierung von Mastzellen
Cathelizidin	LL-37/hCAP-18	Atemwegsepithelzellen, Makrophagen, Type II Pneumozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten	FPRL-1 P2X	Antibiotisch; IL-8 Sekretion von Epithelzellen; Chemoattraktion von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten; Aktivierung von Mastzellen und Epithelzellen; Angiogenese
nicht bekannt	Granulysin	zytolytische T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen	nicht bekannt	Antibiotisch

Tab. 2: Antimikrobielle Peptide des menschlichen Respirationstrakts und ihre Rezeptoren: AMP haben neben ihrer antimikrobiellen Aktivität zahlreiche weitere Funktionen bei Entzündung, Wundheilung und Angiogenese, die teilweise über bekannte Rezeptoren vermittelt werden.

2.3.6 Die Rolle antimikrobieller Peptide bei Erkrankungen des Respirationstrakts

Infektionen der Lunge gehören weltweit zu den häufigsten Erkrankungen. Alleine in Deutschland erkranken ca. 800000 Menschen jedes Jahr an einer Pneumonie. Pneumonie ist die sechsthäufigste Todesursache in Deutschland. Darüber hinaus ist die steigende Zahl von Infektionen mit Bakterien mit multiplen Resistenzen ein zunehmendes Problem.

Faktoren der angeborenen Immunität des Respirationstrakts wie das Komplementsystem und die Surfactant Proteine sind bei der Abwehr von Pathogenen wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* von zentraler Bedeutung [162]. Darüber hinaus zeigte sich, daß auch TLR an der Abwehr von Infektionen mit Pneumokokken beteiligt sind. So weisen z.B. Mäuse, denen ein funktioneller TLR4 fehlt, eine höhere Sterblichkeit nach intranasaler Infektion mit *S. pneumoniae* auf als

Wildtyptiere [163]. Über die Funktion antimikrobieller Peptide bei einer Pneumonie ist wenig bekannt. Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, daß die Konzentrationen von Defensinen während bakterieller Infektionskrankheiten der Lunge wie etwa bei neonataler und adulter Pneumonie, erhöht sind [164;165]. Erhöhte Konzentrationen von α -Defensinen wurden auch bei Patienten mit Empyemen gefunden [166]. Bei der Infektionskrankheit Tuberkulose ist in den meisten Fällen auch die Lunge betroffen. Im Plasma und in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit pulmonaler Tuberkulose [167] und von Patienten mit *Mycobacterium avium-intracellulare* Infektionen [168] wurden erhöhte Konzentrationen von Defensinen gefunden.

Zystische Fibrose ist eine Modellkrankheit für Defekte der angeborenen Immunabwehr. Zystische Fibrose ist durch eine chronische Infektion und eine äußerst starke neutrophile Granulozyten Entzündung gekennzeichnet. Die Ursache für Zystische Fibrose ist ein Defekt im Gen des *CF transmembrane conductance regulator* (CFTR) [169]. Die Lungenerkrankungen bei Zystischer Fibrose sind eindeutig durch einen Defekt des lokalen angeborenen Immunsystems verursacht [2]. Die Biogenese und Abgabe von funktionsfähigen antimikrobiellen Faktoren könnte durch intrazelluläre Defekte der Atemwegszellen verändert sein, wie es die von der Salzkonzentration unabhängigen erniedrigte antimikrobielle Aktivität in Atemwegssekreten von Zystische Fibrose Patienten nahelegt [170]. Ob AMP eine direkte Rolle im initialen Prozeß spielen, der den defekten CFTR mit der geschwächten Immunabwehr verbindet, ist nicht bekannt. Auf der anderen Seite scheinen AMP zu der überschießenden Entzündung beizutragen. Mehrere Studien haben gesteigerte Konzentrationen von β -Defensinen in Atemwegen von Zystische Fibrose Patienten gefunden [73]. Ebenso werden erhöhte α -Defensin Konzentrationen gefunden [138]. Bei chronisch entzündeten Zystische Fibrose Lungen scheint die Expression von β -Defensinen hingegen unterdrückt zu sein.

Diffuse Panbronchiolitis ist eine Lungenkrankheit mit chronischer Entzündung unbekanntem Ursprungs, die der Zystischen Fibrose ähnlich ist [171]. Bei diffuser Bronchiolitis sind Defensine aus neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen erhöht und könnten ein Marker der erhöhten neutrophilen Granulozyten Aktivität bei dieser Krankheit sein [172]. Erhöhte β -Defensin Konzentrationen wurden im Plasma

und in broncho-alveolärer Lavageflüssigkeit von Patienten mit dieser Krankheit gefunden [173].

Bis heute gibt es keine Daten über die Konzentrationen von antimikrobiellen Peptiden bei Asthma und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Aufgrund ihrer Funktion als Entzündungsmediatoren sind AMP an der Pathogenese dieser Erkrankungen höchstwahrscheinlich beteiligt. Ein Polymorphismus des Gens für hBD-1 wird in größerer Häufigkeit bei COPD Patienten gefunden [174]. Es ist unklar, ob bei diesen Krankheiten die Expression von AMP gehemmt ist. Besonders bei der COPD stellt sich jedoch die Frage, inwiefern die durch chronisches Rauchen verursachten Infektionen in Zusammenhang mit möglicherweise veränderter Expression von AMP stehen, und chronisches Rauchen so zu einem Abwehrdefekt führt.

2.4 COPD und angeborene Immunität

Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Alleine in den USA sind mehr als 16 Millionen Menschen von COPD betroffen. Die Hauptursache für das Auftreten einer COPD ist der Tabakmißbrauch. Die COPD entsteht sehr langsam, die auftretende Obstruktion der Atemwege ist kaum reversibel. COPD ist durch eine chronische Entzündung der Atemwege durch neutrophile Granulozyten und Monozyten, Umbau des Bronchialepithels, Abbau des Lungenparenchyms (Emphysem) und einen irreversibel geminderten Atemfluß gekennzeichnet [175;176]. Patientenstudien zeigen, daß das Voranschreiten der COPD mit der Anhäufung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und CD⁸⁺-Lymphozyten im Lumen der kleinen Atemwege, also dem Einwandern von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität signifikant verbunden ist [177]. Diese Veränderungen stehen im Zusammenhang mit Reparatur- und Umbauprozessen, die zu einer Verdickung der Wände der Atemwege führen.

Tabakkonsum führt zu einer ständigen Entzündung der Bronchien und macht diese anfällig für Infektionen [178]. Neben über 4000 verschiedenen chemischen Verbindungen enthält ein Zigarettenzug geschätzte 10^{17} freie Radikale und

Oxidantien [179]. Als Folge des oxidativen Streß werden redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 aktiviert, die für die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine von Bedeutung sind [180].

Es verwundert kaum, daß Raucher häufig an einer chronischen Bronchitis leiden und chronische Bronchitis zur Entstehung einer COPD beiträgt. Chronische Entzündung führt zur Abnahme des Flimmerepithels, so daß Schadstoffe und Bakterien schlechter aus den Atemwegen entfernt werden und Infektionen sich festsetzen können. Die durch Zigarettenrauch verursachte Entzündung ist mit einem erhöhten Einstrom von Immunzellen, besonders neutrophiler Granulozyten, verbunden. Neutrophile Granulozyten bilden im Rahmen der Abwehr bakterieller Infektionen Faktoren wie z.B. Proteasen, die bei nicht abklingender Entzündung auch körpereigenes Gewebe schädigen. Das Lungenparenchym wird geschädigt und Lungenoberfläche für den Gasaustausch geht verloren.

Um die Pathogenese der COPD besser verstehen zu können, wurden in den letzten Jahren zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien durchgeführt, die die unmittelbaren und akuten Auswirkungen von Zigarettenrauch untersuchten. Es zeigte sich, daß neben den Immunzellen der Atemwege auch Atemwegsepithelzellen und parenchymatische Zellen aktiv an der durch Zigarettenrauch verursachten Entzündung beteiligt sind. Stimulation von Lungenfibroblasten und bronchialen Epithelzellen mit Zigarettenrauch hat die Abgabe von Faktoren (z.B. IL-8) [181-186], die chemotaktisch für neutrophile Granulozyten und Monozyten sind, und die Aktivierung von MAP Kinasen und NF- κ B in Immunzellen und Epithelzellen [182;187-189] zur Folge. Dies führt zu einer gesteigerten chemotaktischen Aktivität in den Zellkulturüberständen. Zigarettenrauchextrakt verringert darüber hinaus die Fähigkeit kultivierter bronchialer Epithelzellen zu Reparaturvorgängen [190] und erhöht die Permeabilität des Atemwegsepithels [191].

2.5 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der angeborenen Immunität des Atemwegsepithels und des Respirationstrakts.

In den letzten Jahren zeigte sich, daß Atemwegsepithel aktiv an der angeborenen Immunität des Respirationstrakts beteiligt ist. Als erstes soll daher gezeigt werden, daß TLR in Atemwegsepithelzellen *in vitro* exprimiert werden und die Aktivierung von TLR zur Induktion von Chemokinen, Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden führt. Als nächstes soll untersucht werden, ob antimikrobielle Peptide bei Erkrankungen des Respirationstrakts in den Atemwegssekreten vorhanden und in ihrer Konzentration verändert sind. Hierfür sollen die Konzentrationen des Cathelizidins LL-37/hCAP-18 und des β -Defensins hBD-2 in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten und Patienten mit COPD basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel gemessen werden.

Um die Auswirkung von Zigarettenrauch auf die angeborene Immunität des Atemwegsepithels zu untersuchen, soll eine Expositions-kammer zur *in vitro* Inkubation von voll ausdifferenzierten Atemwegsepithelzellen mit Zigarettenrauch etabliert werden. Mit Hilfe der Kammer soll untersucht werden, ob Rauchexposition eine Entzündung der Epithelzellen verursacht und die Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine induziert. Als nächstes wird charakterisiert, wie Zigarettenrauch die angeborene Immunantwort der Atemwegsepithelzellen bei einer bakteriellen Infektion modifiziert. Um mögliche Effekte des Tabakmißbrauchs auf die Konzentrationen von antimikrobiellen Peptiden zu untersuchen, werden die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten gemessen und auf einen Zusammenhang zwischen den Rauchgewohnheiten der Patienten und den Konzentrationen der beiden antimikrobiellen Peptide hin untersucht.

Neben äußeren Einflüssen wie Zigarettenrauch kann sich auch eine allergische Entzündung auf die angeborene Immunität auswirken. Daher wird *in vitro* der Effekt von Th2-Zytokinen auf die angeborene Immunantwort untersucht. Darüber hinaus soll in einem murinen Asthma-Modell gezeigt werden, ob die allergische Entzündung der Lunge einen Einfluß auf die angeborene Immunität und Abwehr bei einer bakteriellen Infektion hat.

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien, Bakterien, Zellkulturmedien und Reagenzien

Das Kulturmedium für die Zelllinie MM-39 bestand aus einer 1 : 1 Mischung von DMEM und HAM F-12 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % BAS (adultes Rinderserum, bovine adult serum, Gibco, Karlsruhe Deutschland) und 2 % Ultrosor G (Biosepra, Fremont, USA). MM-39 ist eine transformierte humane Drüsenzelllinie aus der Trachea mit sekretorischen Eigenschaften [192]. *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm PAO 1) wurden in LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Für die Stimulationsexperimente wurden die Bakterien mit Hitze inaktiviert (15 min, 95°C). Inaktivierte *Legionella pneumophila* Wildtyp Bakterien und eine Flagellin-Mutante wurden von Herrn PD Dr. Alexander Dalpke (Hygiene Zentrum, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. IL-1, IL-4 und IL-13 wurden von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bezogen. Poly (I:C), MALP und Flagellin wurden von InvivoGen (Toulouse, Frankreich) bezogen.

3.2 Primärkulturen von humanen Atemwegsepithelzellen

Zellen für Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel wurden aus der Trachea und den Bronchien von Patientenmaterial gewonnen [193]. Hierfür wurde das Patientenmaterial mit Protease Typ 14 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) enzymatisch verdaut und die Epithelzellen mit einem Skalpell abgeschabt. Nun wurden die Atemwegsepithelzellen in Flüssigkultur mit airway epithelial cell growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert bis sie eine Konfluenz von 70-80 % erreichten. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Uni-Klinik Marburg genehmigt. Die Patienten wurden aufgeklärt und ihre Zustimmung eingeholt.

3.3 *Air liquid interface* Kulturen

Für das Anlegen von *air liquid interface* Kulturen wurden die Epithelzellen mit Trypsin (Gibco, Deutschland) vereinzelt und auf mit Kollagen (Typ 1, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) vorbeschichtete, semipermeable Membranen mit einer Porengröße von

0,4- μm (Millicell-HA; Durchmesser 12 bzw. 30 mm; Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA) ausgebracht. Die Zellzahl wurde so gewählt, daß die *air liquid interface* Kulturen konfluent waren (4×10^4 Zellen / mm^2 Membran). Nachdem die Zellen adherent waren, wurde das Medium von apikaler Seite entfernt. Das basolaterale Kulturmedium wurde nun gewechselt und bestand aus einer 1 : 1 Mischung von DMEM und HAM F-12 mit 2 % Ultrosor G (Biosepra, Fremont, USA), Penicillin G [100 U / ml] und Streptomycin Sulfat [100 U/ml]. Die Ausbildung von *tight junctions* wurde durch Messung des transepithelialen Widerstands (Widerstand $> 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) überprüft. Nach 14 bis 21 Tagen bildeten sich sichtbare Zilien aus (Abb. 4), und die Kulturen wurden für die Experimente verwendet. Neben primären Zellen wurden auch MM-39 Zellen als *air liquid interface* Kulturen gehalten. Hierfür wurden MM-39 Zellen in ausreichender Zahl (4×10^4 Zellen / mm^2 Membran) auf die oben beschriebenen Membranen ausgebracht und das Medium am nächsten Tag apikal entfernt. Die Experimente wurde vier Tage später durchgeführt.

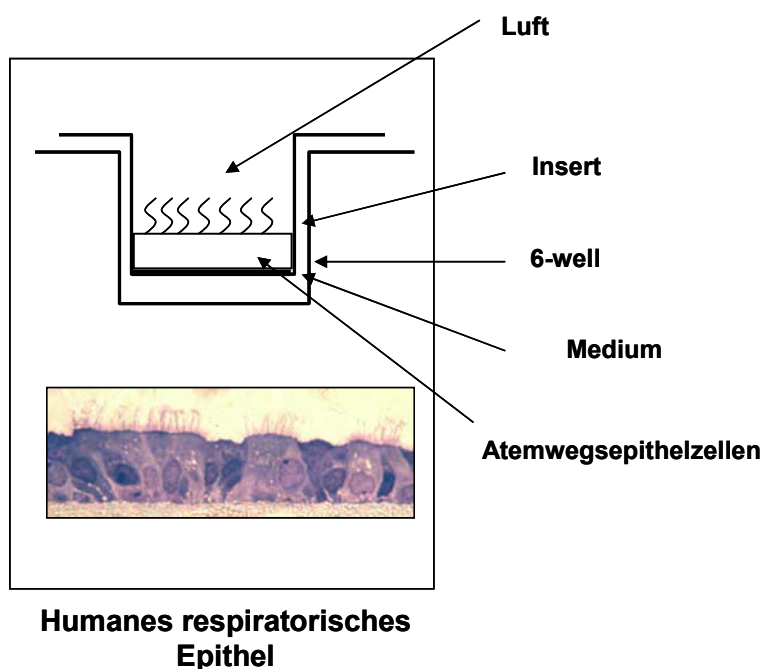


Abb. 4: *Air liquid interface* Kultursystem. Humane primäre Atemwegsepithelzellen differenzieren sich innerhalb von 2-3 Wochen apikal auf einer mit Kollagen beschichteten Membran zu einem Flimmerepithel aus. Die Zellen haben apikal Kontakt zur Luft und werden basolateral mit Medium versorgt.

3.4 Stimulationsexperimente

Für die Induktion von hBD-1, hBD-2, IL-8 und IP-10 wurden primäre Atemwegszellen in Flüssigkultur für 8 Stunden mit den verschiedenen Bakterien und TLR-Liganden stimuliert. Um die Auswirkung von Th2-Zytokinen auf die Expression von β -Defensinen zu untersuchen, wurden die primären Epithelzellen in Flüssigkultur für eine Stunde mit IL-4 [50 ng/ml] oder IL-13 [50 ng/ml] vorinkubiert, das Medium gewechselt und mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* [5×10^7 CFU / ml] oder IL-1 [5 ng/ml] für sechs Stunden inkubiert. Um die Auswirkung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf die hBD-1 und hBD-2 Expression zu untersuchen, wurden primäre Atemwegszellen in Flüssigkultur für eine Stunde mit 1 mM oder 0,5 mM H_2O_2 inkubiert, das Medium gewechselt und für 12 Stunden mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* stimuliert. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium entfernt und mittels ELISA untersucht und die Zellen lysiert und RNA isoliert, um die Expression der betrachteten Proteine zu analysieren.

3.5 Exposition von *air liquid interface* Kulturen mit Zigarettenrauch

Um *air liquid interface* Kulturen direkt mit Zigarettenrauch zu inkubieren wurde eine Expositions-kammer etabliert (Abb. 5). Eine Membranpumpe erzeugte einen Unterdruck in der Expositions-kammer, die ein Volumen von 5,5 Liter hatte, wodurch der Rauch einer Zigarette, die durch einen Schlauch direkt mit der Kammer verbunden war, in die luftdichte Kammer gezogen wurde. Es dauerte fünf Minuten bis ein Zigarette bei konstanter Geschwindigkeit abgebrannt war. Um konstante Bedingungen zu gewährleisten, befand sich die Expositions-kammer in einem Zellkulturinkubator (37°C, 5 % CO_2 , 100 % Luftfeuchtigkeit). Dem Zigarettenrauch wurde warme, feuchte Luft aus dem Inkubator beigemischt. Es wurden kommerziell erhältliche Marlboro 100 Zigaretten (11 mg Teer, 0,9 mg Nikotin) verwendet. Referenzkulturen wurden in der Expositions-kammer mit warmer und feuchter Inkubatorluft inkubiert. MM-39 Zellen wurden fünf Minuten, primäre, vollständig ausdifferenzierte Atemwegszellen 15 Minuten mit Zigarettenrauch inkubiert. Für die Inhibition der p38 MAP Kinase wurden die Primärzellen vor der Zigarettenrauchexposition eine Stunde mit dem Inhibitor SB 203580 (10 μ M; Sigma-Aldrich, Deutschland) inkubiert.

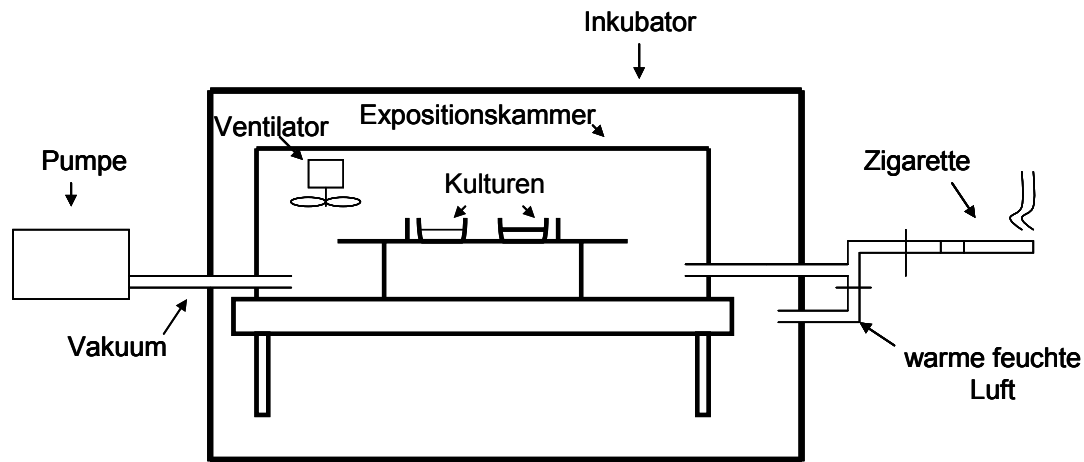


Abb. 5: Schematische Darstellung der Zigarettenrauchexpositionskammer: In der Expositions-kammer wurden Atemwegsepithelzellen, die als *air liquid interface* Kulturen gehalten wurden, mit Zigarettenrauch inkubiert. Eine Pumpe am Auslaß der Expositions-kammer erzeugte einen Unterdruck in der Kammer, der zu einem kontinuierlichen Fluß von Zigarettenrauch in die Kammer führte. Dem Zigarettenrauch wurde 37°C warme und feuchte Luft aus dem Zellkulturinkubator beigemischt. Darüber hinaus befand sich die Expositions-kammer im Zellkulturinkubator.

3.6 Zytokin, LL-37/hCAP-18 und hBD-2 ELISA

Zytokin Konzentrationen in Zellkulturüberständen und in der BAL Flüssigkeit (BALF) von Mäusen wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA Kits für humanes IL-6 und IL-8 bzw. Maus KC, mL-1, mL-4, mL-6 und mL-13 nach Anleitung des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bestimmt.

Für die Messung der hBD-2 Konzentrationen wurde ein hBD-2 ELISA etabliert. Der hBD-2 ELISA wurde analog zum kommerziellen IL-6 ELISA von R&D System durchgeführt. Zum Vorbeschichten wurden 48 µl eines polyklonalen hBD-2 Antikörpers (eigener Antikörper [194]) aus Hase eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde der polyklonale Antikörper aus Ziege AB 9871 (Abcam, Cambridge, UK) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Als dritter Antikörper wurde ein Anti-Ziege Antikörper (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) 1:40000 verdünnt eingesetzt. Die Verdünnungsreihe mit hBD-2 Standard (synthetisches Peptid, bezogen von Prof. Forssmann, IPF-Hannover) hatte folgende Konzentrationen: 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml, 1,5 ng/ml, 0,75 ng/ml, 0,3525 ng/ml und 0,15 ng/ml.

Der LL-37/hCAP-18 ELISA wurde wie folgt abgewandelt: Die Proben wurden direkt aufgetragen und über Nacht bei 37°C angetrocknet. Der ELISA wurde nun geblockt und mit einem monoklonalen Antikörper gegen LL-37/hCAP-18 (8 µg/ml; Clone 1-1c12, Sanbio Deutschland GMBH, Beutelsbach, Deutschland) aus Maus inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Maus Antikörper (Pierce, Bonn, Deutschland) verwendet. Die Verdünnungsreihe aus synthetisiertem LL-37 (bezogen von Dr. Peter Henklein, Charite, Humboldt-Universität, Berlin) hatte folgende Konzentrationen: 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,0625 µg/ml, 0,031 µg/ml und 0,015 µg/ml.

3.7 Ursprung und Analyse der Atemwegssekrete

Die Konzentrationen antimikrobieller Peptide wurden bei einer Reihe von Patientenpopulationen in Atemwegssekreten gemessen. Sputumproben und Rachenspülwasser wurden von Pneumoniepatienten im Rahmen des „Kompetenznetzes Ambulant Erworbene Pneumonie“ (CAPNetz, www.capnetz.de) gesammelt. Hierbei wurden alle Patienten eingeschlossen, die klassische Zeichen einer ambulant erworbenen Pneumonie zeigten. Die Proben wurden unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen gewonnen. Die hBD-2 und LL-37/hCAP-18 Konzentrationen wurden mit Hilfe der unter 3.6 beschriebenen ELISAs gemessen. Hierfür wurden die Proben 10 min mit 13000 g zentrifugiert, der Überstand 1:2 mit PBS verdünnt und 100 µl im ELISA eingesetzt. Weiter wurde Sputum von Patienten mit COPD basierend auf einem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (PiZZ) (COPD definiert als irreversible Atemflußeinschränkung nach *global initiative for chronic obstructive lung disease* (GOLD)) von Prof. Stockley (Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, England) zur Verfügung gestellt. Von den Patienten wurden sowohl während als auch nach dem Abklingen einer Exazerbation (definiert als Verschlechterung der subjektiven Beschwerden, die eine Intensivierung der Therapie erforderten) Proben gewonnen. Die LL-37/hCAP-18 und hBD-2 Konzentrationen wurden wie beschrieben gemessen.

3.8 Western-Blot Analyse

Für die Western-Blot Analyse wurden die als *air liquid interface* Kultur gehaltenen Zellen in 100 µl zweifach Laemmli Probenpuffer (Zusammensetzung: 25 ml 4xTris/HCl, pH 6,8 (0,1 M), 20 ml Glycerol (20 % (w/v)), 4 g SDS (4 % (w/v)), 2 ml β-Mercaptoethanol, 1 mg Bromphenolblau (0.001 % (w/v)) je Insert aufgenommen, 10 Minuten gekocht und kurz abzentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Amidoschwarz-Methode (siehe unten) ermittelt und ein SDS-Gel (10 - 15 % Tris-HCL Polyacrylamid Gel, Biorad, München, Deutschland) mit gleichen Proteinmengen beladen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad, München, Deutschland) geblottet, die Membran wurde mit 10% Milchpulver geblockt und mit einem monoklonalen primären Antikörper gegen die phosphorylierte p38 MAP Kinase (1:50000, Klon P-38-TY, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Die Detektion wurde mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Maus Antikörper (Pierce, Bonn, Deutschland) und mit einem Chemolumineszenz Kit (Pierce, Bonn, Deutschland) durchgeführt. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm (Kodak, Deutschland) aufgelegt und entwickelt (CURIX 60, AGFA, Köln, Deutschland). Danach wurde die Membran gestriipt (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7, 100 mM beta-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 30 Minuten bei 60°C), geblockt und mit einem primären Antikörper gegen die nicht aktive und nicht phosphorylierte Form der p38 MAP Kinase (1:5000, Klon p38-YNP, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) detektiert.

Für die Western-Blot Analysen des Auswurfs von COPD Patienten wurden die Proben 1:2 mit zweifach Laemmli Probenpuffer versetzt und eine Western-Blot Analyse wie beschrieben durchgeführt. Für die Detektion von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 wurden die unter 3.4 beschriebenen primären und sekundären Antikörper verwendet. Die Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Das murine AMP CRAMP wurde in der BAL Flüssigkeit der Mäuse (siehe 3.10) mit Hilfe einer Western-Blot Analyse detektiert. Hierfür wurden 30 µl BAL Flüssigkeit mit vierfach Probenpuffer (BioRad, München, Deutschland) versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen (10 - 20 % Tris-HCL Polyacrylamid Gel, BioRad, München, Deutschland). Der Western-Blot wurde wie beschrieben durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein polyklonales Antiserum aus Hase (1 : 25) verwendet. Für die Gewinnung des polyklonalen Antiserums gegen CRAMP (bezogen von Dr. Henklein, Charite Berlin, Deutschland) wurden Hasen mit synthetischem CRAMP, das kovalent

an Keyhole Limpet Haemocyanine gebunden war, immunisiert (Pineda, Berlin, Deutschland). Die Detektion wurde mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Hase Antikörper (Pierce, Bonn, Deutschland) und mit einem Chemolumineszenz Kit (Pierce, Bonn, Deutschland) wie oben beschrieben durchgeführt.

Proteinkonzentrationen wurden mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. 10 µl Probe wurden mit 190 µl destilliertem Wasser und 800 µl Amidoschwarz-Lösung (90 % Methanol, 10 % Essigsäure, eine Spatelspitze Amidoschwarz) versetzt. Es wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und der Rückstand mit 1 ml Waschlösung (90 % Methanol, 10 % Essigsäure) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Rückstand in 1 ml 0,2 M NaOH gelöst und die Absorption bei 615 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit BSA erstellt wurde, wurden die Konzentrationen ermittelt.

3.9 Isolation von RNA und RT-PCR

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Ein DNase Verdau wurde während der Isolation der RNA auf der Säule mit Hilfe des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Für die cDNA Synthese wurden 1,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA wurde mit einem cDNA Synthese Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mittels oligo(dT)₁₈ Primern synthetisiert. Die cDNA wurde 1 : 5 verdünnt, und es wurden in jeder PCR Reaktion (25 µl Volumen) 5 µl cDNA eingesetzt. Für die real-time PCR wurde ein SYBR Green PCR Mix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Folgendes PCR Protokoll wurde angewendet: 3 Minuten 95°C, 40 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und 45 Sekunden 60°C, eine Minute 95°C, eine Minute 55°C, Schmelzkurve (55°C bis 94°C in 0,5°C Schritten). Die PCR-Reaktionen wurden mit dem ICycler (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. In Tabelle 3 sind die verwendeten Primer (TIB Molbiol; Berlin, Deutschland) aufgelistet. Als Negativkontrollen wurden die –RT-Proben und Wasser mitgeführt. Die relative Expression normalisiert auf GAPDH wurde mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet [195;196]. Die PCR Effizienz war für alle Reaktionen vergleichbar.

mRNA	5'-Primer	3'-Primer
TLR 1	CTGGTATCTCAGGATGGTGTGC	TTGGAGTTCTTCTAAGGGTATGTTCC
TLR 2	GAGAGTGGGAAATATGGACACCTT	GCAGTTCCAAACATTCCACG
TLR 3	CCTGCAGCTGACTAGGAACT	TGCTGCAAATCGAGAATTT
TLR 4	ACCTGGAGTGGGAGGACAGT	AGATAGATGTTGCTTCCTGCCAA
TLR 5	GAAAACCGCATTGCCAATAT	GGCCACCTCAAATACTGCTG
TLR 6	CTATTGTTAAAAGCTTCCATTTTGT	ACCTGAAGCTCAGCGATGTAGTTC
TLR 7	TGCTCTGCTCTCTTCAACCA	GAGTGACATCACAGGGCAGA
TLR 8	TCCTTCAGTCGTCAATGCTG	CGTTTGGGGAACCTTCCTGTA
TLR 9	ACTTCACCTTGGATCTGTCACG	TGACTGCCTGCGAGATGC
TLR 10	GAAAGGTTCCCGCAGACTTG	TGGAGTTGAAAAAGGAGGTTATAG
hBD-1	GCCTCAGGTGGTAACTTTCTCA	GCGTCATTTCTTCTGGTCACT
hBD-2	TCAGCTCCTGGTGAAGCTC	GGGCAAAAGACTGGATGACA
IL-6	CCAGAGCTGTGCAGATGAGTACA	CCTGCAGCTTCGTCAGCA
IL-8	GCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT	AAAACCTTCTCCACAACCCTCTG
IP-10	TGAAATTATTCCTGCAAGCCAA	CAGACATCTCTTCTCACCCTTCTTT
IFN beta	CAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGC	TCATCCTGTCTTGAGGCAGT
GAPDH	GAAGATGGTGATGGGATTTC	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC

Tab. 3: Verwendete Primer

3.10 Behandlung von primären Atemwegszellen mit einzelsträngigen Oligodeoxynukleotiden

Die *air liquid interface* Kulturen wurden mit NF- κ B p65 antisense und sense Oligonukleotiden (5 μ M Endkonzentration) vor der Zigarettenrauchexposition für 12 Stunden vorbehandelt. Die sense bzw. antisense Oligodeoxynukleotide wurden in das basolaterale Kompartiment gegeben. Die Nukleotidsequenz des NF- κ B p65 antisense phosphorothiat modifizierten Oligodeoxynukleotides (MWG, München, Deutschland) war 5'- GCA TGG ACG AAC TGT TCC CC-3'. Die Nukleotidsequenz des NF- κ B p65 sense phosphorothiat modifizierten Oligodeoxynucleotides war 5'- GGG AAC AGT TCG TCC ATG GC-3'.

3.11 Sensibilisierung, Allergen-Herausforderung und Infektion von BALB/c Mäusen

Sechs bis acht Wochen alte BALB/c Mäuse (Charles River, Berlin, Deutschland) wurden mit 10 μ g Ovalbumin (OVA) (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) adsorbiert in 1,5 mg Al(OH)₃ (Pierce, Rockford, USA) und in 200 μ l PBS-Puffer

sensibilisiert. Das Allergen wurde den Mäusen am ersten, siebten und 14 Tag intraperitoneal gespritzt. Auf die Sensibilisierung folgte an den Tagen 21, 22 und 23 jeweils eine Herausforderung mit dem Allergen. Hierfür wurde das Ovalbumin (1 %, wt/vol in PBS, 5ml) als Aerosol 20 Minuten lang verabreicht.

Die Infektion mit *P. aeruginosa* Bakterien folgte an Tag 24. Die Tiere wurden mit 2,5 mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis, Berlin, Deutschland) und 0,18 mg Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) betäubt. Die Bakterien (300000 *P. aeruginosa* in 50 µl PBS) wurden intranasal verabreicht. Nach sechs bzw. nach 24 Stunden wurden die Tiere betäubt und mit Genickbruch getötet. Die Luftröhre wurde punktiert und eine bronchoalveolare Spülung der Lunge mit 5 x 1 ml PBS durchgeführt. Die Spülflüssigkeit wurde aufgefangen und sofort für die Bestimmung der Zellzahl und der Zelltypen (siehe 3.9) verwendet. Die rechte Lunge wurde in 1 ml PBS homogenisiert, und die Bakterienzahl durch Ausstrich geeigneter Verdünnungen auf LB-Agarplatten ermittelt.

3.12 Aufbereitung der Bronchio-Alveolären-Lavage (BAL) von Mäusen

Die BAL der Mäuse wurde auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Zellzahl und die Herstellung der Zytospins für die Differentialzellzählung erfolgten kurz nach Durchführung der Lavage. Die Zellen der BAL wurden herunter zentrifugiert (4°C, 10 min, 900 upm) und die Überstände für weitere Analysen (ELISA) bei -70°C eingefroren. Die Zellpellets wurden in PBS (1 ml, 4°C) aufgenommen. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 10 µl BAL mit Kristallviolettlösung (50 mg Kristallviolett, 0,5 ml Eisessig in 10 ml H₂O) 1:5 oder 1:10 verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für Cytopräparate wurden ca. 150000 - 200000 Zellen in den Trichter einer Cytozentrifuge einpipettiert und 10 Minuten bei 500 upm zentrifugiert. Die Präparate wurden über Nacht an der Luft getrocknet und dann für die Differentialzellzählung weiterverarbeitet. Für die Differentialzellzählung wurde eine panoptische Zellfärbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung) durchgeführt. Die Präparate wurden fünf Minuten in der May-Grünwald-Färbelösung (unverdünnt, Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert, zweimal mit Leitungswasser gespült, 20 Minuten in Giemsa-Gebrauchslösung (8 ml Giemsa-Lösung auf 200 ml H₂O, Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert und

zweimal in Leitungswasser gewaschen. Die Präparate wurden nun an der Luft getrocknet und mit Corbit eingedeckelt.

Von jedem Präparat wurden 150-250 Zellen ausgezählt wobei die Anzahl der verschiedenen Zelltypen bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt wurde. Der prozentuale Anteil jedes Zelltyps wurde mit der jeweiligen Gesamtzellzahl multipliziert und so die Anzahl der verschiedenen Zelltypen in den BAL erhalten.

3.13 Statistische Analyse

Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels T Tests (zweiseitig) oder mittels ANOVA bei Experimenten mit mehr als zwei Untergruppen analysiert. Post hoc Tests wurden mittels T Test (zweiseitig) mit Bon-ferroni Anpassung durchgeführt. Ergebnisse für $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Faktoren der angeborenen Immunität im Respirationstrakt

4.1.1 Antimikrobielle Peptide werden in Atemwegssekrete abgegeben

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Effektormoleküle der angeborenen Immunantwort. Sie können einerseits mit ihrer antimikrobiellen Aktivität zur Klärung von Infektionen beitragen, andererseits aber auch die Immunantwort modulieren. Es wurde daher untersucht, ob AMP bei verschiedenen Krankheiten des Respirationstrakts in die Atemwegssekrete abgegeben werden.

Zuerst wurden die beiden AMP hBD-2 und LL-37 im Sputum von COPD Patienten in einer Western-Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 6).

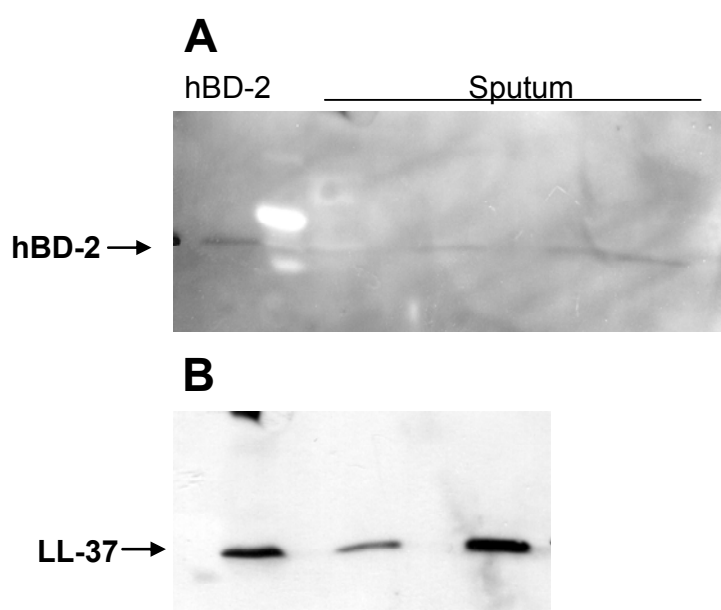


Abb. 6 hBD-2 und LL-37 im Sputum von COPD Patienten. (A) hBD-2 (5 kDa) und (B) LL-37 (4 kDa) konnte im Sputum von COPD Patienten mittels einer Western-Blot Analyse nachgewiesen werden.

Als nächstes wurden die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten und Patienten mit COPD basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel mittels ELISA gemessen. Beide Proteine konnten in Sputum und Rachenspülwasser von Pneumoniepatienten und in Sputum von COPD Patienten nachgewiesen werden (Tab. 4). Die Konzentrationen von hBD-2 lagen zwischen 0,5 ng/ml und 10 ng/ml, die von LL-37/hCAP-18 zwischen 100 ng/ml und 1000 ng/ml.

A

	MW [ng/ml]	Standard- abweichung
hBD-2 in Sputum von Pneumoniepatienten (n=12)	0,5	0,96
hBD-2 in Rachenspülung von Pneumoniepatienten (n=12)	3,4	2,4
hBD-2 in Sputum von COPD Patienten (n=24)	15,6	23,4

B

	MW [ng/ml]	Standard- abweichung
LL-37/hCAP-18 in Sputum von Pneumoniepatienten (n=12)	187	241
LL-37/hCAP-18 in Rachenspülung von Pneumoniepatienten (n=12)	723	968
LL-37/hCAP-18 in Sputum von COPD Patienten (n=23)	167	238

Tab. 4: hBD-2 und LL-37/hCAP-18 Konzentrationen in Atemwegssekreten. hBD-2 (A) und LL-37/hCAP-18 (B) Konzentrationen wurden in Sputum und Rachenspülwasser von Pneumoniepatienten und im Sputum von Patienten mit COPD basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel mittels ELISA gemessen (MW = Mittelwert).

4.1.1.1 Konzentrationen von antimikrobiellen Peptiden im Sputum sind während einer Exazerbation bei COPD Patienten erhöht

Es stellte sich nun die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen den AMP Konzentrationen in den Atemwegssekreten und der Entzündung des Respirationstrakts bei Patienten mit COPD basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel gibt. Hierfür wurden COPD Patienten während und nach einer Exazerbation Sputum abgenommen und die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 mittels ELISA gemessen (Tab. 5). Es zeigte sich, daß das Sputum der Patienten während einer Exazerbation höhere Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 enthielt als nach einer Exazerbation (Tab. 5). So hatten im Fall von LL-37/hCAP-18 sieben von acht Patienten, im Fall von hBD-2 acht von neun Patienten während einer Exazerbation höhere Konzentrationen der Peptide im Sputum. Das Abklingen der Exazerbation bei den COPD Patienten war mit einer signifikanten Abnahme der Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 (Paired t-test $p=0,023$) und hBD-2 im Sputum verbunden (Signed Rank Test $p=0,039$).

A			B		
Patient	LL-37/hCAP-18 während einer Exazerbation, [ng/ml]	LL-37/hCAP-18 nach einer Exazerbation, [ng/ml]	Patient	hBD2 während einer Exazerbation, [ng/ml]	hBD2 nach einer Exazerbation, [ng/ml]
1	266	240	1	33	26
2	358	0	2	10	1
3	209	170	3	16	2
4	1647	1172	4	14	9
5	88	118	5	48	39
6	297	105	6	5	0,35
7	638	0	7	0	7
8	293	140	8	7	0
			9	81	3

Tab. 5: Während der Exazerbation sind die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 (A) und hBD-2 (B) im Sputum von Patienten mit COPD basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel erhöht. LL-37/hCAP-18 und hBD-2 Konzentrationen wurden mittels ELISA gemessen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Effektormoleküle der angeborenen Immunantwort wie hBD-2 und LL-37/hCAP-18 in den Atemwegen gebildet und in die Atemwegssekrete abgegeben werden. Als nächstes stellte sich die Frage, welchen Beitrag Atemwegsepithelzellen im Rahmen der angeborenen Immunantwort des Respirationstrakts leisten. Hierfür wurde als erstes die Expression von TLR in Atemwegsepithelzellen untersucht.

4.1.2 Expression von TLR in Atemwegsepithelzellen

TLR ermöglichen es nicht nur den Zellen des Immunsystems sondern auch Epithelzellen Bakterien bzw. bakterielle Bestandteile, Pilze und Viren zu erkennen und eine Immunantwort einzuleiten. Es wurde daher die Expression von TLR in primären Atemwegsepithelzellen, die in Flüssigkultur und als *air liquid interface* Kultur gehalten wurden, und in der Zelllinie MM-39 untersucht (Abb. 7). Bei primären Atemwegszellen konnten die TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 mittels real-time RT-PCR nachgewiesen werden, wobei die TLR 6, 9 und 10 nur schwach exprimiert waren. Eine Expression von TLR7 und TLR8 konnte nicht gezeigt werden. Die Zelllinie MM-39 exprimiert hingegen nur die TLR 1-6.

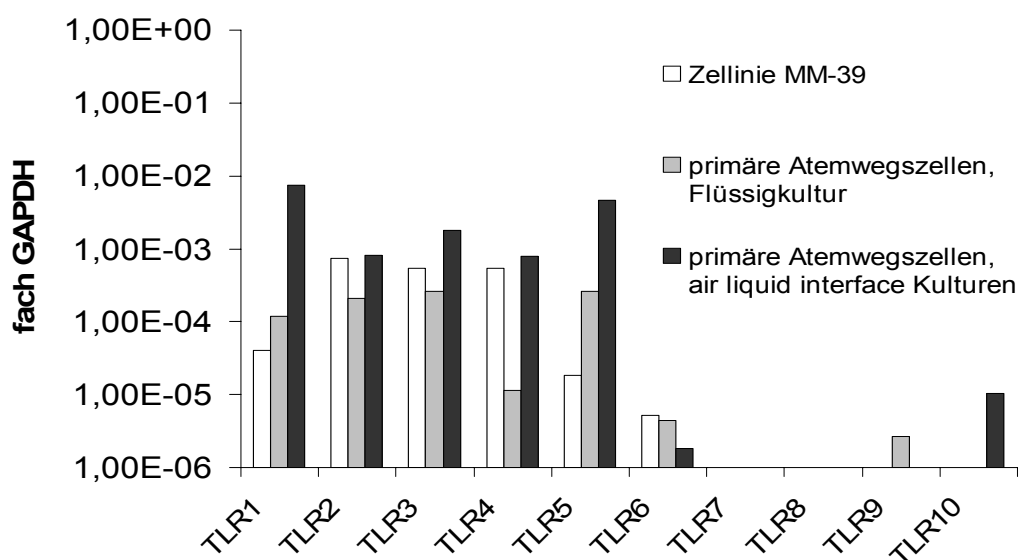


Abb. 7: Expression von TLR in Atemwegsepithelzellen. TLR 1-6, 9 und 10 wurden von humanen Primärzellen exprimiert. Die Zelllinie MM-39 exprimiert TLR 1-6. Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen von TLR zu GAPDH wurde mittels der $\Delta\Delta C_t$ Werte unter Verwendung der Formel $2^{-(1) \cdot \Delta C_t}$ errechnet.

Die Expression von TLR in Atemwegsepithelzellen ist eine Voraussetzung dafür, daß das Atemwegsepithel nicht nur eine physikalische Barriere darstellt, sondern auch aktiv an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist, indem es mikrobielle Bestandteile spezifisch erkennt und durch die Expression verschiedener Proteine eine Immunantwort einleiten bzw. modulieren kann.

4.1.3 Stimulation von humanen Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und TLR Liganden

Es ist bekannt, daß die Stimulation von TLR bei Immunzellen und Epithelzellen die Expression und Abgabe von AMP und verschiedenen Zytokinen bzw. Chemokinen induzieren kann. Es wurde daher untersucht, wie sich die Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen *in vitro* mit verschiedenen Bakterien sowie mit bakteriellen und viralen Bestandteilen, die als spezifische Liganden von TLR bekannt sind, auf die hBD-1, hBD-2 und IP-10 Expression sowie auf die Abgabe von IL-8 auswirkt. IP-10 wurde als Parameter gewählt, da es sich um ein IFN- β induzierbares Gen handelt und somit der MyD88 unabhängige Signalweg an der Induktion beteiligt ist. Die Induktion von hBD-2 und die Abgabe von IL-8 wird hingegen über den MyD88 abhängigen Weg und NF- κ B vermittelt.

Die Bakterien *E. coli*, *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* führten zu einer starken Induktion (320 - 560 fach) von hBD-2, während eine Flagellin Mutante von *L. pneumophila* (*L. pneumophila* A), die kein Flagellin besitzt, die hBD-2 Expression nicht induzierte. Der aufgereinigte TLR5 Ligand Flagellin alleine konnte die hBD-2 Expression induzieren, wie auch der TLR2 Ligand MALP und der TLR3 Ligand Poly (I:C), letztere jedoch deutlich schwächer. Darüber hinaus ließ sich die hBD-2 Expression durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 steigern (Tab. 6). Das antimikrobielle Peptid hBD-1 wurde hingegen von den Atemwegsepithelzellen konstitutiv exprimiert und blieb von den verschiedenen Stimulationsbedingungen weitgehend unbeeinflusst.

Die Abgabe von IL-8 war unter allen Stimulationsbedingungen gesteigert, allerdings führte die Stimulation mit der Flagellin Mutante von *L. pneumophila* im Vergleich zum Wildtyp zu einer verminderten Abgabe von IL-8.

Während der Konzentrationsanstieg von IL-8 unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen weitgehend gleich stark ausfiel, wurde IP-10 nur von Poly (I:C) äußerst stark induziert (3104,8 fach). Stimulation mit Bakterien führte zu einer deutlich schwächeren Expression von IP-10 (29 – 60 fach).

	hBD-2 Induktion	hBD-1 Induktion	IP-10 Induktion	IL-8 Abgabe [pg/ml]
Unstimuliert	1	1	1	3676
<i>E. coli</i>	327,4	0,6	59,9	13829
<i>P. aeruginosa</i>	467,8	1,9	34,2	12304
<i>L. pneumophila wt</i>	558,3	2,0	29,2	11669
<i>L. pneumophila A</i>	2,1	1,2	0,3	6889
Flagellin (TLR5 Ligand)	51,9	0,6	3,03	-
Poly(I:C) (TLR3 Ligand)	16	0,9	3104,8	13122
Malp (TLR2/6 Ligand)	8,5	1,3	12,9	6048
IL-1	53,7	1,3	-	8946

Tab. 6: Auswirkung von verschiedenen Bakterien, bakteriellen und viralen Bestandteilen und von IL-1 auf die Expression von hBD-1, hBD-2 und IP-10 sowie auf die Abgabe von IL-8. Primäre Atemwegsepithelzellen in Flüssigkultur wurden mit Hitze inaktivierten Bakterien [10^7 CFU/ml], IL-1 beta [5 ng/ml], Poly(I:C) [20µg/ml], Malp [1µg/ml] oder Flagellin [100 µg/ml] für sechs Stunden stimuliert. Die Expression von hBD-1, hBD-2 und IP-10 wurde mit semi-quantitativer RT-PCR gemessen. Die Konzentrationen von IL-8 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA gemessen.

Die durch Bakterien und bakterielle bzw. virale Bestandteile induzierte Abgabe von Zytokinen, Chemokinen und Defensinen zeigt, daß Atemwegsepithel in der Lage ist, TLR vermittelt und spezifisch verschiedene bakterielle und virale Bestandteile zu erkennen und sowohl den MyD88 abhängigen als auch den MyD88 unabhängigen Signalweg zu aktivieren. Nachfolgend wurde untersucht, wie sich Einflüsse wie Zigarettenrauch oder allergische Entzündung auf die angeborene Immunität des Atemwegsepithels bzw. des Respirationstrakts auswirken.

4.2 Exposition von humanen Atemwegsepithelzellen mit Zigarettenrauch *in vitro*

4.2.1 Zigarettenrauchexposition führt zu einer gesteigerten Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen

Um die Auswirkung von Zigarettenrauch auf die angeborene Immunität von Atemwegsepithelzellen zu charakterisieren, wurde eine Expositions-kammer zur Inkubation von ausdifferenzierten Atemwegsepithelzellen mit Zigarettenrauch *in vitro* aufgebaut und etabliert (Abb. 5, Kapitel 3.4). Zunächst wurde untersucht, ob Zigarettenrauchexposition von Epithelzellen in dieser Expositions-kammer zu einer Entzündungsreaktion führt. Es zeigte sich, daß akute Zigarettenrauchexposition zur Induktion und Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen führte.

Die Inkubation der Zelllinie MM-39 mit Rauch hatte eine gesteigerte Abgabe von IL-6 und IL-8 zur Folge (Abb. 8 A). Untersuchung des Zeitverlaufs der IL-6 mRNA Expression zeigte, daß die Expression eine Stunde nach der Zigarettenrauchexposition am stärksten war, dann abfiel und nach acht Stunden wieder das Niveau der nicht gerauchten Referenz erreicht hatte (Abb. 8 B). Auch primäre vollständig ausdifferenzierte Atemwegszellen zeigten nach Zigarettenrauchexposition eine verstärkte Expression und Abgabe von IL-6 und IL-8 (Abb. 9).

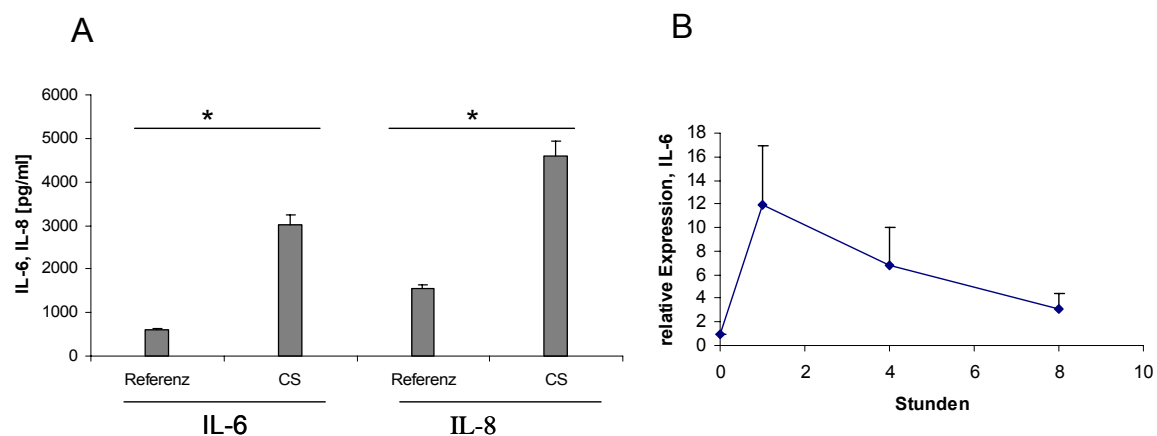


Abb. 8: Zigarettenrauchexposition führt zur Expression und Abgabe von IL-6 und IL-8. MM-39 Zellen wurden für 5 Minuten Zigarettenrauch exponiert. A) IL-6 und IL-8 wurden acht Stunden nach der Zigarettenrauchexposition in den Überständen mittels ELISA gemessen. B) Induktion der IL-6 mRNA Expression wurde 0, 1, 4 und 8 Stunden nach Zigarettenrauchexposition mittels semiquantitativer RT-PCR gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 4$).

4.2.2 Auswirkung von Zigarettenrauch in Kombination mit Bakterien

Als nächstes wurde untersucht, ob Zigarettenrauch einen Einfluß auf die durch Bakterien oder IL-1 induzierte Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine von Atemwegsepithel *in vitro* hat. Neben *P. aeruginosa* wurde IL-1 als Stimulus gewählt, da IL-1 bei einer Infektion von Makrophagen gebildet und ausgeschüttet wird und dann Atemwegszellen aktiviert. Hierzu wurden vollständig ausdifferenzierte primäre Atemwegsepithelzellen zuerst für 15 Minuten mit Zigarettenrauch exponiert und dann für acht Stunden mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* Bakterien oder IL-1 inkubiert. Sowohl Zigarettenrauchexposition als auch Stimulation mit Bakterien oder IL-1 alleine führte zu einer gesteigerten Abgabe von IL-6 und IL-8. Durch Kombination von *P. aeruginosa* oder IL-1 mit Zigarettenrauch wurde die Abgabe von IL-6 und IL-8 noch weiter verstärkt (Abb. 9).

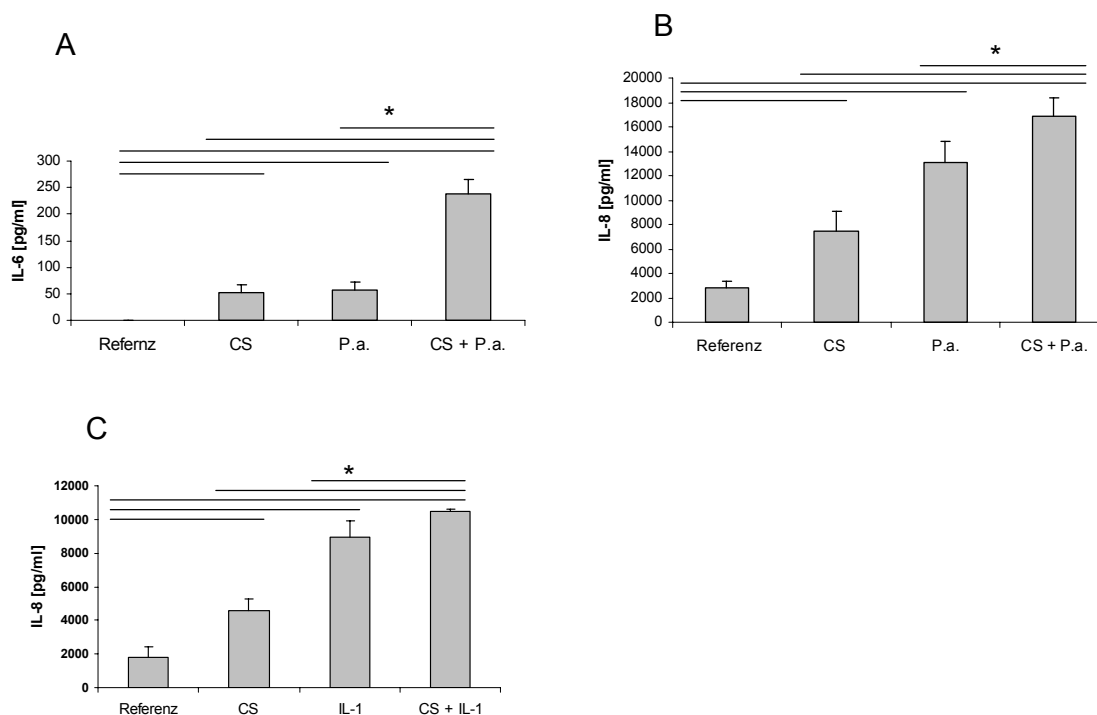


Abb. 9: Zigarettenrauchexposition verstärkt die Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Bakterien oder IL-1. Vollständig ausdifferenzierte primäre Epithelzellen wurden 15 Minuten mit Zigarettenrauch (CS) inkubiert und direkt folgend (A und B) mit Hitze inaktivierten *P. aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (4×10^7 CFU) oder (C) mit IL-1 [10 ng/ml] apikal stimuliert. Zigarettenrauch, Bakterien und IL-1 führten zu einer verstärkten Abgabe von IL-6 (A) und IL-8 (B und C). Zigarettenrauch in Kombination mit Bakterien oder IL-1 wirkte synergistisch auf die Abgabe von IL-6 und IL-8 (A,B,C). Die Konzentrationen der Zytokine in den Überständen wurden nach acht Stunden mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 4$).

4.2.3 Die MAP Kinase p38 und NF- κ B sind an der durch Zigarettenrauch induzierten Entzündung beteiligt

Mit Hilfe der Expositionskammer wurde im Folgenden untersucht, welche Signalwege an der durch Zigarettenrauch hervorgerufenen Entzündungsreaktion beteiligt sind. Da bekannt ist, daß an der Regulation von IL-6 und IL-8 der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt ist und NF- κ B von MAP Kinasen aktiviert werden kann, wurde die Rolle von NF- κ B und der MAP Kinase p38, die bei Zellstress aktiviert wird, bei der Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 durch Zigarettenrauch näher betrachtet.

4.2.3.1 Die durch Zigarettenrauch induzierte Abgabe von IL-6 wird durch antisense Oligonukleotide gegen die NF- κ B Untereinheit p65 gemindert

Als erstes wurde untersucht, ob sich die Abgabe von IL-6 durch antisense Oligonukleotide, die sich gegen die NF- κ B p65 Untereinheit richten, mindern läßt. Vollständig ausdifferenzierte und mit antisense p65 bzw. sense p65 Oligonukleotiden vorbehandelte primäre Atemwegsepithelzellen wurden mit Zigarettenrauch inkubiert und die Abgabe von IL-6 gemessen (Abb. 10). Die durch Zigarettenrauch hervorgerufene Abgabe von IL-6 ließ sich durch antisense p65 Oligonukleotide fast auf das Niveau der nicht gerauchten Referenz mindern. Mit antisense Oligonukleotiden vorbehandelte Kulturen gaben nach Zigarettenrauchexposition signifikant weniger IL-6 ab als Kontrollkulturen, die mit sense Oligonukleotiden vorbehandelt worden waren.

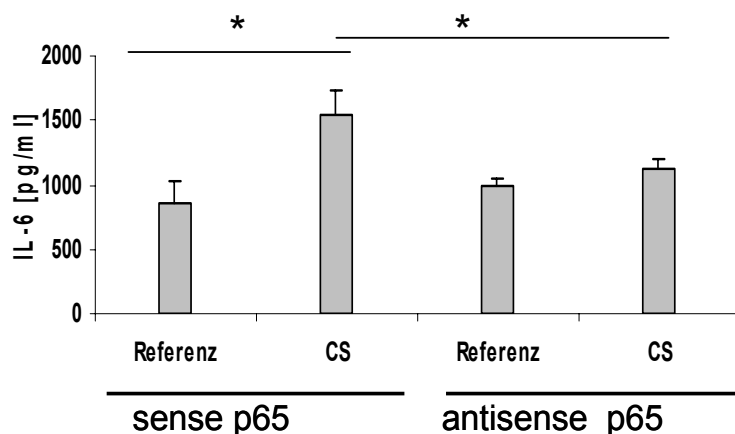


Abb. 10: Die durch Zigarettenrauch induzierte Abgabe von IL-6 wird durch antisense Oligonukleotide gegen die NF- κ B Untereinheit p65 gemindert. Vollständig ausdifferenzierte primäre Atemwegszellen wurden mit sense und antisense Oligonukleotiden vorbehandelt [5 μ M] und für 15 Minuten Zigarettenrauch (CS) exponiert. Nach acht Stunden wurde IL-6 mittels ELISA in den Überständen gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert (n =4).

4.2.3.2 Die MAP Kinase p38 wird durch Zigarettenrauch aktiviert

Die MAP Kinase p38 kann bei der Aktivierung von NF- κ B beteiligt sein. Es wurde daher untersucht, ob Zigarettenrauchexposition von ausdifferenzierten

Atemwegsepithelzellen zu einer Aktivierung der MAP Kinase p38 führt. Hierfür wurden ausdifferenzierte Atemwegszellen mit Zigarettenrauch, mit *P. aeruginosa* und mit Zigarettenrauch in Kombination mit *P. aeruginosa* inkubiert. Nach 15, 30 und 60 Minuten wurden die Zellen lysiert und die aktivierte und phosphorylierte bzw. die nicht aktivierte und nicht phosphorylierte Form von p38 in einer Western-Blot Analyse detektiert (Abb. 11). *P. aeruginosa* führte zu einer Aktivierung von p38 nach 15 Minuten, die sich nach 30 Minuten abschwächte. Nach 60 Minuten war die phosphorylierte p38 nicht mehr detektierbar. Auch Zigarettenrauchexposition führte zu einer Aktivierung von p38 nach 15 Minuten, die jedoch schwächer war als die durch *P. aeruginosa* ausgelöste. Schon nach 30 Minuten war die aktive Form von p38 nicht mehr detektierbar. Die Kombination von Bakterien und Zigarettenrauch hatte die stärkste Phosphorylierung von p38 zur Folge, die sich über die Zeit langsamer abschwächte und auch nach 60 Minuten noch sichtbar war.

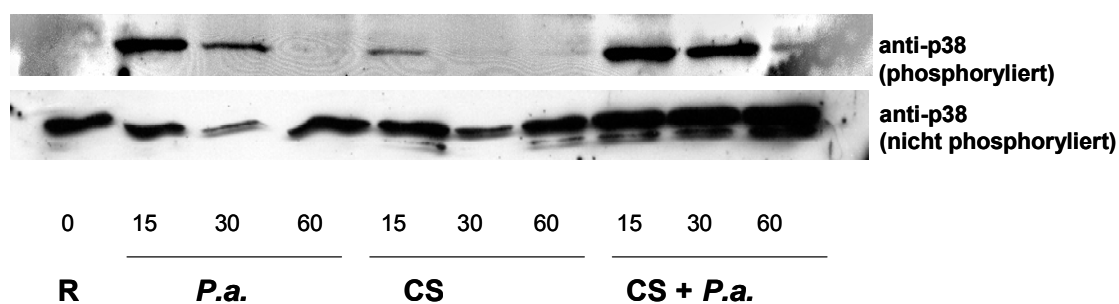


Abb. 11: Die MAP Kinase p38 wird durch Zigarettenrauch und *P. aeruginosa* aktiviert. Vollständig ausdifferenzierte primäre Epithelzellen wurden 15 Minuten mit Zigarettenrauch (CS) inkubiert und direkt folgend mit Hitze inaktivierten *P.aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (4×10^7 CFU) apikal stimuliert. Zellen wurden nach 15, 30 und 60 Minuten in Lämmli-Puffer lysiert und die phosphorylierte Form der p38 MAP Kinase in einer Western-Blot Analyse detektiert. Anschließend wurde der Blot gestrippt und die nicht aktivierte Form von p38 detektiert.

Um einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der p38 MAP Kinase und der Abgabe von IL-6 aufzuzeigen, wurden ausdifferenzierte Atemwegsepithelzellen mit einem Inhibitor (SB 203580) der p38 MAP Kinase vorbehandelt und mit Zigarettenrauch inkubiert. Die Abgabe von IL-6 nach Zigarettenrauchexposition konnte durch den Inhibitor stark gemindert werden (Abb. 12).

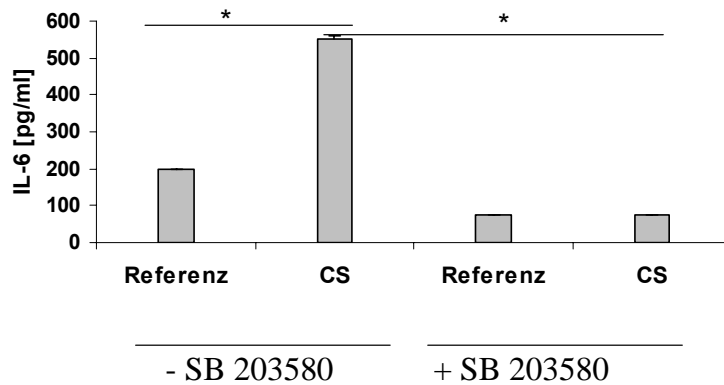


Abb.12: Inhibition der MAP Kinase p38 vermindert die Abgabe von IL-6 nach Zigarettenrauchexposition. Vollständig ausdifferenzierte primäre Atemwegszellen wurden mit dem p38 Inhibitor SB 203580 eine Stunde inkubiert [10 μ M] und anschließend für 15 Minuten Zigarettenrauch (CS) exponiert. Nach acht Stunden wurde IL-6 mittels ELISA in den Überständen gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert (n = 4).

Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß an der durch Zigarettenrauch hervorgerufenen akuten Entzündung und der damit verbundenen Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die MAP Kinase p38 beteiligt sind.

4.2.4 Auswirkung von Zigarettenrauch auf die β -Defensin Expression

Die Zigarettenrauchexpositions-kammer wurde nun genutzt, um die Auswirkung von Zigarettenrauch auf die β -Defensin Expression zu untersuchen. Voll ausdifferenzierte, Zilien tragende und als *air liquid interface* Kulturen (Abb. 4) gehaltene primäre Atemwegsepithelzellen und die ebenfalls als *air liquid interface* Kulturen gehaltene Zelllinie MM-39 wurden in der Zigarettenrauchexpositions-kammer mit Zigarettenrauch inkubiert. Im Gegensatz zu der in Kapitel 4.2.1 beobachteten Induktion der IL-6 und IL-8 Expression durch Zigarettenrauchexposition, konnte kein Einfluß des Zigarettenrauchs auf die hBD-2 mRNA Expression festgestellt werden (Abb. 13). Nun wurden die Kulturen direkt nach der Rauchexposition mit inaktivierten *P. aeruginosa* Bakterien oder IL-1 stimuliert. Sowohl die Zelllinie MM-39 als auch vollständig ausdifferenzierte Atemwegsepithelzellen zeigten nach Zigarettenrauchexposition eine weit geringere durch *P. aeruginosa* bzw. IL-1

induzierte hBD-2 Expression als Referenzkulturen, die vor der Stimulation mit *P. aeruginosa* oder IL-1 nur mit Inkubatorluft inkubiert worden waren (Abb. 13). Die hBD-1 Expression blieb von den verschiedenen Stimulationsbedingungen unbeeinflusst.

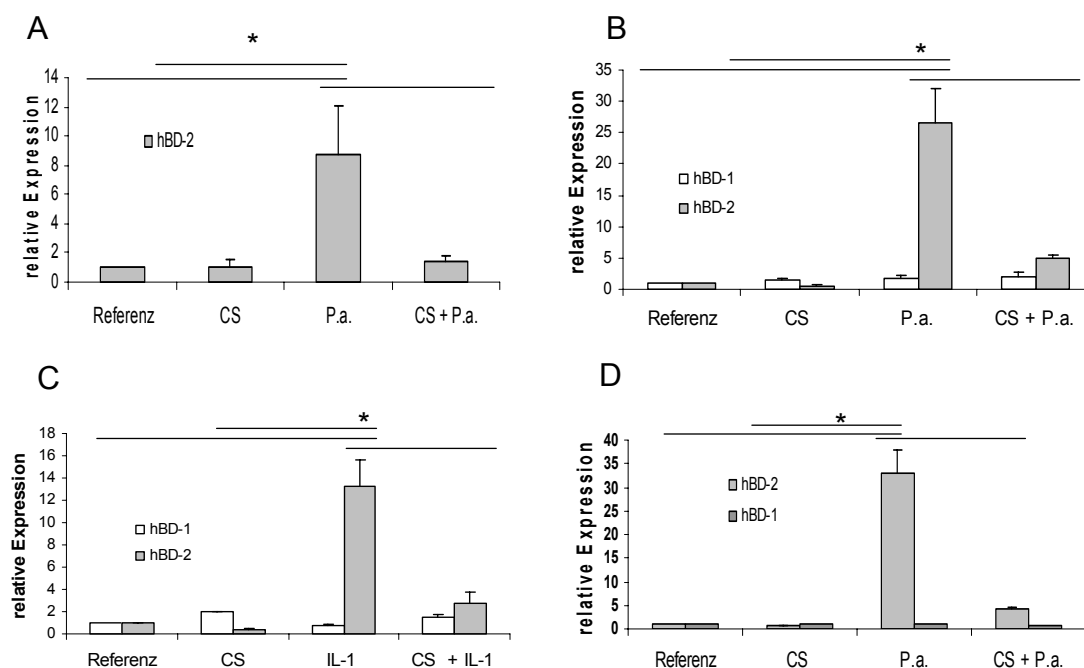


Abb. 13: Zigarettenrauch inhibiert die durch *P. aeruginosa* und IL-1 induzierte hBD-2 Expression. Vollständig ausdifferenzierte primäre Epithelzellen wurden 15 Minuten mit Zigarettenrauch (CS) inkubiert (A, B, C) und direkt folgend mit Hitze inaktivierten *P. aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (4×10^7 CFU; A und B) oder IL-1 [5 ng/ml] (C) für 2 (A) oder 8 Stunden (B, C) apikal stimuliert. Die Zelllinie MM-39 (D) wurde 5 Minuten mit Zigarettenrauch inkubiert und direkt folgend mit *P. aeruginosa* (3×10^8 CFU) apikal 8 Stunden stimuliert. hBD-2 mRNA Expression wurde mit real-time RT-PCR gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 4$).

Des weiteren wurde die apikale Abgabe von hBD-2 gemessen. Hierfür wurden die *air liquid interface* Kulturen nach acht Stunden Stimulation mit IL-1 apikal mit PBS gespült und mittels ELISA die hBD-2 Konzentration in dieser Spülflüssigkeit gemessen. Auch hierbei zeigte sich, daß die durch IL-1 hervorgerufene Steigerung der hBD-2 Abgabe durch vorangegangene Zigarettenrauchexposition gehemmt wurde (Abb. 14).

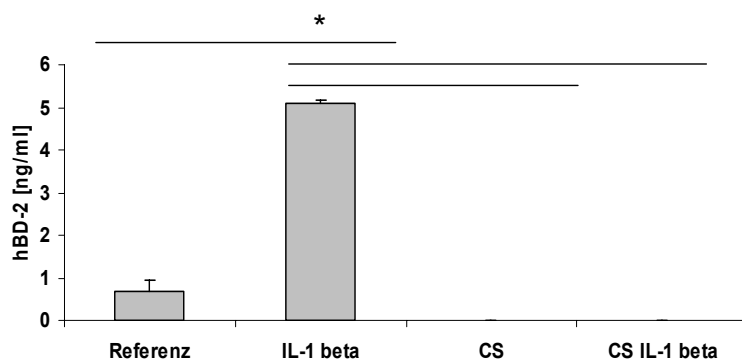


Abb. 14: Zigarettenrauch inhibiert die Abgabe von hBD-2. Vollständig ausdifferenzierte primäre Atemwegsepithelzellen wurden 15 Minuten mit Zigarettenrauch (CS) inkubiert und direkt folgend mit IL-1 stimuliert [5 ng/ml]. Nach 8 Stunden wurden die Kulturen apikal mit PBS gewaschen und die hBD-2 Konzentration in der Spülflüssigkeit mittels ELISA bestimmt. Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert (n = 4).

4.2.5 Auswirkung von reaktivem Sauerstoff auf die β -Defensin Expression

Die Zusammensetzung von Zigarettenrauch ist komplex. Zigarettenrauch enthält verschiedenste Substanzen, die für die Zelle toxisch sind. Als besonders schädlich gelten reaktive Sauerstoffspezies. Es wurde deshalb die Auswirkung von reaktivem Sauerstoff auf die hBD-1 und hBD-2 Expression in humanen Atemwegsepithelzellen untersucht. Primäre Atemwegszellen in Flüssigkultur wurden eine Stunde mit H_2O_2 [1 mM und 0,5 mM] vorbehandelt und anschließend für 12 Stunden mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* inkubiert. Die durch *P. aeruginosa* induzierte hBD-2 Expression wurde durch H_2O_2 dosisabhängig signifikant vermindert (Abb. 15). Die Expression von hBD-1 wurde von den verschiedenen Stimulationsbedingungen nicht beeinflusst.

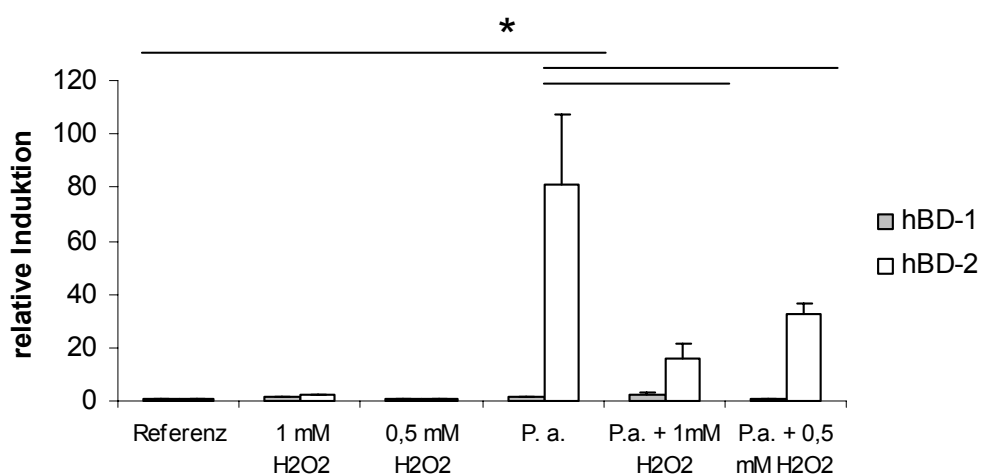


Abb. 15: Inhibitorischer Effekt von H₂O₂ auf die hBD-2 Expression. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden eine Stunde mit H₂O₂ inkubiert [1 mM und 0,5 mM] und anschließend mit und ohne hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (*P.a.*) für 12 Stunden inkubiert. Relative hBD-2 und hBD-1 mRNA Expression wurden mittels real time RT-PCR gemessen. Unterschiede von P < 0,05 sind mit * markiert (n = 4).

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß die Inkubation von Atemwegsepithelzellen mit Zigarettenrauch zu einer durch die Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen gekennzeichneten Entzündungsreaktion führt. Bei kombinierter Inkubation von Atemwegsepithelzellen mit Bakterien und Zigarettenrauch wird die durch Bakterien alleine ausgelöste Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine durch den Zigarettenrauch verstärkt. Bakterien und Rauch wirken in diesem Fall synergistisch. Andererseits verhindert Rauch aber weitgehend die Expression und Abgabe des antimikrobiellen Peptids hBD-2, das durch Bakterien und IL-1 stark induziert wird. Zigarettenrauch enthält zahlreiche reaktive Sauerstoffspezies. Die verminderte Expression von hBD-2 durch Bakterien nach H₂O₂ Inkubation ist ein Hinweis darauf, daß reaktiver Sauerstoff bei dem durch die Rauchexposition beobachteten Effekt eine Rolle spielt.

4.3 Effekt von Tabakmißbrauch auf die Konzentrationen von antimikrobiellen Peptiden bei Patienten mit Pneumonie

Es stellte sich nun die Frage, ob die *in vitro* festgestellte Suppression von hBD-2 durch Zigarettenrauch auch bei Patienten mit Pneumonie beobachtet werden kann. Hierfür wurden Rachenspülwasser und Sputum von Patienten, die an einer Pneumonie erkrankt waren, untersucht. Die hBD-2 und LL-37/hCAP-18 Konzentrationen wurden in den Rachenspülungen und im Sputum mittels ELISA gemessen. Die hBD-2 und LL-37/hCAP-18 Konzentrationen im Sputum waren zu gering, um statistisch auswertbare Resultate zu erlangen. Im Rachenspülwasser waren die beiden AMP jedoch in ausreichenden Konzentrationen vorhanden, um ihre Konzentration zwischen verschiedenen Patientengruppen zu vergleichen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in den hBD-2 Konzentrationen zwischen Pneumoniepatienten, die zum Zeitpunkt der Erkrankung rauchten, und Pneumoniepatienten, die weder zum Zeitpunkt der Erkrankung rauchten, noch zuvor Raucher gewesen waren (echte Nichtraucher). Raucher hatten weniger hBD-2 im Rachenspülwasser als Nichtraucher. Die hBD-2 Konzentration im Rachenspülwasser von Patienten, die zum Zeitpunkt der Erkrankung nicht mehr rauchten, aber zuvor Raucher gewesen waren (ehemalige Raucher), war auch etwas geringer als bei Nichtrauchern. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 16 A). Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten (Packyears) der einzelnen Probanden und der hBD-2 Konzentration (Abb. 16 B). In diese Auswertung sind nur echte Raucher und echte Nichtraucher aufgenommen. Die Packyears berechnen sich aus dem Produkt der Anzahl der Jahre, die eine Person geraucht hat, und der durchschnittlichen Zahl der Zigarettenpäckchen, die die Person pro Tag rauchte. Aus Abbildung 16 B wird ersichtlich, daß die hBD-2 Konzentration mit zunehmenden „Packyears“ abnimmt (Korrelationskoeffizient $r = 0,601$, Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,361$, $p=0,039$).

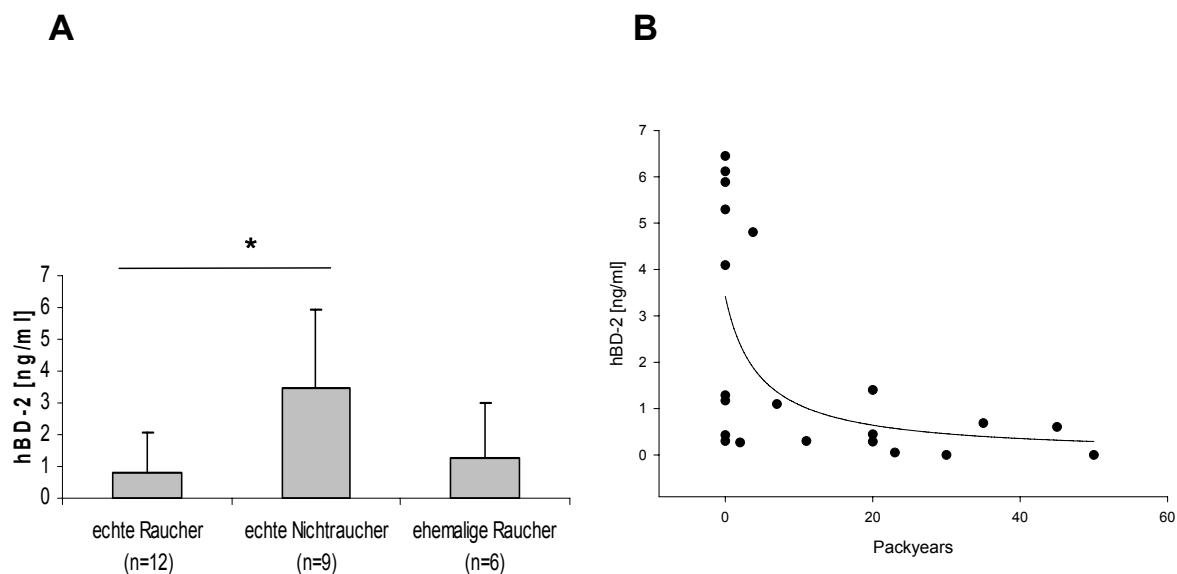


Abb. 16: hBD-2 Konzentrationen in Rachenspülwasser von Pneumoniepatienten sind bei Rauchern gemindert. hBD-2 Konzentrationen wurden mittels ELISA in Rachenspülwasser gemessen. A) echte Raucher: Personen die zum Zeitpunkt der Spülung Raucher waren; echte Nichtraucher: Personen die weder zum Zeitpunkt der Spülung noch zuvor Raucher gewesen waren; ehemalige Raucher: Personen, die zum Zeitpunkt der Spülung keine Raucher waren, aber zuvor Raucher gewesen waren. B) Korrelation zwischen Packyears und der hBD-2 Konzentration in Rachenspülwasser (nur echte Raucher und echte Nichtraucher). Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert.

Im Gegensatz zu den hBD-2 Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied bei den LL-37/hCAP-18 Konzentrationen in den Rachenspülungen zwischen Rauchern, Nichtrauchern und ehemaligen Rauchern gemessen werden (Abb. 17 A). Es war auch keine Korrelation zwischen der LL-37/hCAP-18 Konzentration und den „Packyears“ feststellbar (Korrelationskoeffizient $r = -0,106$, Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,00114$, $p=0,645$) (Abb. 17 B).

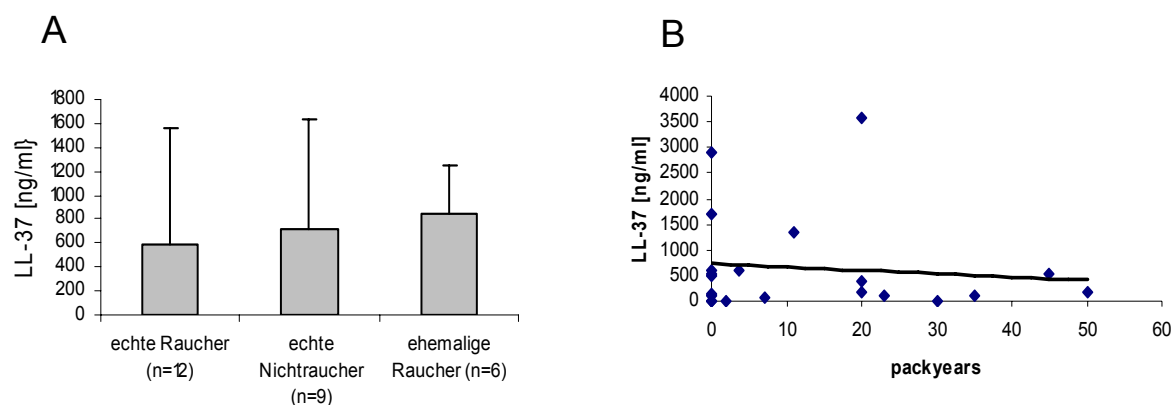


Abb. 17: LL-37/hCAP-18 Konzentrationen in Rachenspülungen von Pneumoniekranke. LL-37/hCAP-18 Konzentrationen wurden mittels ELISA in Rachenspülflüssigkeit gemessen. A) echte Raucher: Personen die zum Zeitpunkt der Spülung Raucher waren; echte Nichtraucher: Personen die weder zum Zeitpunkt der Spülung noch zuvor Raucher gewesen waren; ehemalige Raucher: Personen, die zum Zeitpunkt der Spülung keine Raucher waren, aber zuvor Raucher gewesen waren. B) Korrelation zwischen Packyears und der LL-37/hCAP-18 Konzentration (nur echte Raucher und echte Nichtraucher).

Die geminderte Konzentration von hBD-2 in Rachenspülwasser von Rauchern mit einer Pneumonie korrelierten mit der *in vitro* festgestellten Inhibierung der hBD-2 Expression von Epithelzellen durch Zigarettenrauch.

4.4 Einfluß einer allergischen Entzündung auf die angeborene Immunität des Respirationstrakts

4.4.1 Auswirkung von Th2-Zytokinen auf Faktoren der angeborenen Immunität von humanen Atemwegsepithelzellen *in vitro*

Des weiteren wurde betrachtet, ob neben schädlichen Umwelteinflüssen wie Zigarettenrauch auch andere Faktoren wie eine allergische Entzündung die Expression von β -Defensinen beeinflussen. Da bei allergischer Entzündung der Lunge anti-inflammatorische bzw. Th2-Zytokine eine Rolle spielen, wurde die Auswirkung von IL-4 und IL-13 auf die β -Defensin Expression in humanen Atemwegsepithelzellen untersucht. Neben allergischen Entzündungen spielen diese Zytokine aber auch bei chronischen *P. aeruginosa* Infektionen bei Cystischer Fibrose eine Rolle. Primäre Atemwegszellen in Flüssigkultur wurden mit den Zytokinen IL-4

und IL-13 in Kombination mit Hitze inaktivierten *P. aeruginosa* Bakterien oder IL-1 inkubiert. Die durch IL-1 oder *P. aeruginosa* induzierte Expression von hBD-2 wurde durch IL-4 und IL-13 signifikant gehemmt (Abb. 18 A und B). Die hBD-1 Expression blieb von den verschiedenen Stimulationsbedingungen unbeeinflusst. Die Abgabe des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 nach Stimulation mit *P. aeruginosa* wurde durch IL-4 und IL-13 leicht gemindert (Abb. 18 C).

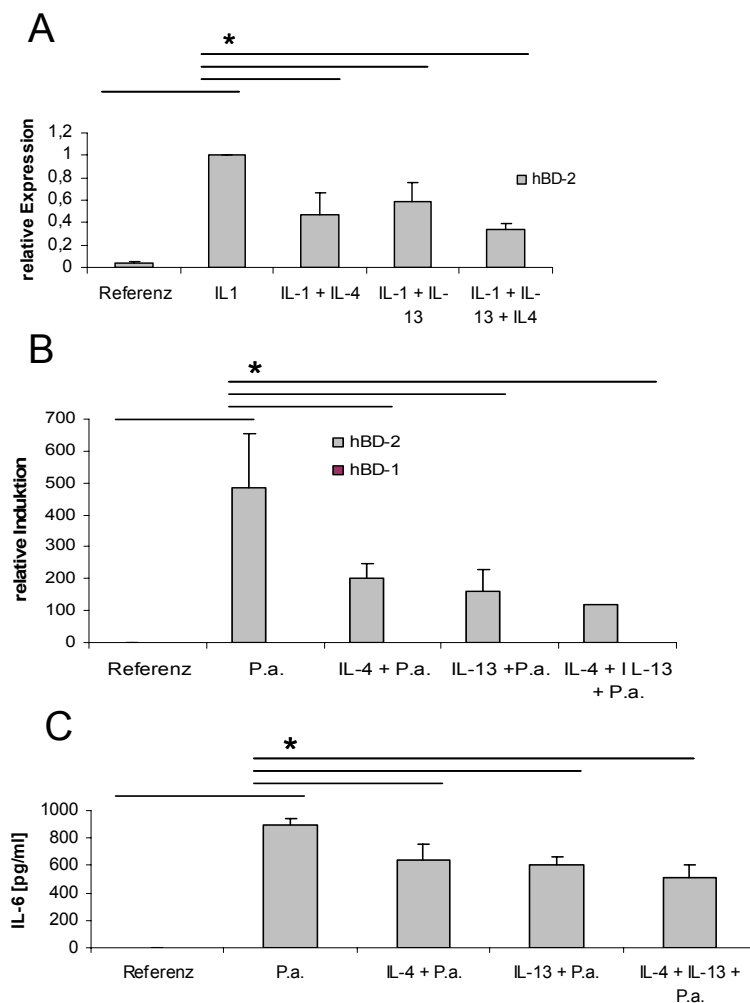


Abb. 18: Th2-Zytokine haben einen inhibitorischen Effekt auf die hBD-2 Expression und die Abgabe von IL-6 bei Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegszellen wurden eine Stunde mit IL-4 [50 ng/ml], IL-13 [50 ng/ml] oder mit IL-4 und IL-13 inkubiert und nachfolgend vier Stunden mit IL-1 [5 ng/ml] (A) oder *P. aeruginosa* (*P.a.*) (B und C) stimuliert. hBD-2 mRNA Expression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR gemessen (A und B); IL-6 Abgabe wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 4$).

4.4.2 Interaktion zwischen bakterieller Abwehr und allergischer Entzündung im murinen Asthma-Modell

4.4.2.1 Die allergische Entzündung verursacht einen Abwehrdefekt

Die Beobachtung, daß Th2-Zytokine die Expression von hBD-2 *in vitro* hemmen, führte zu der Frage, wie sich eine allergische Entzündung in der Lunge auf die angeborene Immunität bzw. die Abwehr einer bakterieller Infektion des Respirationstrakts *in vivo* auswirkt. Hierfür wurde ein murines Asthma-Modell gewählt. BALB/c Mäuse wurden erst nach einem Standardprotokoll mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und dann mit Ovalbumin als Aerosol herausgefordert, so daß es zu einer allergischen Entzündung in den Lungen kam. Die Tiere wurden daraufhin intranasal mit *P. aeruginosa* infiziert. 24 Stunden nach der Infektion mit *P. aeruginosa* wurden die Lungen entnommen, in PBS homogenisiert und die Kolonie bildenden Einheiten (CFU) pro Lunge bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die allergische Infektion zu einem Abwehrdefekt geführt hatte, der sich in einer verzögerten Klärung der bakteriellen Infektion manifestierte. Nicht sensibilisierte und nicht herausgeforderte Kontrolltiere, die keine allergische Entzündung in der Lunge aufwiesen, hatten 24 Stunden nach der Infektion signifikant weniger Bakterien in der Lunge als Tiere mit allergischer Entzündung (Abb. 19).

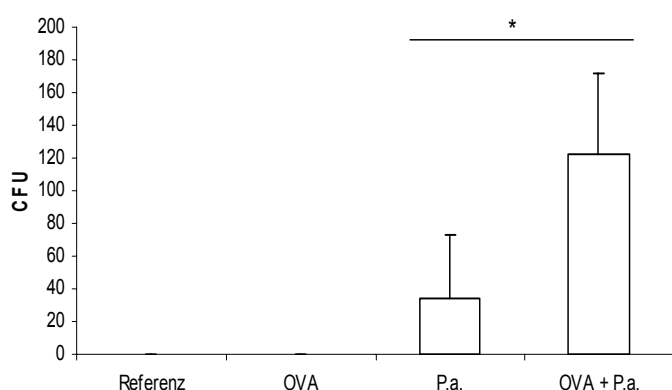


Abb. 19: Die allergische Entzündung verursacht einen Abwehrdefekt. Mit (OVA) und ohne (Referenz) Ovalbumin sensibilisierte und herausgeforderte BALB/c Mäuse wurden mit *P. aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (3×10^5 CFU) oder PBS intranasal infiziert. Nach 24 Stunden wurde die Anzahl der verbleibenden Bakterien (CFU) im rechten Lungenflügel bestimmt. Tiere mit allergischer Entzündung hatten signifikant mehr Bakterien in der Lunge als infizierte Kontrolltiere. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 5$).

4.4.2.2 Die allergische Entzündung beeinflusst den Verlauf der Immunantwort bei einer bakteriellen Infektion

4.4.2.2.1 Die allergische Entzündung hemmt den Einstrom von neutrophilen Granulozyten

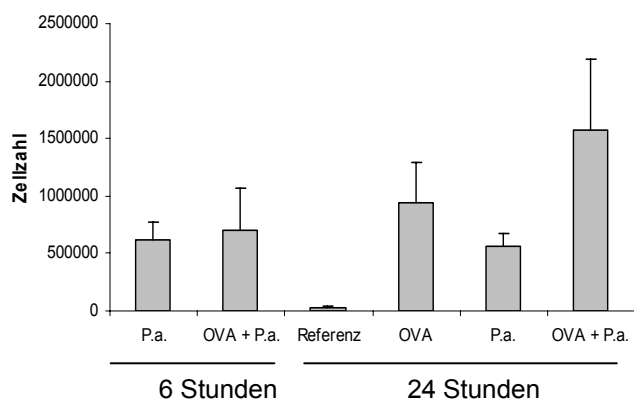
Neutrophile Granulozyten sind während der akuten Phase einer bakteriellen Infektion maßgeblich an der Abwehr und Bekämpfung von Bakterien beteiligt. Es wurde daher untersucht, wie die allergische Entzündung den Einstrom von Immunzellen in die Lunge beeinflusst. Sechs und 24 Stunden nach der Infektion wurden die Mäuse lavagiert.

Die Auszählung der Zellen in der BAL ergab im Vergleich mit den Referenztieren sowohl bei den Tieren mit allergischer Entzündung, als auch bei infizierten Tieren und bei infizierten Tieren mit allergischer Entzündung nach sechs sowie nach 24 Stunden eine stark erhöhte Gesamtzellzahl (Abb. 20 A).

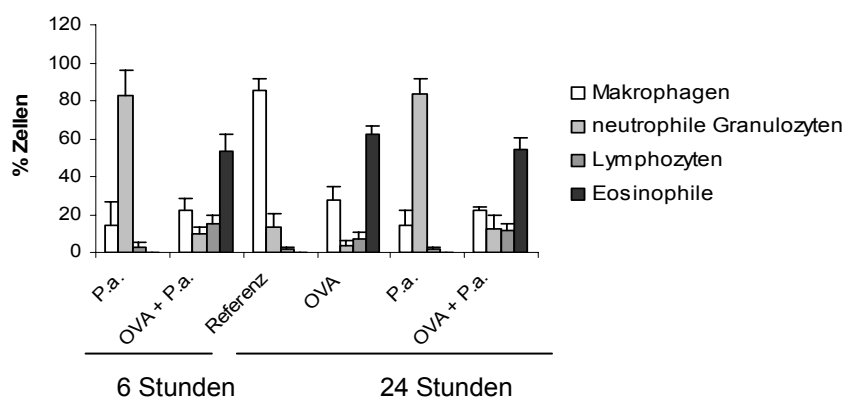
Die Differentialzellzählung ergab für die mit Ovalbumin sensibilisierten und herausgeforderten Tiere das typische Zellbild einer allergischen Reaktion in der Lunge (Abb. 20 B und C). Der Anteil an Eosinophilen lag bei 60 %, aber auch Makrophagen und Lymphozyten waren in ihrer Anzahl erhöht. Die Infektion von Referenztieren mit *P. aeruginosa* Bakterien war durch einen starken Einstrom von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden lag der Anteil an neutrophilen Granulozyten bei infizierten Referenztieren bei über 90 %. Im Vergleich zu den infizierten Referenztieren wiesen infizierte Tiere, die zuvor mit Ovalbumin sensibilisiert und herausgefordert worden waren, nach sechs und nach 24 Stunden einen stark verminderten Einstrom an neutrophilen Granulozyten auf. Der Anteil an neutrophilen Granulozyten lag hier bei 15 bis 20 %. Die Anzahl und der Anteil an Eosinophilen und Lymphozyten bei mit Ovalbumin herausgeforderten Tieren mit und ohne *P. aeruginosa* Infektion unterschied sich zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die allergische Entzündung den Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge bei bakterieller Infektion hemmt.

A



B



C

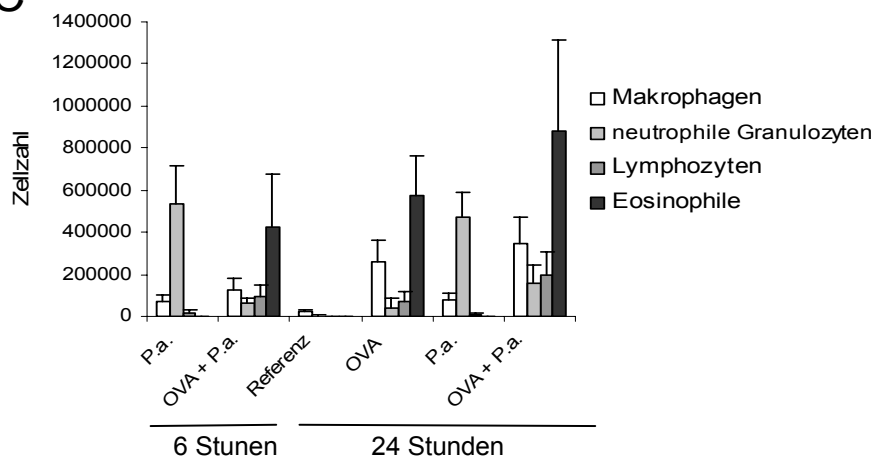


Abb. 20: Der Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge nach bakterieller Infektion ist bei gleichzeitiger allergischer Entzündung gehemmt. Mit (OVA) und ohne (Referenz) Ovalbumin sensibilisierte und herausgeforderte BALB/c Mäuse wurden mit *P. aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (3×10^5 CFU) oder PBS intranasal infiziert. A) Gesamtzellzahl in der BAL 6 und 24 Stunden nach der Infektion. B) Anteil an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Eosinophilen in der BAL 6 und 24 Stunden nach der Infektion. C) Differentialzellzählung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Eosinophilen in der BAL 6 und 24 Stunden nach der Infektion.

4.4.2.2.2 Die allergische Entzündung führt zu geminderten Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen in der Lunge

Bei einer akuten bakteriellen Infektion kommt es zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die den Einstrom von Immunzellen in die Lunge dirigieren. Das murine Chemokin KC ist z.B. chemotaktisch für neutrophile Granulozyten. Es wurden daher die Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen in der BAL Flüssigkeit bestimmt. Die Infektion von Referenztieren mit *P. aeruginosa* führte zu erhöhten Konzentrationen an IL-1 und IL-6 24 Stunden nach der Infektion (Abb. 21 C/D). Sowohl die Konzentrationen von IL-1 als auch von IL-6 waren nach 24 Stunden bei den infizierten Referenztieren nicht nur gegenüber den nicht infizierten Referenztieren und den mit Ovalbumin sensibilisierten und herausgeforderten Tieren signifikant erhöht, sondern auch gegenüber den mit Ovalbumin sensibilisierten und herausgeforderten infizierten Tieren. Darüber hinaus war IL-6 bei den Ovalbumin sensibilisierten und herausgeforderten Tieren nach 24 Stunden signifikant vermindert gegenüber den nicht infizierten Referenztieren (Abb. 21 D). Auch sechs Stunden nach der Infektion waren die Konzentrationen von IL-1 und KC in der BAL Flüssigkeit von infizierten und mit Ovalbumin herausgeforderten Tieren signifikant niedriger als bei den infizierten Referenztieren (Abb. 21 A/B).

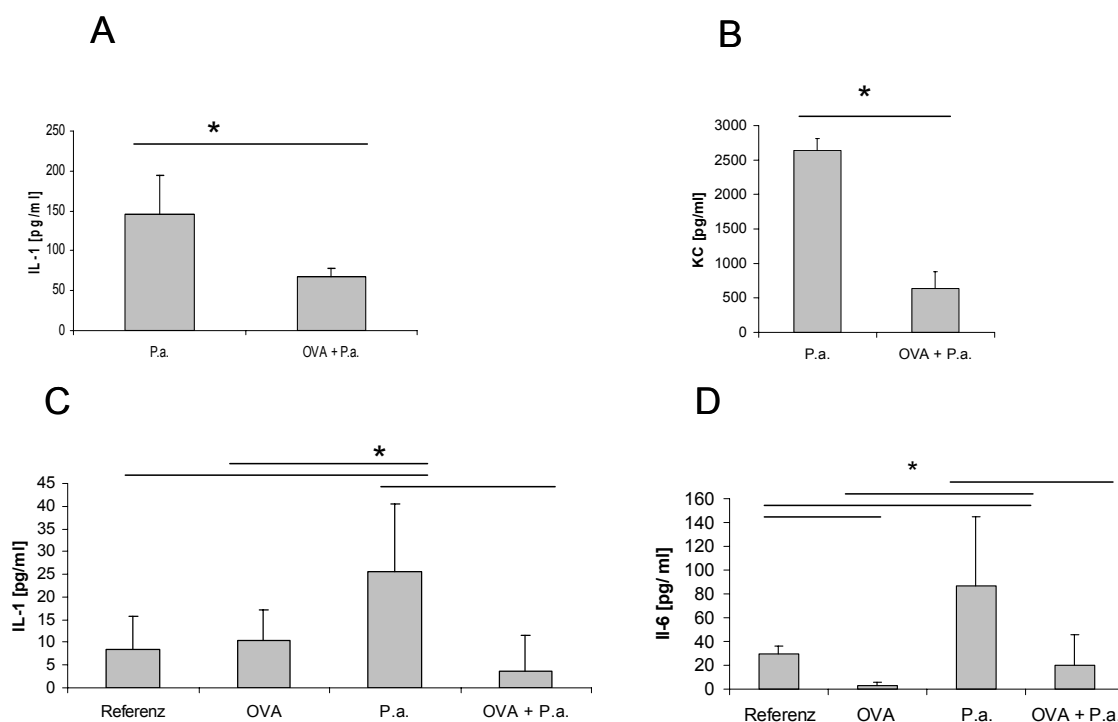


Abb. 21: Die allergische Entzündung führt zu geminderten Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen in der BAL Flüssigkeit nach bakterieller Infektion. Mit (OVA) und ohne (Referenz) Ovalbumin sensibilisierte und herausgeforderte BALB/c Mäuse wurden mit *P. aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (3×10^5 CFU) oder PBS intranasal infiziert. A) IL-1 Konzentrationen in der BAL Flüssigkeit sechs Stunden nach der Infektion. B) KC Konzentrationen in der BAL Flüssigkeit sechs Stunden nach der Infektion. C) IL-1 Konzentration in der BAL Flüssigkeit 24 Stunden nach der Infektion. D) IL-6 Konzentration in der BAL Flüssigkeit 24 Stunden nach der Infektion. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 5$, A und B; $n = 6$, C und D).

Für die allergische Entzündung sind erhöhte Konzentrationen von anti-inflammatorischen Zytokinen in der BAL Flüssigkeit charakteristisch. Sechs Stunden nach der Infektion waren die Konzentrationen von IL-4 und IL-13 in der BAL Flüssigkeit von mit Ovalbumin herausgeforderten und mit *P. aeruginosa* infizierten Tieren signifikant höher als bei Tieren, die nur mit *P. aeruginosa* infiziert wurden (Abb. 22). Nach 24 Stunden konnten keine anti-inflammatorischen Zytokine nachgewiesen werden.

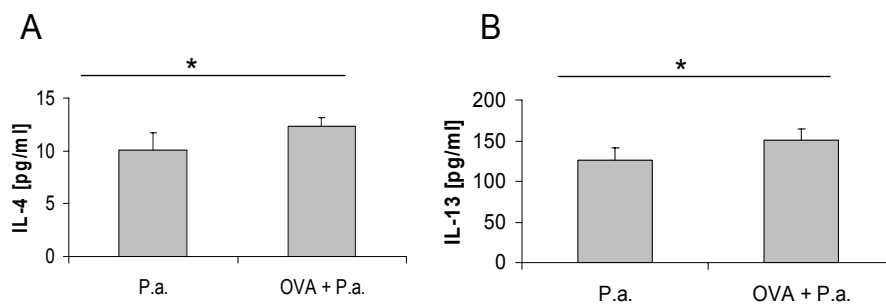


Abb. 22: Die allergische Entzündung führt zu erhöhten Konzentrationen von anti-inflammatorischen Zytokinen in der BAL Flüssigkeit. Mit (OVA) und ohne Ovalbumin sensibilisierte und herausgeforderte BALB/c Mäuse wurden mit *P.aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (3×10^5 CFU) intranasal infiziert. A) IL-4 Konzentrationen in der BAL Flüssigkeit sechs Stunden nach der Infektion. B) IL-13 Konzentrationen in der BAL Flüssigkeit sechs Stunden nach der Infektion. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert ($n = 5$).

Die geminderte Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine bei infizierten Tieren mit allergischer Entzündung steht im Einklang mit dem verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und dem beschriebenen Defekt in der Abwehr der bakteriellen Infektion. Diese Ergebnisse zeigen, daß die allergische Entzündung des Respirationstrakts und die damit verbundene Th2-Antwort die angeborene Immunität bzw. die Th1-Antwort bei einer bakteriellen Infektion hemmen. Es stellte sich nun die Frage, ob neben der Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine auch die Abgabe antimikrobieller Peptide in den Respirationstrakt durch die allergische Entzündung beeinflusst wird.

4.4.2.2.3 Die allergische Entzündung hemmt die Abgabe von CRAMP

Neben Zytokinen sind auch AMP mit ihren zahlreichen Funktionen am Verlauf von Entzündungen und Infektionen beteiligt. In verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Studien wurden die antimikrobielle Aktivität und die immunmodulatorischen Funktionen von kationischen AMP untersucht. CRAMP, das bei der Abwehr einer bakteriellen Infektion der Haut von Bedeutung ist, ist das zu LL-37/hCAP-18 homologe Cathelizidin der Maus. Die BAL Flüssigkeit der mit Bakterien infizierten Referenztiere und der mit Bakterien infizierten Tiere mit einer allergischen Entzündung wurde in einer Western-Blot Analyse auf das Vorhandensein von CRAMP untersucht (Abb.

23). Bei vier von fünf infizierten Referenztieren konnte das ca. 18 kD große nicht prozessierte CRAMP sechs Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden. Bei keinem der infizierten Tiere mit allergischer Entzündung konnte CRAMP hingegen detektiert werden. Die geminderte Abgabe von CRAMP korreliert mit der geringeren Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen und dem geminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten bei infizierten Tieren mit allergischer Entzündung.

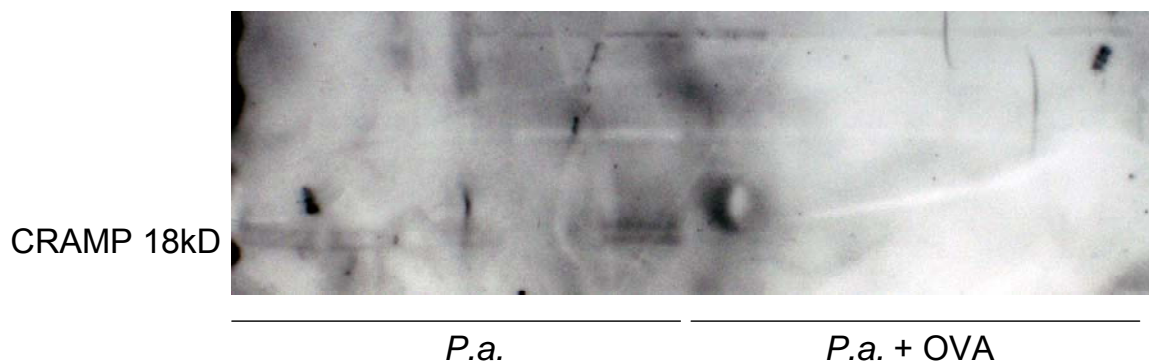


Abb. 23: Die allergische Entzündung hemmt die Abgabe von CRAMP bei bakterieller Infektion. Mit (OVA) und ohne Ovalbumin sensibilisierte und herausgeforderte BALB/c Mäuse wurden mit *P.aeruginosa* (*P.a.*) Bakterien (3×10^5 CFU) intranasal infiziert. In einer Western-Blot Analyse wurde sechs Stunden nach der Infektion das AMP CRAMP in der BAL Flüssigkeit der infizierten Referenztiere nachgewiesen

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die angeborene Immunantwort des Respirationstrakts untersucht und der Einfluß von äußeren Faktoren wie Zigarettenrauch und inneren Faktoren wie einer allergischen Entzündung der Lunge auf die Immunantwort charakterisiert. Es zeigte sich, daß sowohl Zigarettenrauch als auch allergische Entzündung die angeborene Immunität des Respirationstrakts und des Atemwegsepithels beeinträchtigten und zu einem Abwehrdefekt führten.

5.1 Faktoren der angeborenen Immunität des Respirationstrakts und der Atemwegsepithelzellen

5.1.1 Atemwegsepithelzellen exprimieren TLR

Zahlreiche Studien der letzten Jahre zeigen, daß Atemwegsepithel nicht nur eine physikalische Barriere für Pathogene ist und Keime mit Hilfe der mukoziliären Clearance aus dem Respirationstrakt entfernt. Vielmehr ist das Epithel aktiv an der angeborenen Immunantwort beteiligt [1;59]. Es gibt bei einer Entzündung oder Infektion Zytokine und Chemokine ab, die die Immunantwort modulieren und Immunzellen in den Respirationstrakt dirigieren. Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen kommt den TLR zu, die es dem Atemwegsepithel und den Immunzellen des Respirationstrakts erlauben, Pathogene zu detektieren. Wie in früheren Studien [43;197] konnte auch in dieser Arbeit die Expression der TLR 1-6, 9 und 10 in Atemwegsepithelzellen, sowie die TLR 1-6 in der Zelllinie MM-39 nachgewiesen werden. Frühere Studien zeigten darüber hinaus, daß die Stimulation von Atemwegsepithel mit Keimen und TLR Liganden zur Expression und Abgabe von Chemokinen, Zytokinen und Defensinen führt [43;106].

5.1.2 Atemwegsepithelzellen werden durch TLR Liganden und Pathogene aktiviert

Um die durch Pathogene hervorgerufene Entzündung zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit primäre Atemwegsepithelzellen mit verschiedenen Pathogenen und Bestandteilen von Pathogenen, die als Liganden für TLR beschrieben sind, stimuliert: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* (Wildtyp), *L. pneumophila* (Flagellin Mutante), MALP (TLR2 Ligand), POLY (I:C) (TLR3 Ligand), Flagellin (TLR5 Ligand) und IL-1. Anschließend wurde die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8, des IFN induzierbaren Chemokins IP-10 sowie der Defensine hBD-1 und hBD-2 untersucht.

Nach Stimulation der Atemwegszellen mit den genannten Faktoren kam es in allen Fällen zu einer gesteigerten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 und von hBD-2, aber nur die Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly (I:C) führte zu einer äußerst starken Hochregulation von IP-10. Diese Ergebnisse zeigen, daß sich Atemwegsepithel nach Stimulation mit Pathogenen und spezifischen TLR Liganden aktiv an der Immunantwort durch die Abgabe von Zytokinen und Defensinen beteiligt. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, daß Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit Pathogenen zwei verschiedene und für Immunzellen in der Literatur gut beschriebene Signalwege aktivieren können: den MyD88 abhängigen Signalweg und den MyD88 unabhängigen Signalweg [6].

Es ist bekannt, daß an der Regulation von IL-8 der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt ist und daß die beiden von TLR aktivierten Signalwege, der MyD88 abhängige und der MyD88 unabhängige Signalweg, in die Aktivierung von NF- κ B münden können [6;198]. Die Expression von IL-8 ließ sich nicht nur durch Bakterien induzieren, sondern auch durch spezifische Liganden für TLR, die entweder nur den MyD88 abhängigen Weg (z.B. TLR5) oder ausschließlich den MyD88 unabhängigen Weg (TLR3) aktivieren können. Dies zeigt, daß in Atemwegsepithel die Expression NF- κ B regulierter Gene nach Stimulation von TLR sowohl über den MyD88 abhängigen Weg als auch über den MyD88 unabhängigen Weg vermittelt wird. Im Gegensatz zum MyD88 abhängigen Weg wird über den MyD88 unabhängigen Weg nicht nur NF- κ B aktiviert, sondern auch der Transkriptionsfaktor IRF3, der z.B. IFN- β reguliert. In Folge der Expression von IFN- β kommt es zur Hochregulation der IFN induzierbaren Gene wie IP-10 [6]. Während die Stimulation mit dem TLR3 Liganden

Poly (I:C) eine äußerst starke Hochregulation von IP-10 zur Folge hatte, führte die Stimulation mit anderen Faktoren wie mit dem TLR5 Liganden Flagellin hingegen nicht zu der Induktion von IP-10. Die starke Hochregulation von IP-10 nach Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly (I:C) zeigt, daß Atemwegsepithelzellen den MyD88 unabhängigen Weg aktivieren können.

Wie der Promotor vieler pro-inflammatorischer Zytokine besitzt auch der Promotor von hBD-2 mehrere Bindestellen für NF- κ B [104]. Mehrere Studien zeigen, daß NF- κ B an der Regulation der Expression von hBD-2 beteiligt ist, und daß Stimulation von TLR über den MyD88 abhängigen Weg zur Hochregulation von hBD-2 führt [110;112]. Auch in dieser Arbeit führte die Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit TLR Liganden, Bakterien und bakteriellen Bestandteilen zur Induktion von hBD-2.

In dem in dieser Arbeit gewählten *in vitro* Modell scheinen Gram-negative Bakterien, zumindest aber *L. pneumophila*, Atemwegsepithelzellen in erster Linie über TLR5 und abhängig von Flagellin zu aktivieren. Dies zeigte sich daran, daß die Flagellin Mutante von *L. pneumophila* im Gegensatz zum Wildtypen die hBD-2 Expression nicht induzierte und zu einer deutlich schwächeren Abgabe von IL-8 führte.

5.1.3 Antimikrobielle Peptide werden in Atemwegssekrete abgegeben

Antimikrobielle Peptide werden nicht nur von Atemwegsepithelzellen *in vitro* gebildet und abgegeben, sondern kommen auch in den verschiedensten Körperflüssigkeiten vor. In zahlreichen Studien wurden AMP in Atemwegssekreten und in der BAL Flüssigkeit von Patienten, die unter verschiedenen Krankheiten litten (z.B. Zystische Fibrose, Pneumonie), nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die antimikrobiellen Peptide LL-37/hCAP-18 und hBD-2 in Rachenspülflüssigkeit von Pneumoniepatienten und im Sputum von Patienten mit COPD basierend auf einem α 1-Antitrypsin-Mangel während und nach einer Exazerbation vorhanden sind. Da es bei der Gewinnung der verschiedenen Proben meist zu einer Verdünnung der Sekrete kommt, ist es schwer zu sagen, ob die gemessenen Defensine in den entsprechenden Sekreten ursprünglich in physiologisch relevanten Konzentrationen vorlagen, die z.B. für eine antimikrobielle Aktivität ausreichen. Die gemessenen LL-37/hCAP-18 Konzentrationen in den verschiedenen Sekreten reichten, wie z.B. die LL-37 Konzentration von 0,7 μ g/ml in Rachenspülwasser von Pneumoniepatienten,

allerdings schon an Konzentrationen von 1 µg/ml heran. Da LL-37 *in vitro* schon ab Konzentrationen von 5 µg/ml antimikrobiell gegen zahlreiche Mikroorganismen wirkt, lagen die tatsächlichen LL-37/hCAP-18 Konzentrationen in den Sekreten höchst wahrscheinlich, zumindest was die antimikrobielle Aktivität betrifft, in physiologisch relevanten Konzentrationen vor. Zahlreiche *in vitro* Studien geben Hinweise darauf, daß antimikrobielle Peptide die Immunantwort modulieren können [52]. Es ist allerdings vollkommen unbekannt, inwiefern sich AMP *in vivo* modulatorisch auf die Immunantwort auswirken und in welchen Konzentrationen die AMP bei möglichen Prozessen wie der Aktivierung von Immunzellen, Wundheilung oder Angiogenese *in vivo* vorhanden sein müssen.

Im Fall der COPD Patienten zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Entzündung und den Konzentrationen von hBD-2 und LL-37/hCAP-18. Während einer Exazerbation waren die Konzentrationen von hBD-2 und von LL-37/hCAP-18 signifikant höher als nach dem Abklingen der Exazerbation. Bei den Exazerbationsproben von COPD Patienten ergab sich also eine positive Korrelation zwischen der Entzündung und den AMP Spiegel. Ob sich AMP bei α1-Antitrypsin-Mangel sich positiv oder negativ auf die Entzündung auswirken, müssen zukünftige Studien erst noch zeigen.

Welche Zelltypen an der Bildung und Abgabe der antimikrobiellen Peptide bei den verschiedenen Patientengruppen beteiligt sind, läßt sich nicht genau sagen. Da aber neutrophile Granulozyten LL-37/hCAP-18 in ihren Granula speichern und am Ort der Entzündung abgeben, sind diese Zellen zumindest bei bakteriellen Infektionen sicherlich eine Hauptquelle für LL-37/hCAP-18. hBD-2 scheint hingegen in erster Linie von Epithelien gebildet und abgegeben zu werden.

5.2 Zigarettenrauch wirkt sich auf die angeborene Immunantwort der Atemwege aus

5.2.1 Zigarettenrauch führt zu einer Entzündungsreaktion von Atemwegsepithelzellen *in vitro*

Es stellte sich nun die Frage, wie sich äußere Faktoren wie zum Beispiel Zigarettenrauch auf die angeborene Immunität des Respirationstrakts und besonders

des Atemwegsepithels auswirken. Für diesen Zweck wurde eine Expositions-kammer etabliert, die es ermöglichte, primäre ausdifferenzierte Atemwegsepithelzellen direkt mit Zigarettenrauch zu inkubieren.

In einem ersten Schritt wurde die durch Zigarettenrauch verursachte Entzündungsreaktion hinsichtlich der Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert und daran beteiligte Signalwege untersucht. Exposition von voll ausdifferenzierten und zilienträgenden primären Atemwegsepithelzellen und der Zelllinie MM-39 mit Zigarettenrauch führte zu einer verstärkten Abgabe der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, daß Exposition von Atemwegszellen mit Zigarettenrauch oder Zigarettenrauchextrakt zur Aktivierung von verschiedenen Signalmolekülen wie der MAP Kinase ERK1/2 [199], dem Transkriptionsfaktor NF- κ B und der Proteinkinase C führt [182;188;200]. Darüber hinaus wird die MAP Kinase p38 in Alveolar-Makrophagen von Rauchern durch LPS stärker aktiviert als bei Nichtrauchern [187]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Zigarettenrauch die MAP Kinase p38 *in vitro* aktiviert und daß die Inhibition der Aktivierung von p38 die durch Zigarettenrauch hervorgerufene Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine unterbindet. Darüber hinaus ließ sich die Abgabe von IL-6 nach Rauchexposition durch antisense Oligonukleotide gegen die p65 Untereinheit von NF- κ B hemmen. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modellsystem führte Zigarettenrauch zur Phosphorylierung von p38 mit anschließender Aktivierung von NF- κ B. Dies hatte eine gesteigerte Expression und Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen zur Folge. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die zeigen, daß Zigarettenrauchkondensat NF- κ B über die Phosphorylierung und den Abbau von I κ B α unter Beteiligung von MAP Kinasen aktiviert. Die Informationen über die Signalwege, über die Rauch die epitheliale Entzündungsreaktion aktiviert, bieten Möglichkeiten für therapeutische Ansätze.

5.2.2 Zigarettenrauch moduliert die angeborene Immunität von Atemwegsepithelzellen *in vitro*

Als nächstes wurde die Auswirkung von Zigarettenrauch auf die angeborene Immunantwort *in vitro* untersucht. Hierfür wurden primäre voll ausdifferenzierte Atemwegsepithelzellen und die Zelllinie MM-39 mit Zigarettenrauch in Kombination

mit *P. aeruginosa* oder IL-1 inkubiert. IL-1 wurde gewählt, da Makrophagen bei Entzündungen und Infektionen Atemwegsepithelzellen mit Hilfe von IL-1 aktivieren können [108]. Während die Inkubation mit Zigarettenrauch in Kombination mit Bakterien oder dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 zu einer gesteigerten Abgabe von IL-6 und IL-8 führte, wurde die durch Bakterien und IL-1 hervorgerufene Expression von hBD-2 durch vorherige Inkubation mit Zigarettenrauch gehemmt. Da Zigarettenrauch ein komplexes Gemisch vieler tausend Substanzen ist, jedoch jeder Zigarettenzug eine Unzahl an reaktiven Sauerstoffmolekülen wie z.B. Wasserstoffperoxid enthält [179], wurde untersucht, ob auch Wasserstoffperoxid die hBD-2 Expression hemmt. Es zeigte sich, daß Wasserstoffperoxid dosisabhängig die durch Bakterien hervorgerufene hBD-2 Induktion hemmt. Der bei Zigarettenrauchexposition beobachtete Effekt der Hemmung der hBD-2 Induktion könnte also zumindest zum Teil durch die in Zigarettenrauch enthaltenen reaktiven Sauerstoffmoleküle hervorgerufen werden. Mehrere Studien zeigen, daß sich reaktive Sauerstoffmoleküle und Zigarettenrauch sowohl auf die Chromatinstruktur im Promotorbereich vieler Gene auswirken [201;202], als auch die Transkriptionsfaktoren Nf-κB und AP-1 aktivieren können, was zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 führt [203;204]. Weder Zigarettenrauch noch H₂O₂ resultierten jedoch in einer Hochregulation von hBD-2. Obwohl hBD-2 im Promotor Bindestellen für NF-κB und AP-1 enthält [104], scheint die bloße Aktivierung von Nf-κB und AP-1 für die Expression von hBD-2 bei Atemwegsepithelzellen nicht auszureichen. Im Gegenteil scheint Rauch zusätzliche Wege zu aktivieren, die zu einer Hemmung der hBD-2 Induktion oder einer hBD-2 Herunterregulierung führen. Diese Regulation scheint nicht direkt auf die NF-κB Aktivierung einzugreifen, da die ebenfalls NF-κB regulierten pro-inflammatorischen Zytokine nicht beeinflusst sind. Diese Ergebnisse deuten auf eine komplexe Regulation von hBD-2 hin. Inwiefern sich Zigarettenrauch und Wasserstoffperoxid auf die Struktur des Chromatins im Promotorbereich von hBD-2 und auf weitere Signalwege und Transkriptionsfaktoren, die die Expression von hBD-2 regulieren, auswirkt, müssen weitere Studien untersuchen.

5.2.3 Rauchen hemmt die Abgabe von hBD-2 in den Rachenraum bei einer bakteriellen Infektion

Um zu untersuchen, ob chronisches Rauchen *in vivo* die Expression von Defensinen während einer bakteriellen Infektion bzw. Pneumonie beeinflusst, wurden die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 im Rachenspülwasser und im Sputum von Patienten mit einer Pneumonie ermittelt und zwischen Rauchern und Nichtrauchern verglichen. Die hBD-2 Konzentrationen in Rachenspülwasser korrelierten signifikant negativ mit den „Packyears“ (Zahl der pro Tag gerauchten Zigarettenpäckchen multipliziert mit der Anzahl der gerauchten Jahre). Je stärker und länger ein Patient geraucht hatte, desto weniger hBD-2 war meßbar. Im Sputum waren die gemessenen hBD-2 Konzentrationen für eine statistische Auswertung zu gering. Für LL-37/hCap-18 konnte keine Korrelation zwischen der Konzentration und den „Packyears“ festgestellt werden.

Tabakmißbrauch ist die Ursache zahlreicher schwerer Erkrankungen und stellt für den Respirationstrakt eine besondere Belastung dar. Atemwegsepithel hat den ersten Kontakt zum Zigarettenrauch und wird durch die vielen verschiedenen Bestandteile des Rauchs stark geschädigt. Rauchen führt z.B. zu einer Beeinträchtigung des Flimmerepithels und leistet dadurch der Besiedelung des Respirationstrakts mit Pathogenen Vorschub [205]. Es verwundert daher kaum, daß zahlreiche Raucher an chronischen bakteriellen Infektionen der Atemwege bzw. unter chronischer Bronchitis leiden [205;206]. Chronische Bronchitis und bakterielle Infektionen spielen bei der Entstehung und bei der Verschlechterung einer COPD eine entscheidende Rolle [175;207]. Auch wenn an dem Zusammenhang zwischen chronischem Tabakmißbrauch, Entzündung der Atemwege und der COPD kein Zweifel besteht, ist über die zu Grunde liegenden zellulären bzw. molekularen Mechanismen wenig bekannt.

In Studien mit Mäusen zeigte sich, daß Zigarettenrauchexposition der Tiere zu einer schwereren bzw. länger anhaltenden Infektion der Atemwege mit *P. aeruginosa* führte [208]. Darüber hinaus führte Zigarettenrauch zu einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Alveolar-Makrophagen im Lungengewebe und der BAL im Tierversuch [209]. Die phagozytotische Kapazität der Immunzellen erwies sich jedoch unmittelbar nach der Zigarettenrauchexposition der Tiere als gemindert.

Auch in *in vitro* Studien hatte Zigarettenrauch einen hemmenden Effekt auf die phagozytotische Kapazität von Alveolar-Makrophagen und neutrophilen Granulozyten [209].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß chronischer Tabakmißbrauch zu geminderten Konzentrationen von β -Defensinen im Rachenraum bei Pneumoniepatienten führt. Es liegt nahe, daß die geminderte Abgabe von antimikrobiellen Peptiden neben anderen Effekten des Rauchs (wie z.B. die hemmende Wirkung auf die phagozytotische Aktivität von Immunzellen) mit der Anfälligkeit von Rauchern für Infektionen des Rachenraums und der Atemwege in Verbindung steht. Auch in *in vitro* Studien mit voll ausdifferenzierten Atemwegsepithelzellen konnte der hemmende Effekt von Zigarettenrauch auf die β -Defensin Expression und Abgabe nach bakterieller oder IL-1 Stimulation gezeigt werden. Die geminderte Abgabe von hBD-2 ist ein Indiz, daß Zigarettenrauch auch weitere Faktoren der angeborenen Immunität, die an der Bekämpfung und Klärung von Infektionen beteiligt sind, hemmt und die Atemwege und den Rachenraum anfälliger für Infektionen macht. Auf der anderen Seite führt Zigarettenrauchexposition sowohl im Tierversuch, als auch in *in vitro* Studien mit Atemwegsepithel zu einer verstärkter Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen und von Chemokinen. In der vorliegenden Studie führte Zigarettenrauch in Kombination mit Bakterien oder IL-1 zu einer gesteigerten Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen, die z.B. chemotaktisch für neutrophile Granulozyten sind. Atemwegsepithel ist durch die Abgabe von Chemokinen und Zytokinen aktiv an der durch Rauch verursachten Entzündung beteiligt. Die abgegebenen Chemokine führen zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die Neutrophilen geben Faktoren ab, die auch körpereigenes Gewebe schädigen. Auf der anderen Seite wird die Bekämpfung und Klärung bakterieller Infektionen, z.B. durch die verminderte Abgabe antimikrobieller Peptide, gehemmt. All dies könnte zu den bei Rauchern beobachteten chronischen Entzündungen und Infektionen beitragen, in deren Folge auch körpereigenes Gewebe angegriffen und zerstört wird.

5.3 Die allergische Entzündung des Respirationstrakts verursacht einen Abwehrdefekt

Die angeborene Immunität steht in engem Verhältnis zum adaptiven Immunsystem. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, wie eine allergische Entzündung des Respirationstrakts die angeborene Immunität bei einer bakteriellen Infektion beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß in einem murinen Asthma-Modell die allergische Entzündung der Atemwege zu einem Abwehrdefekt bei bakterieller Infektion führt. Die bakterielle Infektion wird langsamer geklärt. Dies ist mit einem verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und einer verminderten Abgabe von Faktoren, die direkt an der Bekämpfung der Infektion beteiligt sind, wie pro-inflammatorischen Zytokinen und AMP (Cathelizidine und β -Defensine) verbunden.

Aus Studien über Neurodermitis ist bekannt, daß Th2-Zytokine die Expression und Abgabe antimikrobieller Peptide und pro-inflammatorischer Zytokine vermindern [117;118]. Dies scheint mit der gesteigerten Anfälligkeit von Patienten mit Neurodermitis für Hautinfektionen mit *Staphylococcus aureus* in Verbindung zu stehen. Auch in dieser Studie hatte die *in vitro* Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen mit IL-4 und IL-13 einen hemmenden Effekt auf die Expression von hBD-2 und IL-6 nach Stimulation mit Bakterien oder IL-1. Bei der asthmatischen Entzündung spielen CD4⁺ Lymphozyten, die Th2-Zytokine (IL-4, IL-13 und IL-5) abgeben und die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen der allergischen Entzündung (Mastzellen und Eosinophile) orchestrieren, eine Rolle [210;211]. Darüber hinaus wird Asthma mit chronischer Infektion in Verbindung gebracht. So konnten bei Patienten mit Asthma *Mycoplasmen* und *Chlamydien* nachgewiesen werden [212]. Auch bei chronischen *P. aeruginosa* Infektionen von Patienten mit Zystische Fibrose war die Abgabe von Th2-Zytokinen von peripheren mononukleären Blutzellen im Vergleich zu Patienten ohne chronische Infektion erhöht, die Abgabe von IFN- γ war hingegen geringer [213]. Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation zwischen IFN- γ Produktion und der Lungenfunktion festgestellt. In Tierversuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, daß eine chronische *P. aeruginosa* Infektion des Respirationstrakts bei BALB/c Mäusen, die eine Th2-Antwort bevorzugen, schwerer verläuft als bei C3H/HeN Mäusen, die eine

Th1-Antwort bevorzugen [214]. Die Infektion wurde bei C3H/HeN Mäusen effizienter geklärt als bei BALB/c Mäusen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die allergische Entzündung der Lunge und die damit verbundene Th2-Antwort die angeborene Immunität bzw. die Th1-Antwort bei bakterieller Infektion hemmt, was zu einer verzögerten Klärung der Infektion führte. Die Hemmung der angeborenen Immunantwort könnte bei chronischen Entzündungen zur Etablierung einer chronischen Infektion beitragen.

5.4 Schlußbemerkung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß Atemwegsepithel aktiv an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist. Es ist mit Hilfe von TLR in der Lage, Pathogene spezifisch zu detektieren und durch die Abgabe von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden die Immunantwort aktiv mitzugestalten.

Zigarettenrauch beeinflusst die Immunantwort von Atemwegsepithelzellen. So hemmte Zigarettenrauch einerseits die Abgabe von Defensinen, führte aber andererseits zu einer gesteigerten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen *in vitro*. Atemwegsepithelzellen könnten auf diese Weise zu der durch Tabakmißbrauch verursachten Entzündung und der gleichzeitig geschwächten Immunantwort des Respirationstrakts bei Infektionen beitragen. Tatsächlich konnten im Rachenspülwasser von Pneumoniepatienten, die rauchten, geringere hBD-2 Konzentrationen gemessen werden als im Rachenspülwasser von nicht rauchenden Pneumoniepatienten. Darüber hinaus ergaben *in vivo* Studien an einem murinen Asthma Modell, daß die allergische Entzündung in der Lunge zu einem Abwehrdefekt bei einer bakteriellen Infektion führt. Der Abwehrdefekt konnte auf eine geminderte Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine, einen geminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und eine geminderte Abgabe von antimikrobiellen Peptiden zurückgeführt werden. Bei der allergischen Entzündung des Respirationstrakts spielen Th2-Zytokine eine Rolle. Die in dieser Studie durchgeführten *in vitro* Experimente zeigten, daß Th2-Zytokine die Expression von β -Defensinen und pro-inflammatorischen Zytokinen von Atemwegsepithelzellen

hemmen. Inwiefern das Atemwegsepithel zu dem im murinen Asthmodell beobachteten Abwehrdefekt beiträgt, müssen weitere Studien klären.

6 Literaturverzeichnis

1. Whitsett JA: **Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair.** *J Clin Invest* 2002, **109**:565-9.
2. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM: **The innate immune system in cystic fibrosis lung disease.** *J Clin Invest* 1999, **103**:303-7.
3. Wilmott R, Fiedler M, Stark J: **Host defense mechanisms.** In *Disorders of the respiratory tract in children.* Edited by Chernick V, Boat T. Philadelphia: Saunders; 1998:238-264.
4. Bingle CD, Craven CJ: **PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx.** *Hum.Mol.Genet.* 2002, **11**:937-943.
5. Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, Tilan J, Pohl J, Ganz T: **Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid.** *J Immunol* 2002, **169**:6985-91.
6. Akira S, Takeda K: **Toll-like receptor signalling.** *Nat.Rev.Immunol.* 2004, **4**:499-511.
7. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: **Innate immune recognition.** *Annu.Rev.Immunol.* 2002, **20**:197-216.
8. Beutler B, Rietschel ET: **Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.** *Nat.Rev.Immunol.* 2003, **3**:169-176.
9. Imler JL, Hoffmann JA: **Toll receptors in Drosophila: a family of molecules regulating development and immunity.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **270**:63-79.

10. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: **The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.** *Cell* 1996, **86**:973-83.
11. Rock F, Hardiman G, Timanns J, Kastelein R, Bazan F: **A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:588-593.
12. Takeda K, Kaisho T, Akira S: **Toll-like receptors.** *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:335-76.
13. Medzhitov R: **Toll-like receptors and innate immunity.** *Nat.Rev.Immunol.* 2001, **1**:135-145.
14. Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ: **CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri.** *EMBO Rep.* 2001, **2**:736-742.
15. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ: **Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan.** *Science* 2003, **300**:1584-1587.
16. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ: **Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing.** *Trends Immunol.* 2003, **24**:652-658.
17. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: **Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.** *Science* 2004, **303**:1526-1529.
18. Takeda K, Akira S: **TLR signaling pathways.** *Semin.Immunol.* 2004, **16**:3-9.
19. Takeda K, Kaisho T, Akira S: **Toll-like receptors.** *Annu.Rev.Immunol.* 2003, **21**:335-376.
20. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL: **Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce**

- epithelial proinflammatory gene expression.** *J.Immunol.* 2001, **167**:1882-1885.
21. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, Si-Tahar M: **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* 2004, **279**:2712-8.
22. Guillot L, Le GR, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M: **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.* 2005, **280**:5571-5580.
23. Chuang TH, Lee J, Kline L, Mathison JC, Ulevitch RJ: **Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling.** *J Leukoc Biol* 2002, **71**:538-44.
24. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H: **Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.** *Eur J Immunol* 2002, **32**:1958-68.
25. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT: **TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.** *Nat Immunol* 2004, **5**:190-8.
26. Takeda K, Akira S: **TLR signaling pathways.** *Semin Immunol* 2004, **16**:3-9.
27. Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA: **Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6.** *Oncogene* 1990, **5**:1095-1097.
28. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H: **Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6.** *J Exp Med* 2000, **192**:595-600.

29. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: **Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin.** *Immunity.* 1999, **11**:115-122.
30. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S: **Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades.** *Int.Immunol.* 2000, **12**:113-117.
31. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S: **Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection.** *J.Immunol.* 2000, **165**:5392-5396.
32. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A: **The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.** *Nature* 2001, **410**:1099-103.
33. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: **Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.** *Nat Immunol* 2002, **3**:196-200.
34. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S: **Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4.** *Nature* 2002, **420**:324-9.
35. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S: **Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes.** *J.Immunol.* 2001, **167**:5887-5894.
36. Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X: **Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, **101**:3533-3538.
37. Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB: **Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:15652-15661.

38. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S: **Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.** *Science* 2003, **301**:640-643.
39. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S: **Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.** *Science* 2003, **301**:640-3.
40. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B: **Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling.** *Nature* 2003, **424**:743-748.
41. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S: **TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway.** *Nat.Immunol.* 2003, **4**:1144-1150.
42. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T: **TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:49751-49762.
43. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP: **Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists.** *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2004, **31**:358-364.
44. Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismuller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH, Modlin RL: **Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2.** *J.Immunol.* 2003, **171**:6820-6826.
45. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R: **Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells.** *J.Immunol.* 2004, **173**:1219-1223.

46. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A: **Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5.** *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2004, **30**:627-634.
47. Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Carter AB, Gudmundsson G, Hunninghake GW: **Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:53035-53044.
48. Zasloff M: **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** *Nature* 2002, **415**:389-95.
49. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A: **Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides.** *Biopolymers* 2000, **55**:4-30.
50. Huttner KM, Bevins CL: **Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense.** *Pediatr Res* 1999, **45**:785-94.
51. Lehrer RI, Ganz T: **Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**:23-7.
52. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ: **Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense 1.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:181-215.
53. van 't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV: **Antimicrobial peptides: properties and applicability.** *Biol Chem* 2001, **382**:597-619.
54. Hancock RE: **Peptide antibiotics.** *Lancet* 1997, **349**:418-22.
55. Andreu D, Rivas L: **Animal antimicrobial peptides: an overview.** *Biopolymers* 1998, **47**:415-33.
56. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM: **The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:9541-6.

57. McCray PJ, Bentley L: **Human airway epithelia express a beta-defensin.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, **16**:343-349.
58. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman, Banfa V, Zasloff M, Wilson J: **Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.** *J Clin Invest* 1998, **102**:874-880.
59. Bals R, Hiemstra PS: **Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens.** *Eur.Respir.J.* 2004, **23**:327-333.
60. Lehrer R, Ganz T, Selsted M: **Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells.** *Cell* 1991, **64**:229-230.
61. Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T: **A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23.** *Gene* 1999, **233**:205-11.
62. Meister M, Lemaitre B, Hoffmann JA: **Antimicrobial peptide defense in Drosophila.** *Bioessays* 1997, **19**:1019-26.
63. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P: **Plant defense peptides.** *Biopolymers* 1998, **47**:479-91.
64. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB, Jr.: **Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:2129-33.
65. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB, Jr.: **Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach.** *Gene* 2001, **263**:211-8.
66. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI: **Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils.** *J Clin Invest* 1985, **76**:1427-35.
67. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI: **Primary structures of three human neutrophil defensins.** *J Clin Invest* 1985, **76**:1436-9.

68. Jones DE, Bevins CL: **Paneth Cells of the Human Small Intestine Express an Antimicrobial Peptide Gene.** *The Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**:23216-23225.
69. Jones DE, Bevins CL: **Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel.** *FEBS* 1993, **315**:187-192.
70. Bensch K, Raida M, Magert H-J, Schulz-Knappe P, Forssmann W-G: **hBD-1: a novel b-defensin from human plasma.** *FEBS Letters* 1995, **368**:331-335.
71. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM: **Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis.** *Cell* 1997, **88**:553-60.
72. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr., Ganz T: **Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues.** *Journal of Clinical Investigation* 1998, **101**:1633-42.
73. Singh P, Jia H, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway B, Greenberg E, Valore E, Welsh M, Ganz T, Tack B, McCray PJ: **Production of beta-defensins by human airway epithelia.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:14961-14966.
74. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, Adermann K, Kluver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R: **Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction.** *Cell Tissue Res* 2001, **306**:257-64.
75. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM: **Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.** *J Biol Chem* 2001, **276**:5707-13.
76. Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG: **Human beta-**

- defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity.** *FASEB J* 2001, **15**:1819-21.
77. Zaballos A, Villares R, Albar JP, Martinez A, Marquez G: **Identification on mouse chromosome 8 of new beta-defensin genes with regionally specific expression in the male reproductive organ.** *J.Biol.Chem.*2004.Mar.26.;279.(13):12421.-6.Epub.2004.Jan.12. 2004, **279**:12421-12426.
78. Yenugu S, Hamil KG, Radhakrishnan Y, French FS, Hall SH: **The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin.** *Endocrinology* 2004.Jul.;145.(7.):3165.-73.Epub.2004.Mar. 2004, **145**:3165-3173.
79. Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, Jr., Tack BF, Vogel HJ: **The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus.** *J.Biol.Chem.*2002.Mar.8.;277.(10):8279.-89.Epub.2001.Dec.11. 2002, **277**:8279-8289.
80. Bauer F, Schweimer K, Kluver E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Rosch P, Adermann K, Sticht H: **Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity.** *Protein Sci.*2001.Dec.;10(12.):2470.-9. 2001, **10**:2470-2479.
81. Tang Y-Q, Yaun J, Osapay G, Osapay C, Tran D, Miller C, Quелlette A, Selsted M: **A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins.** *Science* 1999, **286**:498-502.
82. Leonova L, Kokryakov VN, Aleshina G, Hong T, Nguyen T, Zhao C, Waring AJ, Lehrer RI: **Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity.** *J Leukoc Biol* 2001, **70**:461-4.

83. Nguyen TX, Cole AM, Lehrer RI: **Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth.** *Peptides* 2003, **24**:1647-1654.
84. Munk C, Wei G, Yang OO, Waring AJ, Wang W, Hong T, Lehrer RI, Landau NR, Cole AM: **The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry.** *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 2003.Oct.;19.(10):875.-81. 2003, **19**:875-881.
85. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL: **Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence.** *J Invest Dermatol* 2003, **120**:810-6.
86. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D: **Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain.** *FEBS Letters* 1995, **374**:1-5.
87. Lehrer RI, Ganz T: **Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides.** *Curr Opin Hematol* 2002, **9**:18-22.
88. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R: **The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes.** *Eur J Biochem* 1996, **238**:325-32.
89. Cowland J, Johnsen A, Borregaard N: **hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules.** *FEBS Letters* 1995, **368**:173-6.
90. Larrick J, Hirata M, Balint R, Lee J, Zhong J, Wright S: **Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein.** *Infect Immun* 1995, **63**:1291-1297.
91. Agerberth B, Grunewald J, Castanos-Velez E, Olsson B, Jornvall H, Wigzell H, Eklund A, Gudmundsson GH: **Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **160**:283-90.
92. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N: **Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the**

- antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3.** *Blood* 2001, **97**:3951-9.
93. Sorensen OE, Gram L, Johnsen AH, Andersson E, Bangsboll S, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Malm J, Egesten A, Borregaard N: **Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin - a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina.** *J Biol Chem* 2003, **20**:20.
94. Wang Y, Agerberth B, Lothgren A, Almstedt A, Johansson J: **Apolipoprotein A-I binds and inhibits the human antibacterial/cytotoxic peptide LL-37.** *J Biol Chem* 1998, **273**:33115-8.
95. Wang Y, Johansson J, Agerberth B, Jornvall H, Griffiths WJ: **The antimicrobial peptide LL-37 binds to the human plasma protein apolipoprotein A-I**
2. Rapid Commun Mass Spectrom 2004, **18**:588-9.
96. Krensky AM: **Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells.** *Biochem Pharmacol* 2000, **59**:317-20.
97. Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C: **Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands.** *Nat Immunol* 2001, **2**:1133-7.
98. Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder JM: **Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection.** *Nat.Immunol.* 2005, **6**:57-64.
99. Bals R, Griese M: **Kleinmolekulare antimikrobielle Substanzen der Atemwegsfluessigkeit.** In *Mukoviszidose*. Edited by Reinhardt D, Goetz M, Kraemer R, Schoeni M. Heidelberg: Springer; 1999:in press.
100. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF: **Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.** *J Immunol* 1999, **163**:6718-24.

101. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I: **NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation.** *J Leukoc Biol* 2002, **71**:154-62.
102. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA: **Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family.** *J Immunol* 2002, **168**:316-24.
103. Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y: **Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by Salmonella enteritidis flagella filament structural protein.** *FEBS Lett* 2001, **508**:484-8.
104. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM: **Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia.** *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2000, **22**:714-721.
105. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH: **CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium.** *J.Biol.Chem.* 2000, **275**:29731-29736.
106. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla AR, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R: **Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells.** *J Immunol* 2004, in press.
107. Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R: **IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways.** *J.Immunol.* 2004, **173**:3482-3491.
108. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I: **Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production.** *J Immunol* 2003, **170**:4226-36.

109. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM: **Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, **22**:714-21.
110. Birchler T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, Aguzzi A, Lauener RP: **Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein.** *Eur J Immunol* 2001, **31**:3131-7.
111. Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Kwon YK, Shin SW, Kim SC, Jung TY, Kwon TK, Cho JW, Baek WK, Kim SP, Suh MH, Suh SI: **Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004, **320**:1026-1033.
112. Wang X, Zhang Z, Louboutin JP, Moser C, Weiner DJ, Wilson JM: **Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2.** *FASEB J.* 2003, **17**:1727-1729.
113. Lu Z, Kim KA, Suico MA, Shuto T, Li JD, Kai H: **MEF up-regulates human beta-defensin 2 expression in epithelial cells.** *FEBS Lett.*2004.Mar.12.;561.(1-3):117.-21. 2004, **561**:117-121.
114. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von MB, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schroder JM, Stange EF: **NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium.** *Infect.Immun.* 2004, **72**:5750-5758.
115. Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y: **Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad).** *Respirology.*2002.Dec.;7.(4):305.-10. 2002, **7**:305-310.

116. Griffin S, Taggart CC, Greene CM, O'Neill S, McElvaney NG: **Neutrophil elastase up-regulates human beta-defensin-2 expression in human bronchial epithelial cells.** *FEBS Lett* 2003, **546**:233-6.
117. Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY: **Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes.** *J Immunol* 2003, **171**:3262-9.
118. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY: **Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis.** *N Engl J Med* 2002, **347**:1151-60.
119. John M, Au BT, Jose PJ, Lim S, Saunders M, Barnes PJ, Mitchell JA, Belvisi MG, Chung KF: **Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids.** *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1998, **18**:84-90.
120. Fujisawa T, Kato Y, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, Kamiya H, Yamada H, Nakajima T, Miyamasu M, Hirai K: **Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines.** *J.Allergy Clin.Immunol.* 2000, **105**:126-133.
121. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G: **Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator.** *Nat Med* 2001, **7**:180-5.
122. Weiner DJ, Bucki R, Janmey PA: **The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **28**:738-45.
123. Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, Jr., O'Neill S, McElvaney NG: **Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins.** *J Immunol* 2003, **171**:931-7.

124. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L: **Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37.** *Mol Microbiol* 2002, **46**:157-68.
125. Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE: **Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin.** *J Biol Chem* 1996, **271**:19298-303.
126. Sokolov Y, Mirzabekov T, Martin DW, Lehrer RI, Kagan BL: **Membrane channel formation by antimicrobial protegrins.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1420**:23-9.
127. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC: **Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense.** *Science* 1999, **286**:113-7.
128. Moser C, Weiner DJ, Lysenko E, Bals R, Weiser JN, Wilson JM: **beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice.** *Infect Immun* 2002, **70**:3068-72.
129. Morrison G, Kilanowski F, Davidson D, Dorin J: **Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model.** *Infect Immun* 2002, **70**:3053-60.
130. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL: **Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection.** *Nature* 2001, **414**:454-7.
131. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL: **Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide.** *J Immunol* 2003, **170**:2274-8.
132. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM: **Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model.** *J Clin Invest* 1999, **103**:1113-7.

133. Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL: **Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin.** *Nature* 2003, **422**:522-6.
134. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN: **Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract.** *Infect Immun* 2000, **68**:1664-1671.
135. Staubitz P, Neumann H, Schneider T, Wiedemann I, Peschel A: **MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance** 6. *FEMS Microbiol Lett* 2004, **231**:67-71.
136. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A: **Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism** 8. *J Immunol* 2004, **172**:1169-76.
137. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, Miller SI: **Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa.** *Science* 1999, **286**:1561-5.
138. Soong LB, Ganz T, Ellison A, Caughey GH: **Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum.** *Inflamm Res* 1997, **46**:98-102.
139. Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T: **Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis.** *J Lab Clin Med* 1993, **122**:202-7.
140. van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, van Sterkenburg MA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS: **Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells.** *American Journal of Physiology* 1997, **272**:888-96.
141. van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Dijkman JH, Hiemstra PS: **Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells:**

- modulation of cytotoxicity and IL-8 production.** *Journal of Leukocyte Biology* 1997, **62**:217-26.
142. Panyutich AV, Hiemstra PS, van Wetering S, Ganz T: **Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, **12**:351-7.
143. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW: **Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens.** *J Immunol* 2001, **167**:6644-53.
144. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW: **Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2.** *Science* 2002, **298**:1025-9.
145. Yang D, Chertov O, Bykovskaia S, Chen Q, Buffo M, Shogan J, Anderson M, Schroder J, Wang J, Howard O, Oppenheim J: **beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.** *Science* 1999, **286**:525-528.
146. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I: **Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway.** *Int.Immunol.*2002.Apr;14(4):421.-6. 2002, **14**:421-426.
147. Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ: **Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils.** *J Biol Chem* 1996, **271**:2935-40.
148. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ: **Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells.** *J Leukoc Biol* 2000, **68**:9-14.

149. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O: **LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T-cells.** *J Exp Med* 2000, **192**:1069-74.
150. Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE: **The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes.** *J Immunol* 2004, **172**:3758-65.
151. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I: **Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells.** *Eur J Immunol* 2001, **31**:1066-75.
152. Elssner A, Duncan M, Gavrillin M, Wewers MD: **A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release.** *J.Immunol.* 2004, **172**:4987-4994.
153. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE, Speert DP: **The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization**
10. *J Immunol* 2004, **172**:1146-56.
154. Aarbiou J, Ertmann M, van WS, van NP, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI, Hiemstra PS: **Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro.** *J.Leukoc.Biol.* 2002, **72**:167-174.
155. Aarbiou J, Verhoosel RM, van Wetering S, de Boer WI, van Krieken JH, Litvinov SV, Rabe KF, Hiemstra PS: **Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **18**:18.
156. Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sorensen OE, Borregaard N, Rabe KF, Hiemstra PS: **The antimicrobial peptide LL-37 activates innate**

- immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor.** *J.Immunol.* 2003, **171**:6690-6696.
157. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, Stahle-Backdahl M: **The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium.** *J Invest Dermatol* 2003, **120**:379-89.
158. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R: **An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18.** *J Clin Invest* 2003, **111**:1665-72.
159. Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM: **Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity.** *J Immunol* 2001, **167**:623-7.
160. Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W, Lubkowski J: **The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins.** *J.Biol.Chem.*2002.Oct.4;277.(40.):37647.-54.Epub.2002.Jul.30. 2002, **277**:37647-37654.
161. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ: **Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity.** *J Leukoc Biol* 2003, **74**:448-55.
162. Kadioglu A, Andrew PW: **The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story.** *Trends Immunol.* 2004, **25**:143-149.
163. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT: **Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003, **100**:1966-1971.

164. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsukura S: **Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **249**:943-7.
165. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R: **Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:992-995.
166. Ashitani J, Mukae H, Nakazato M, Taniguchi H, Ogawa K, Kohno S, Matsukura S: **Elevated pleural fluid levels of defensins in patients with empyema.** *Chest* 1998, **113**:788-94.
167. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S: **Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis.** *Chest* 2002, **121**:519-26.
168. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S: **Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with Mycobacterium avium-intracellulare infection.** *Chest* 2001, **119**:1131-7.
169. Davis PB, Drumm M, Konstan MW: **Cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**:1229-1256.
170. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Accurso F, Wilson JM: **Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid.** *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.* 2001, **25**:21-25.
171. Yanagihara K, Kadoto J, Kohno S: **Diffuse panbronchiolitis--pathophysiology and treatment mechanisms.** *Int J Antimicrob Agents* 2001, **18**:83-7.
172. Ashitani J, Mukae H, Nakazato M, Ihi T, Mashimoto H, Kadota J, Kohno S, Matsukura S: **Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis.** *Eur Respir J* 1998, **11**:104-11.

173. Hiratsuka T, Mukae H, Iiboshi H, Ashitani J, Nabeshima K, Minematsu T, Chino N, Ihi T, Kohno S, Nakazato M: **Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis.** *Thorax* 2003, **58**:425-30.
174. Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, Keicho N: **Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **291**:17-22.
175. Hogg JC: **Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet* 2004, **364**:709-721.
176. Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS: **Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary.** *Respir Care* 2001, **46**:798-825.
177. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD: **The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.** *N.Engl.J.Med.* 2004, **350**:2645-2653.
178. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M: **Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **158**:1277-85.
179. Pryor WA, Stone K: **Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1993, **686**:12-27.
180. Rahman I, MacNee W: **Role of transcription factors in inflammatory lung diseases.** *Thorax* 1998, **53**:601-612.
181. Richter A, O'Donnell RA, Powell RM, Sanders MW, Holgate ST, Djukanovic R, Davies DE: **Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor**

- mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **27**:85-90.
182. Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS: **Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells.** *Respir Res* 2002, **3**:22.
183. Masubuchi T, Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Kubo K, Sekiguchi M, Nagai S, Izumi T: **Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity.** *Am J Pathol* 1998, **153**:1903-12.
184. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI: **Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells.** *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1997, **155**:1770-1776.
185. Rusznak C, Sapsford RJ, Devalia JL, Shah SS, Hewitt EL, Lamont AG, Davies RJ, Lozewicz S: **Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells.** *Clin.Exp.Allergy* 2001, **31**:226-238.
186. Kashyap R, Floreani AA, Heires AJ, Sanderson SD, Wyatt TA: **Protein kinase C-alpha mediates cigarette smoke extract- and complement factor 5a-stimulated interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells.** *J Investig Med* 2002, **50**:46-53.
187. Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross JV, Hejal R, Templeton D, Rich EA, Toossi Z: **Differential activation of MAP kinase signaling pathways and nuclear factor-kappaB in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers.** *Mol Med* 2001, **7**:177-85.
188. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB: **Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2.** *Carcinogenesis* 2002, **23**:1511-8.

189. Wang RD, Tai H, Xie C, Wang X, Wright JL, Churg A: **Cigarette smoke produces airway wall remodeling in rat tracheal explants.** *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2003, **168**:1232-1236.
190. Wang H, Liu X, Umino T, Skold CM, Zhu Y, Kohyama T, Spurzem JR, Romberger DJ, Rennard SI: **Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, **25**:772-9.
191. Rusznak C, Sapsford RJ, Devalia JL, Justin John R, Hewitt EL, Lamont AG, Wood AJ, Shah SS, Davies RJ, Lozewicz S: **Cigarette smoke potentiates house dust mite allergen-induced increase in the permeability of human bronchial epithelial cells in vitro.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, **20**:1238-50.
192. Merten MD, Kammouni W, Renaud W, Birg F, Mattei MG, Figarella C: **A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **15**:520-8.
193. Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, Chinet T: **Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells.** *J.Cyst.Fibros.* 2004, **3 Suppl 2**:49-51.
194. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM: **Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.** *J.Clin.Invest* 1998, **102**:874-880.
195. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: **Real time quantitative PCR.** *Genome Res* 1996, **6**:986-94.
196. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
197. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van HA, Prince A: **Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells.** *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2004, **30**:777-783.

198. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF: **Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6.** *J.Immunol.* 1994, **153**:153-164.
199. Mercer BA, Kolesnikova N, Sonett J, D'Armiento J: **Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:17690-17696.
200. Wyatt TA, Heires AJ, Sanderson SD, Floreani AA: **Protein kinase C activation is required for cigarette smoke-enhanced C5a-mediated release of interleukin-8 in human bronchial epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, **21**:283-8.
201. Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W, Marwick JA, Kirkham P, Mac NW, Jimenez LA: **Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles**
Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases
Cigarette smoke-induced oxidative stress and TGF-beta1 increase p21waf1/cip1 expression in alveolar epithelial cells
Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **284**:533-40.
202. Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, MacNee W: **Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation.** *Mol Cell Biochem* 2002, **234-235**:239-48.
203. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB: **Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:24233-24241.

204. Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA: **H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells.** *J.Biol.Chem.* 1998, **273**:32670-32678.
205. Sethi S: **Bacterial infection and the pathogenesis of COPD.** *Chest* 2000, **117**:286S-91S.
206. Wilson R, Wilson CB: **Defining subsets of patients with chronic bronchitis.** *Chest* 1997, **112**:303S-309S.
207. Hogg JC: **Chronic obstructive pulmonary disease: an overview of pathology and pathogenesis.** *Novartis.Found.Symp.* 2001, **234**:4-19.
208. Drannik AG, Pouladi MA, Robbins CS, Goncharova SI, Kianpour S, Stampfli MR: **Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after Pseudomonas aeruginosa infection.** *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2004, **170**:1164-1171.
209. van d, V, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH: **Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review.** *Thorax* 2004, **59**:713-721.
210. Wills-Karp M: **Interleukin-13 in asthma pathogenesis.** *Immunol.Rev.* 2004, **202**:175-190.
211. Mazzeo G, Bianco A, Catena E, De PR, Abbate GF: **Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma.** *Allergy* 2000, **55 Suppl 61**:6-9.
212. Martin RJ, Kraft M, Chu HW, Berns EA, Cassell GH: **A link between chronic asthma and chronic infection.** *J.Allergy Clin.Immunol.* 2001, **107**:595-601.
213. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N: **The immune response to chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type.** *APMIS* 2000, **108**:329-335.
214. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Hoiby N: **Chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection is more severe in Th2**

responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice.
APMIS 1997, **105**:838-842.

Publikationen und Präsentationen

Beisswenger C, Bals R: Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 2004, in press

Bals R, **Beisswenger C**, Blouquit S, Chinet T: Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *J Cyst Fibros.* 2004 Aug;3 Suppl 2:49-51.

Beisswenger C, Platz J, Seifart C, Vogelmeier C and Bals R: Exposure of Differentiated Airway Epithelial Cells to Volatile Smoke in vitro. *Respiration* 2004;71:402-409

Beißwenger, C. and Bals, R. 2004. Lung. In: *Antimicrobial Peptides and Man.* Ed.: R. Gallo; Horizon Scientific Press, Norfolk, in press.

Platz J, **Beisswenger C**, Dalpke A, Koczulla A, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R: Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 2004;

Pinkenburg O, Platz J, **Beiswenger C**, Vogelmeier C, Bals R: Inhibition of NF- κ B mediated by siRNA expressed by recombinant adeno-associated virus. *J. Virol. Methods* 2004; 120: 119-122

C. Beisswenger, J. Platz, R. Koczulla, C. Seifart, C. Vogelmeier, R. Bals : Cigarette smoke exposure alters the inflammatory reaction of airway epithelium. Annual Congress of the European Respiratory Society, Wien 2003, Österreich. *Eur Respir J* 2003; 22: Suppl. 45, 561s

C. Beisswenger, J. Platz, R. Bals: Inhibitory effects of Th2 cytokines on beta-defensin expression of human bronchial epithelial cells. 2004 North American CF Conference, St. Louis, USA

C. Beisswenger, K. Kändler, R. Bals: Th2 Cytokine haben einen inhibitorischen Effekt auf die beta-Defensin Expression in humanen bronchialen Epithelzellen. Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2004, Marburg, Deutschland

C. Beisswenger, S. Anders, K. Schröppel and R. Bals: *Aspergillus fumigatus* conidia induce internalization dependent IFN-beta and IP-10 expression in airway epithelial cells. Annual Congress of the European Respiratory Society, Kopenhagen 2005, Dänemark

C. Beisswenger, K. Felgentreff, K. Kändler, T. Welte and R. Bals.: Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. In Preparation.

C. Beisswenger, D. Stanze, J. Behr, and R. Bals: Airway epithelial cells specifically detect unswollen *Aspergillus* conidia. In preparation

K. Felgentreff, **C. Beisswenger**, U. Baur, M. Griese, and R. Bals: Mucosal antimicrobial peptides accumulate in airway mucins. In preparation

C. Beisswenger, K. Kändler, K. Felgentreff, Hohlfeld, M. Wegmann, H. Garn, C. Vogelmeier, H. Renz, and R. Bals: The allergic airway inflammation inhibits antibacterial host defense. In preparation

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Marburg:

Bals

Batschauer

Bölker

Gemsa

Galland

Fehrenbach

Kindl

Klein

Löffler

Maier

Müller

Röhm

Renz

Vogelmeier

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. Dr. Robert Bals für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die Bereitstellung des Themas und die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Bei Herrn Prof. Vogelmeier möchte ich mich für die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn bedanken.

Meinen Kollegen, die mir über drei Jahre mit Rat und Tat zur Seite standen, danke ich für die gute und produktive Zusammenarbeit.

Ich danke meiner Familie, die mich während der gesamten Ausbildung unterstützte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Modulation der angeborenen Immunität der Lunge durch Umwelteinflüsse und allergische Entzündung“ im Klinikum der Philipps-Universität, Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie unter der Leitung von Herrn PD Dr. Dr. R. Bals mit der Unterstützung durch die unten genannten Personen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in *Respiration* und in *Current Protein and Peptide Science* veröffentlicht.

Eine Unterstützung der Arbeit fand durch folgende Personen statt:

PD Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas und fortwährende Betreuung

PD Dr. Alexander Dalpke und Anja Mayer: Unterstützung bei der Stimulation von Atemwegsepithel mit Pathogenen

Dr. Juliane Platz: Etablierung der Sense-/Antisensetechnologie

Prof. Harald Renz, Dr. Holger Garn und Michael Wegmann: Verfügungstellung des murinen Asthma-Modells

Kerstin Kändler: Etablierung des murinen Infektionsmodells

Kerstin Felgentreff: Unterstützung bei der Messung antimikrobieller Peptide

Thomas Damm: technische Unterstützung

Annette Püchner: technische Unterstützung

Marburg, Mai 2005