

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

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

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

**Systematische Analyse von Rezeptoren und**  
**Effektormechanismen der pulmonalen**  
**angeborenen Immunität**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin  
dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Daniel Stanze  
aus Hildesheim

Marburg, 2009

Angenommen im Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 23.07.2009

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Korreferent: Prof. Dr. D. Gemsa

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1. Angeborene Immunität der Lunge und ihre Funktion in der Abwehr von Infektionen .....	5
1.2. Toll-like Rezeptoren .....	6
1.2.1. <i>Expression und Funktion der TLR im Atemwegsepithel</i> .....	7
1.2.2. <i>Struktur und Funktion der TLR/IL-1 Rezeptorfamilie</i> .....	8
1.2.3. <i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i> .....	9
1.2.4. <i>MyD88 abhängiger Signalweg</i> .....	11
1.2.5. <i>MyD88 unabhängiger Signalweg</i> .....	12
1.3. Antimikrobielle Peptide in Epithelien .....	13
1.3.1. <i>Cathelizidine</i> .....	14
1.3.2. <i>Defensine</i> .....	15
1.3.3. <i>Psoriasin</i> .....	17
1.3.4. <i>Dermcidin</i> .....	18
1.3.5. <i>Weitere antimikrobielle Peptide</i> .....	19
1.3.6. <i>Regulation der antimikrobiellen Peptide</i> .....	20
1.3.7. <i>Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide</i> .....	21
1.4. Zelllinien des Atemwegsepithels .....	22
1.5. Fragestellung .....	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1. Zelllinien, Zellkulturmedien, Bakterien und Reagenzien .....	24
2.2. Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel und air liquid interface Kulturen .....	25
2.3. Stimulationsexperimente .....	25
2.3.1. <i>Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien</i> .....	25

2.3.2. Stimulation mit TLR-Liganden .....	26
2.4. Isolation von RNA und RT-PCR (real time PCR) .....	26
2.5. ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) .....	27
2.6. Statistische Analyse .....	28
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
3.1. TLR werden in verschiedenen Zelllinien des Atemwegsepithels exprimiert..	29
3.2. TLR Liganden stimulieren primäre Atemwegsepithelzellen.....	36
3.3. Endothelzellen exprimieren TLR .....	37
3.4. TLR Liganden stimulieren HUVEC Endothelzellen.....	38
3.5. Antimikrobielle Peptide werden im Atemwegsepithel exprimiert.....	40
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
Unterschiedliche Zelllinien des Atemwegsepithels exprimieren Toll-like Rezeptoren.....	48
Endothelzellen exprimieren Toll-like Rezeptoren und werden durch TLR Liganden aktiviert.....	50
Atemwegsepithelzellen exprimieren Psoriasin.....	52
Schlussbemerkung .....	56
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>57</b>
<b>LITERATUR.....</b>	<b>59</b>

# 1. Einleitung

## **1.1. Angeborene Immunität der Lunge und ihre Funktion in der Abwehr von Infektionen**

Als physikalische und immunologische Barriere für Pathogene und Keime aus der Atemluft erfüllt das Atemwegsepithel eine wichtige Rolle. Es schützt den Respirationstrakt durch ein pleomorphes Abwehrsystem [11], zum einen durch seine Ausstattung mit Zilien, zum anderen durch die spezifischen Funktionen des Epithels und der Zellen des Immunsystems. Gelangen Bakterien in das Atemwegslumen, so werden neben den klassischen Abwehrzellen auch Alveolarzellen und Atemwegsepithelzellen aktiviert, welche jeweils ihren Teil zur Immunantwort beitragen. In der Lunge sind verschiedene Zelltypen der adaptiven und angeborenen Immunantwort beschrieben, wie z.B. natürliche Killerzellen, Mastzellen, Alveolar-Makrophagen, Eosinophile, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und dendritische Zellen [9; 157]. In den Atemwegen werden Sekrete gebildet, die eine Schutzfunktion für das Atemwegsepithel ausüben. Zum einen verhindern sie als eine Art Barriere den direkten Kontakt zwischen Erregern und Atemwegsepithel, zum anderen haben sie aufgrund ihrer Zusammensetzung eine antimikrobielle Wirksamkeit [95]. Das Atemwegssekret enthält viele lösliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise verschiedene Proteine und antimikrobielle Peptide (AMP). Lactoferrin, Lysozym, Defensine und sekretorische Phospholipase A zum Beispiel haben antimikrobielle Aktivität und sind klassische Bestandteile des Atemwegssekrets, die gemeinsam mit anderen Faktoren, wie zum Beispiel dem Komplementsystem, Antiproteasen, Surfactantproteine, Clarazellproteine und Proteine der PLUNC Familie (palate, lung, and nasal epithelium clone) zur Abwehr von Keimen beitragen [13; 20; 42]. Krankheitserreger, die diesem ersten passiven Abwehrmechanismus entgangen sind, werden durch Zellen der angeborenen Immunantwort in der Lunge daran gehindert, sich festzusetzen und zu vermehren. In erster Linie sind dies neutrophile

Granulozyten und Makrophagen [33]. Letztere werden in der Lunge als Alveolarmakrophagen bezeichnet und ihre Hauptaufgabe ist es, die vorhandenen Keime zu phagozytieren. Die phagozytierten Krankheitserreger werden mit Hilfe reaktiver Sauerstoffspezies (RSS), Proteasen und AMP abgetötet. Der Kontakt mit den Mikroorganismen veranlasst die Makrophagen zur Abgabe verschiedener Zytokine wie zum Beispiel IL-8, IFN- $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , die einen großen Einfluss auf die Reaktion der Epithelzellen haben [44]. Aufgrund dieser chemotaktischen Reize kommt es zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das entzündete Gewebe, welche ebenfalls in der Lage sind, vorhandene Erreger zu phagozytieren und abzutöten. Darüber hinaus haben sie auch die Fähigkeit, große Mengen an antimikrobiellen Peptiden abzugeben und ein antimikrobielles Milieu zu schaffen [30], wodurch eine hohe lokale antibakterielle Aktivität entsteht. Die Zellen des Immunsystems sind mit verschiedenen Rezeptorsystemen ausgestattet, die es ihnen ermöglichen, Mikroorganismen zu erkennen und aufzunehmen. Zu den wichtigsten Rezeptoren gehören die Toll-like und die NOD Rezeptoren.

## **1.2. Toll-like Rezeptoren**

Über die Funktion der Toll Rezeptoren in der angeborenen Immunität wurde zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* berichtet [18]. Die Entdeckung hatte ihren Ursprung infolge der Identifizierung eines Rezeptors, dem man eine bedeutende Rolle bei der embryonalen Entwicklung zuschrieb und als Toll bezeichnete. Später wurde erkannt, dass Toll auch an der gegen Pilz- und Bakterieninfektionen gerichteten angeborenen Immunantwort von Insekten beteiligt ist [94]. Nach der Entdeckung der Bedeutung von *Drosophila* Toll in der Abwehrreaktion gegen Pilzinfektionen und Bakterien wurde das homologe Protein in Säugern identifiziert und erhielt so die Bezeichnung Toll-like Rezeptor (TLR) [101]. Das angeborene Immunsystem wurde lange Zeit als ein relativ unspezifisches System betrachtet, dessen primäre Aufgabe es zu sein schien, Mikroorganismen abzutöten und die Aktivität der adaptiven Immunantwort zu modulieren [3]. In den letzten Jahren hat sich allerdings

gezeigt, dass die angeborene Immunität weitaus spezifischer ist als bisher angenommen. Es ist ihr möglich, zwischen körpereigenen Bestandteilen und Pathogenen zu unterscheiden. Diese Fähigkeit beruht im Wesentlichen auf einer Familie evolutionär konservierter Rezeptoren, den Toll-like Rezeptoren (TLR). TLR spielen eine entscheidende Rolle in der schnellen Abwehr von Pathogenen. Durch Datenbankrecherche konnten bisher zwölf weitere Rezeptoren identifiziert werden, die aufgrund der homologen Struktur als Toll-like Rezeptoren bezeichnet werden. Bei Menschen konnten bisher allerdings nur zehn Subtypen der TLR funktionell nachgewiesen werden, wohingegen man in Mäusen zwölf verschiedene TLR Proteine gefunden hat [144].

Wie vorher erwähnt, sind neben den TLR auch die zytosolischen NOD Proteine (nucleotide-binding oligomerization domain), NOD 1 und NOD 2, Rezeptoren der angeborenen Immunität. Bei der Erkennung von LPS und Murein im Zytosol spielt NOD 1 eine wichtige Rolle, denn seine Stimulation aktiviert NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen [50; 51]. NOD 2 ist ein Rezeptor für Peptidoglycan und kann ebenfalls den NF- $\kappa$ B abhängigen Signalweg aktivieren [50]. Aktuelle Studien zeigen eine gesteigerte Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 (human  $\beta$ -Defensin-2) sowie weiterer antimikrobieller Peptide in Epithelzellen nach Stimulation mit NOD-Liganden [52; 140].

### **1.2.1. Expression und Funktion der TLR im Atemwegsepithel**

In einigen Zelllinien des Atemwegsepithels konnte die mRNA aller zehn TLR nachgewiesen werden [128]. Einige *in vitro* Studien haben belegt, dass spezifische TLR Liganden und diverse Mikroorganismen das Atemwegsepithel über TLR aktivieren können. Experimente mit TLR4 defizienten murinen Atemwegsepithelzellen zeigten, dass Aktivierung von Atemwegsepithelzellen durch LPS über TLR4 vermittelt wird [59]. Diese Aktivierung der Atemwegsepithelzellen durch LPS verläuft über den MyD88 abhängigen Signalweg (Abb. 1). Eine Aktivierung von TLR2 durch bakterielles Lipopeptid stimuliert die Induktion von humanem  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) in Atemwegsepithelzellen [70]. *Pseudomonas aeruginosa*

Flagellin hingegen aktiviert Atemwegsepithelzellen über TLR2 und TLR5 [1; 128]. An der Immunantwort in Atemwegsepithelzellen auf den Influenza A Virus und doppelsträngige RNA ist TLR3 direkt beteiligt [60]. Diese Aktivierung der Atemwegsepithelzellen durch den Influenza A Virus über TLR3 wird auf dem MyD88 unabhängigen Signalweg mittels TRIF und MAP Kinasen vermittelt (Abb. 1). Eine Aktivierung von TLR bewirkt eine Expression von verschiedenen Effektorproteinen, insbesondere von Zytokinen und Chemokinen wie beispielsweise IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$ . Des Weiteren kommt es zu einer Freisetzung antimikrobieller Peptide wie zum Beispiel hBD-2. Die Signaltransduktion beginnt intrazellulär an der TIR-Domäne der TLR, an welcher unterschiedliche Adapterproteine binden können. Aufgrund der beteiligten Adapterproteine werden zwei Signalwege unterschieden: der MyD88 abhängige und der MyD88 unabhängige Signalweg [145].

Die verschiedenen TLR haben auch unterschiedliche Expressions- und Lokalisationsmuster. Einige TLR sind an der Zellmembran lokalisiert (z.B. TLR 1, TLR 2 und TLR 4) und werden nach ihrer Aktivierung mit ihren Liganden abgeschnürt und zum Phagosom rekrutiert, andere TLR hingegen können auch polarisiert an der Zelloberfläche exprimiert werden. Bei Atemwegsepithelzellen, die ständig einer Vielzahl von Pathogenen aus der Luft ausgesetzt sind, wird eine intrazelluläre Expression von TLR4 und TLR3 beschrieben [59; 60]. TLR5 dagegen wird auf der Zelloberfläche der Atemwegsepithelzellen exprimiert und ist primär basolateral lokalisiert. TLR9 ist bei Makrophagen intrazellulär lokalisiert und bei den HEK293 Zellen an der Zelloberfläche [2; 29]. Der Umfang der Expression und die jeweilige Lokalisation können allerdings variieren. Es ist bekannt, dass TLR5 durch Stimulation mit Flagellin zur apikalen Membran rekrutiert werden kann [114; 134], und eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  kann zu einer erhöhten Expression von TLR2 führen [159].

### **1.2.2. Struktur und Funktion der TLR/IL-1 Rezeptorfamilie**

Toll-like Rezeptoren sind, strukturell gesehen, Transmembran-Proteine, die aufgrund ihrer Homologie in der zytoplasmatischen Region bilden die



TLR eine Superfamilie mit den Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R) bilden. TLR und IL-1R haben eine konservierte zytoplasmatische Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne. In der extrazellulären Region haben TLR allerdings Wiederholungen mit zahlreichen Leucinen (leucine-rich regions, LRR), wohingegen die extrazelluläre Region der IL-1R drei Immunglobulin ähnliche Domänen enthält. 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 (TLR 5), Zymosan (TLR6), Loxoribine (TLR7), einzelsträngige RNA (TLR8) und CpG enthaltende DNA (TLR9) [69; 144; 145].

### **1.2.3. Nuclear Factor- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B spielt eine zentrale Rolle in den verschiedensten Prozessen wie Entzündungen, Immunantwort, Kontrolle der Zellteilung und Apoptose [143]. Die Familie der NF- $\kappa$ B Proteine ist eine Gruppe von eng miteinander verwandten Transkriptionsfaktoren, welche in Säugern aus fünf Proteinen besteht: Rel (c-Rel), Rel A (p65, NF- $\kappa$ B3), Rel B, NF- $\kappa$ B1 (p50) und NF- $\kappa$ B2 (p52). Im unstimulierten Zustand befinden sich diese Proteine im Zytoplasma, wo inhibitorische Proteine (I $\kappa$ B Proteine) ihre Kernlokalisationssequenz maskieren. Stress, mikrobielle Infektionen und Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor) führen zu einer durch Phosphorylierung induzierten Ubiquitinierung der I $\kappa$ B und in der Folge zu einer Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern (Abb. 1). Bindet NF- $\kappa$ B dort an die passende DNA Sequenz, so kommt es zu einer Transkription von verschiedensten Genen, unter anderem von Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-6 und IL-8), Adhäsionsmolekülen, usw. [87; 133; 177]. NF- $\kappa$ B ist in akute und chronische entzündliche Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD involviert [32; 45; 160]. Zigarettenrauch induziert Entzündung im Atemwegsepithel durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [6]. Eine fehlerhafte Regulation von NF- $\kappa$ B liegt vermutlich auch Autoimmunerkrankungen sowie verschiedenen Tumorarten zugrunde und scheint eine Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose zu spielen [14; 67; 71]. Somit sind NF- $\kappa$ B

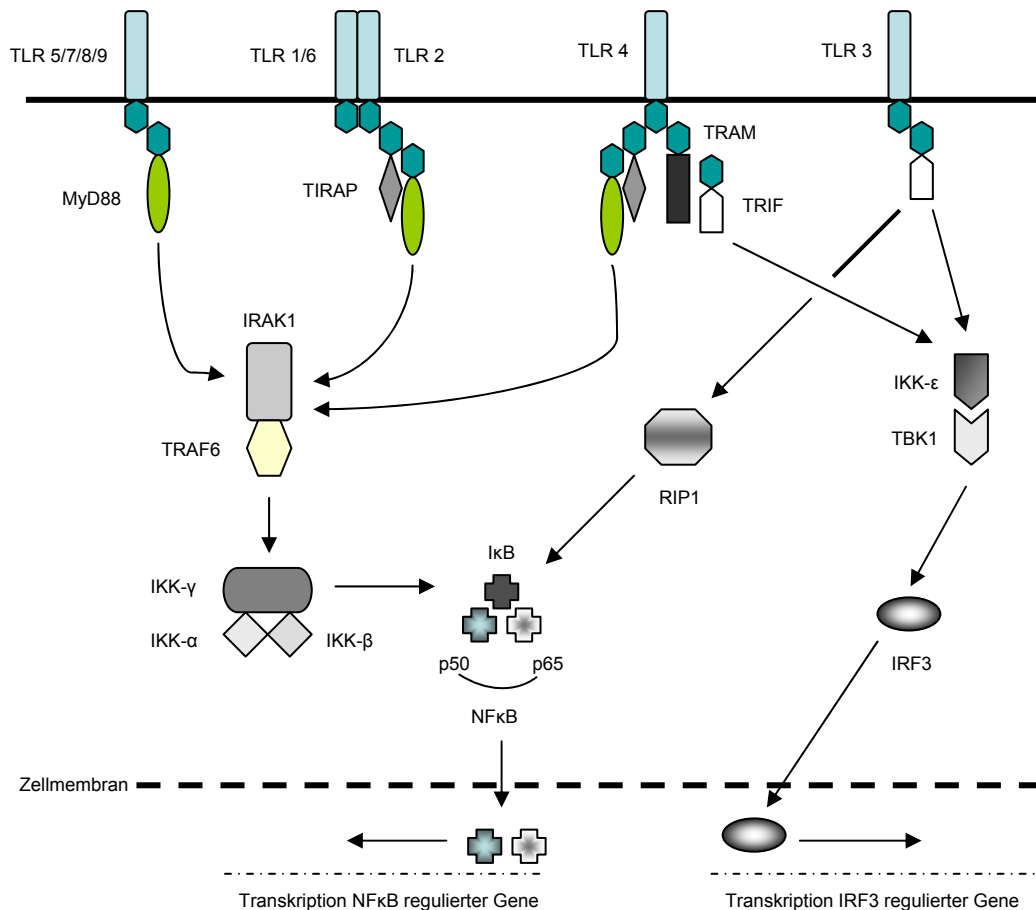
und seine Signalwege in den Mittelpunkt intensiver Forschungen bezüglich neuer Therapieansätze und Arzneimittelentwicklung gerückt [37; 81; 82]. TLR aktivieren über den MyD88 abhängigen und unabhängigen Signalweg NF- $\kappa$ B.

TLR	Ligand(Ursprung)	Spezies	Signalweg
TLR1	Triacyllipopeptide	Bakterien und Mykobakterien	MyD88 abhängig
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide Lipoteichonsäure Peptidoglycan Lipoarabinomannan Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine  Zymosan HSP70	Verschiedene Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien Trypanosoma cruzi Treponema maltophilum Gram-negative Bakterien z.B. Nesseria sp, Shigella sp Pilze Wirt	MyD88 abhängig
TLR3	Doppelsträngige RNA mRNA	Viren Wirt	MyD88 unabhängig
TLR4	LPS HSP60 HSP60 HSP70 Fibrinogen Taxol	Gram-negative Bakterien Chlamydia pneumoniae Wirt Wirt Wirt Pflanzen	MyD88 unabhängig MyD88 abhängig
TLR5	Flagellin	Bakterien	MyD88 abhängig
TLR6	Diacyllipopeptide	Mycoplasma	MyD88 abhängig
TLR7	Imidazoquinoline Loxoribine Bropirimine	Synthetisch Synthetisch 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 [144]. Über eine Aktivierung des MyD88 abhängigen oder MyD88 unabhängigen Signalwegs sind sie in der Lage, die Zellen zu aktivieren und eine Immunantwort zu induzieren.

#### **1.2.4. MyD88 abhängiger Signalweg**

TLR Signalwege werden von intrazytoplasmatischen TIR Domänen aus initiiert. Bis heute wurden vier Adapterproteine für diese Signalwege identifiziert; MyD88, TIRAP, TRAM und TRIF. Das erste bekannte Adapterprotein von TLR war MyD88 (myeloid differentiation marker 88), welches eine TIR Domäne in der C-terminalen Region und eine Death Domäne in der N-terminalen Region aufweist. Stimulation eines TLR oder IL-1R mit einem Liganden (z.B. TLR4 und LPS) führt zur Bindung von MyD88 an die zytoplasmatische Region (Abb. 1). MyD88 und TLR verbinden sich durch ihre TIR Domänen. Nach der Rekrutierung von MyD88 an den TLR interagiert MyD88 über die so genannte Death Domäne mit IRAK-4 (IL-1R-receptor-associated kinase). IRAK-4 seinerseits rekrutiert IRAK-1 zu diesem Komplex, was zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK-1 führt. IRAK-4 und IRAK-1 lösen sich nun vom Rezeptor und interagieren mit TRAF-6 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR) -assoziiertem Faktor 6), wodurch unter anderem der NF- $\kappa$ B Signalweg initiiert wird (Abb. 1). Die Phosphorylierung des IKK Komplexes, welcher aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und NEMO/IKK $\gamma$  besteht induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [26]. Im Fall von TLR2 und TLR4 ist darüber hinaus noch das Adapterprotein TIRAP (auch als MAL bezeichnet), das ebenfalls eine TIR-Domäne hat, an der MyD88 abhängigen Signaltransduktion beteiligt [164; 165]. Bis auf TLR3 scheinen alle TLR den MyD88 abhängigen Weg aktivieren zu können.



**Abbildung 1: Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren (TLR).** Die TLR werden durch Bindung mit einem Liganden aktiviert, was zu einer Dimerisation mit einem der vier Adapterproteine (MyD88, TRAF, TRIF, TIRAP) führt. Das Signal wird über verschiedene Kinasen weitergeleitet und führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die wichtigsten Adaptermoleküle sind MyD88 und TRIF. MyD88 führt zur Transkription NFκB regulierter Gene, TRIF hingegen aktiviert die Transkription IRF-3 regulierter Gene.

### 1.2.5. MyD88 unabhängiger Signalweg

Es wurde festgestellt, dass im Fall von TLR4 die Stimulation mit LPS zu einer zeitverzögerten Aktivierung von NF-κB führt. Die durch LPS hervorgerufene Induktion der IFN-Induzierten Gene wird allerdings nicht beeinflusst oder verzögert [91]. Somit können zwei durch LPS induzierbare Signalwege unterschieden werden: der oben beschriebene MyD88 abhängige Signalweg und der MyD88 unabhängige Signalweg

(Abb.1), welcher mit einer langsamen NF-kB Aktivierung und mit der Aktivierung IFN-Induzierter Gene in Verbindung gebracht wird. Wie bereits erwähnt, ist das MyD88 Adapterprotein in allen TLR Signalwegen enthalten, mit der Ausnahme von TLR3. TLR3 verwendet das Adapterprotein TRIF (TIR domain-containing inducing IFN- $\beta$ ; auch TICAM 1 genannt), welches direkt an den Rezeptor bindet und entscheidend für die Aktivierung von NF-kB und IRF3 (interferon regulatory factor) ist. Im Fall von TLR4 hingegen kann TRIF nur indirekt an den Rezeptor binden und benötigt ein zusätzliches Adapterprotein namens TRAM (Trif-related adapter molecule; auch als TICAM 2 bezeichnet), welches ebenfalls eine TIR-Domäne enthält [181; 123]. Für die Aktivierung von NF-kB scheint TRIF die Kinase RIP1 zu benötigen. [115]. Die TRIF abhängige Aktivierung von TBK-1 (TANK binding kinase-1) führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3, der daraufhin Dimere bildet und in den Zellkern wandert. Dies bewirkt die Transkription von IFN- $\beta$  [182]. Der MyD88 unabhängige Signalweg ist bisher nur für TLR3 und TLR4 beschrieben.

### **1.3. Antimikrobielle Peptide in Epithelien**

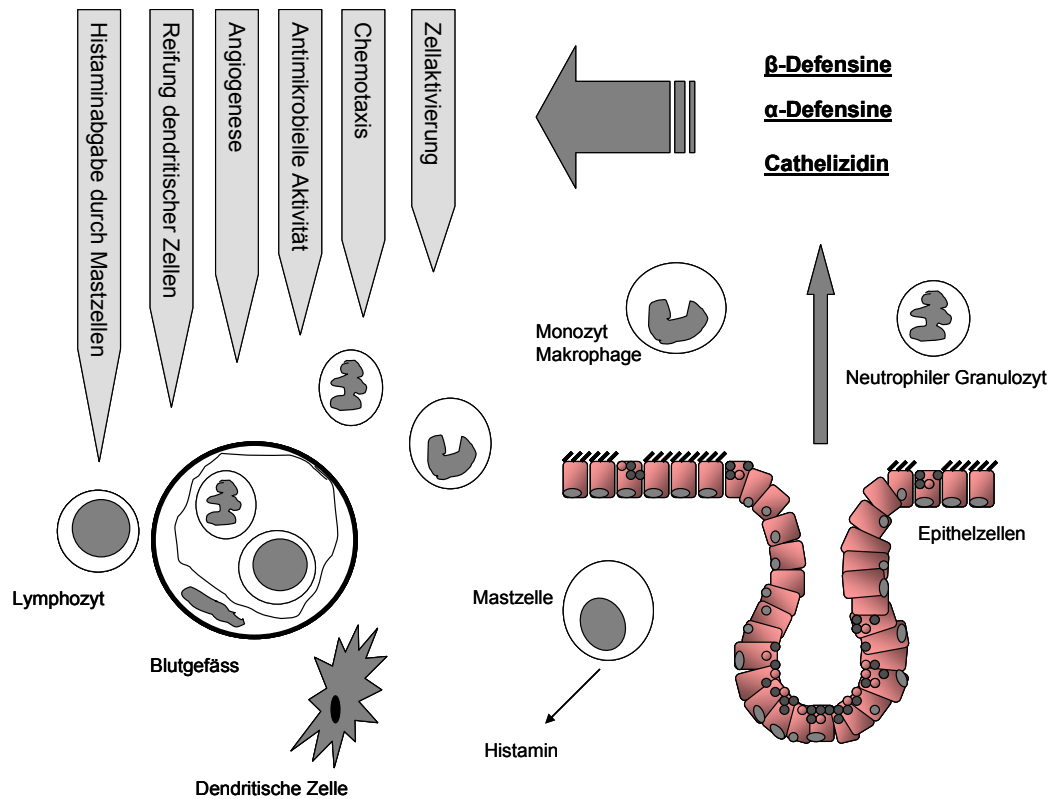
Die Epithelien des Menschen sind permanent verschiedensten Mikroorganismen ausgesetzt. So übernehmen antimikrobielle Peptide vorwiegend in Epithelien der Haut, des Dünndarms, des Urogenitaltrakts, der Niere und der Lunge eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen. Der Ausdruck antimikrobielle Peptide (AMP) steht für Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften, die als Effektor-Moleküle des angeborenen Immunsystems ein breites antimikrobielles Spektrum haben. Es wurden bereits mehr als siebenhundert AMPs isoliert, welche in zwei Gruppen unterteilt werden: jene Peptide, die von Ribosomen synthetisiert werden, und solche Peptide, die nicht von Ribosomen synthetisiert werden [174]. Einerseits wirken AMPs antimikrobiell und können Keime direkt abtöten, andererseits sind AMPs aber auch Entzündungsmediatoren mit einer Vielzahl von Eigenschaften [74; 93; 170]. Somit sind viele AMPs chemotaktisch für Leukozyten [169] und an der Regulation der

Wundheilung [46; 63; 140], der Zellproliferation [107], der Angiogenese und der adaptiven Immunantwort beteiligt [41; 78; 177]. Beim Menschen werden AMPs in erster Linie in der Haut von Keratinozyten, Schweißdrüsen und neutrophilen Granulozyten produziert [22; 47; 98]. Keratinozyten in gesunder Haut sezernieren konstitutiv die AMPs Psoriasin, RNase7, humanes  $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1), SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), Proteaseinhibitor Antileukoprotease (ALP) und sekretorische Phospholipase A2 [27; 115; 157; 158; 176]. Im Respirationstrakt kommen hauptsächlich Defensine und Cathelicidine als AMPs vor. Verschiedene Zelltypen in den Atemwegen sezernieren auch verschiedene Antimikrobielle Peptide wie beispielsweise LL-37/hCAP18, die  $\alpha$ -Defensine HNP1-4 (human neutrophil peptides) und die  $\beta$ -Defensine hBD-1 und hBD-2 (Abb. 3) [7; 8; 11; 100]. AMPs können aufgrund ihrer Größe, Konformation, Struktur und der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren gruppiert werden. Eine allgemein akzeptierte Klassifizierung ist allerdings aufgrund der großen Vielfältigkeit der AMPs schwierig [5; 61; 152].

### **1.3.1. Cathelizidine**

Die Cathelizidine repräsentieren eine weitere Gruppe von antimikrobiellen Peptiden in Säugetieren. Es wurden bisher insgesamt 35 Mitglieder aus unterschiedlichen Säugetieren isoliert, wobei der Mensch nur ein Cathelizidin bildet, das LL-37/hCAP-18. Dieses LL-37/hCAP-18 wurde aus menschlichem Knochenmark isoliert [30; 58; 88]. Die Gemeinsamkeit dieser Cathelizidine liegt zum einen in ihrer hoch konservierten N-terminalen Pro-Region (genannt „Cathelin“ = Cathepsin L Inhibitor), und zum anderen in ihrer wenig konservierten C-terminalen antimikrobiellen Region [173]. Das LL-37/hCAP-18 wird hauptsächlich in Granula von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen intrazellulär gespeichert und kann nach deren Aktivierung prozessiert und anschließend sezerniert werden. Das humane Cathelizidin wird nach Abgabe des Pro-Peptids aus der Zelle durch die Protease 3 gespalten, sodass das antimikrobiell aktive C-terminale Peptid LL-37 entstehen kann [58; 136]. In den Atemwegen

wird das LL-37/hCAP-18 von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen gebildet und in das Atemwegsekret abgegeben [7].



**Abbildung 3: AMP sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems:**

Atemwegsepithelzellen und Immunzellen geben AMPs in die Atemwege ab. Einige AMPs werden konstitutiv exprimiert, wie zum Beispiel LL37/hCAP und das humane  $\beta$ -Defensin hBD-1 von Atemwegsepithelzellen. Die Expression und Abgabe anderer AMPs wie beispielsweise hBD-2 wird hingegen durch Entzündungsmediatoren oder Mikroorganismen induziert. Neben ihrer antimikrobiellen Aktivität haben AMPs zahlreiche weitere Funktionen bei Wundheilung, Angiogenese und der Modulierung der Immunantwort, die teilweise durch spezifische Rezeptoren vermittelt werden.

### 1.3.2. *Defensine*

Beim Menschen sind bislang sechs  $\alpha$ - und vier  $\beta$ -Defensine identifiziert worden, deren Gene auf einem Cluster Chromosom 8p21-23 lokalisiert sind [127]. Auf den Chromosomen 6 und 20 wurden noch weitere Gensequenzen mit dem für  $\beta$ -Defensine typischen Cystein-Motiv identifiziert [116; 120; 127]. Die Defensine der Säugetiere sind

kationische, nicht glykolisierte Peptide mit einer molekularen Größe von 3,5 bis 4,5 kD. Sie sind reich an positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin und enthalten sechs Cysteine, welche drei charakteristische intramolekulare Disulfidbrücken bilden [92]. Defensine können in drei Klassen eingeteilt werden, die sowohl aufgrund ihrer allgemeinen molekularen Struktur als auch der Anordnung ihrer Cysteine und ihrer Disulfidbrücken zustande kommen:  $\alpha$ -Defensin,  $\beta$ -Defensin und  $\theta$ -Defensine (Abb. 2).

$\alpha$ -Defensine haben etwa eine Größe von 29-35 Aminosäuren und weisen eine dreisträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einer  $\beta$ -Haarnadel auf, die kationische Aminosäuren enthält. Man isolierte 1985 das erste menschliche  $\alpha$ -Defensin aus neutrophilen Granulozyten [48]. Beim Menschen wurden bis heute sechs  $\alpha$ -Defensine entdeckt. Die menschlichen neutrophilen Granulozyten Peptide 1 - 4 (HNP1 - 4) sind in den primären Granula der neutrophilen Granulozyten synthetisiert, die in infizierten Gewebestellen akkumulieren. In den neutrophilen Granulozyten machen die  $\alpha$ -Defensine das hauptsächliche Protein aus und tragen maßgeblich zum Sauerstoff unabhängigen Abtöten von phagozytierten Mikroorganismen bei [48; 120]. HNP1 – 4 findet man auch in den Atemwegskreten, wo sie von in den Respirationstrakt eingewanderten neutrophilen Granulozyten abgegeben werden. Zwei weitere  $\alpha$ -Defensine (HD5 - 6) werden in erster Linie in den Paneth-Zellen des Dünndarms gefunden [22; 78; 79] und sind ebenfalls an der Inaktivierung der Erreger durch Phagozytose beteiligt [120].

$\beta$ -Defensine bestehen aus 36-42 Aminosäuren und haben sowohl eine antibakterielle als auch eine antimykotische Aktivität. Die vier bisher bekannten  $\beta$ -Defensine hBD-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4 werden hauptsächlich in epithelialen Geweben der Haut, der Atemwege, des Urogenitaltrakts und des Gastrointestinaltrakts gebildet. Das erste humane  $\beta$ -Defensin, humanes  $\beta$ -Defensin 1 (hBD1), wurde aus einem großen Volumen Hemofiltrat isoliert [19]. hBD-1 wird konstitutiv von Epithelzellen der Atemwege, der Haut, des Urogenital- und des Gastrointestinaltrakts gebildet [3; 54; 151; 176]. Menschliches  $\beta$ -Defensin (hBD-2) wurde erstmals aus der Haut isoliert und wird von verschiedenen Epithelien der



inneren und äußeren Oberfläche des menschlichen Körpers wie zum Beispiel denen der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts gebildet [8; 132; 154]. Durch Bioscreening und parallele Datenbankrecherche wurde hBD-3 entdeckt [76]. hBD-4 hingegen konnte nur durch genomische Sequenzanalyse entdeckt werden [49]. Es ist bekannt, dass die Expression von hBD-4 in Lungenepithelzellen nach Induktion erhöht wird [166]. Die  $\beta$ -Defensine hBD-2 und hBD-4 gehören zu den wichtigsten induzierbaren antimikrobiellen Peptiden der Haut [65]. Die Peptide der  $\beta$ -Defensin-Familie zeigen antimikrobielle Aktivitäten gegen gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien und Hefen. hBD-1 und hBD-2 zeigen hauptsächlich gegenüber gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* eine hohe antimikrobielle Aktivität. Ihre Aktivität gegenüber gram-positiven Erregern ist allerdings gering. Anders verhält es sich dagegen bei hBD-3 und hBD-4. Diese haben ein relativ breites antimikrobielles Spektrum sowohl gegen gram-negative als auch gram-positive Erreger. In ihrer antimikrobiellen Aktivität zeigen die humanen  $\beta$ -Defensine eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration, mit Ausnahme von hBD-3 [8; 49; 54].

Eine weitere Klasse von Defensinen wurde aus neutrophilen Granulozyten von Rhesusaffen isoliert. Aufgrund ihrer zirkulären Struktur werden sie als  $\theta$ -Defensine bezeichnet [147]. Bisher wurden drei Arten von Rhesus- $\theta$ -Defensinen isoliert RTD-1, RTD-2 und RTD-3. Beim Menschen enthalten die homologen Gene sogenannte Stop Mutationen, die eine vollständige Translation verhindern und somit die Entstehung von funktionsfähigen Peptiden unterbinden [108].

### **1.3.3. Psoriasin**

Psoriasin (S100A7) ist ein antimikrobielles Peptid, welches zur S100 Familie gehört und von den Keratinozyten der Haut gebildet wird. Es wird zum einen durch Kontakt mit *Escherichia coli* in den Keratinozyten vermehrt gebildet, zum anderen aber auch verstärkt in der Haut von Patienten mit Psoriasis exprimiert. Psoriasin wirkt spezifisch gegen verschiedene *Escherichia coli* Stämme, indem es deren Wachstum

hemmt, was durch ein Abfangen von für die Bakterien lebenswichtigen Zink-Ionen zustande kommt [53]. Mit Zink-Ionen gesättigtes Psoriasin zeigt eine verminderte antimikrobielle Aktivität [53]. Darüber hinaus ist bekannt, dass seine antimikrobielle Aktivität durch strukturelle Veränderungen am C-terminalen Ende und Hitzedenaturierung leicht abgeschwächt wird, wohingegen bestimmte Proteasen die antimikrobielle Aktivität ganz aufheben [91]. Neueste Studien zeigen, dass eine verstärkte Expression von Psoriasin in menschlichen Keratinozyten durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 $\alpha$  induziert wird [12]. In weiteren aktuellen Studien werden immer mehr Zusammenhänge zwischen S100A7 (Psoriasin) mit Brustkrebs, Hautkrebs und mit metastasierenden Bronchialkarzinomen festgestellt [98; 105; 175]. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass Psoriasin (S100A7) eine Rolle in der Tumorentwicklung spielt.

#### **1.3.4. Dermcidin**

Dermcidin ist ein neuartiges antimikrobielles Peptid. Es wird nicht in Keratinozyten, sondern in ekkrinen Schweißdrüsen der Haut synthetisiert und in den Schweiß abgegeben. Im Gegensatz zu Defensinen und Cathelizidinen, die als Antwort auf Entzündungen und Verletzungen der Haut induziert werden, ist Dermcidin ein konstitutives AMP der angeborenen Immunität in der menschlichen Haut [119; 125]. Dermcidin weist keinerlei Übereinstimmungen mit anderen antimikrobiellen Peptiden auf. Es wird proteolytisch gespalten in Dermcidin 1 (DCD-1), das 47 Aminosäuren enthält. DCD-1 appliziert eine breite antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von Bakterien wie *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus*, aber auch gegen *Candida albicans*. Seine antimikrobielle Aktivität wird nicht durch eine hohe Salzkonzentration oder einen niedrigen pH-Gehalt im Schweiß beeinflusst [65].

### **1.3.5. Weitere antimikrobielle Peptide**

**Granulysin** ist ein antimikrobielles Peptid, welches von NK-Zellen (natural killer cells) und zytosolischen T-Lymphozyten produziert wird [85]. Funktionell ist es mit anderen Peptiden wie Defensinen und Cathelizidinen verwandt, strukturell weist es allerdings Unterschiede auf. Die Breite seiner Aktivität gegen Mikroben reicht von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien bis zu Parasiten und Pilzen.

**Histatine** sind eine Familie von histidin-reichen Peptiden, die im menschlichen Speichel vorkommen. Die primären Strukturen der Hauptfamilienmitglieder, Histatin 1 und 3, weisen Längen von 38 und 32 Aminosäurerückständen auf [110]. Kleinere Mitglieder der Histatin Familie, einschließlich Histatin 5 (24 AS-rückstände), entstehen durch einen post-translationalen Verarbeitungsprozess aus Histatin 1 und 3. Ihre antimikrobielle Aktivität beinhaltet besonders starke antimykotische Effektivität [110]. In der Lunge konnten noch keine Histatine nachgewiesen werden.

**Lactoferrin** ist ein 80-kDa eisenbindendes Peptid, das eine antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien und Pilze hat [15; 17; 109]. Es wird von verschiedenen sekretorischen Zellen produziert und ist ein wichtiger Bestandteil sekundärer Granula in Neutrophilen Granulozyten. Die eisenbindende Domäne dieser Moleküle ist am C-terminalen Ende lokalisiert, während die N-terminale Region des Lactoferrin eine aus 25 Aminosäuren bestehende mikrobizide Domäne enthält, welche als Lactoferricin (Lfc) bezeichnet wird [16]. Die N-terminalen 11 Aminosäuren des Lactoferricin enthalten die vollen bakteriziden Fähigkeiten, und sind in der Lage selektiv Pathogene zu erkennen. In der Lunge konnte Lactoferrin in sekretorischen Granula von serösen Zellen in submukösen Drüsen und in atemwegsauskleidender Oberflächenflüssigkeit (airway surface liquid) nachgewiesen werden [23; 89].

### **1.3.6. Regulation der antimikrobiellen Peptide**

Die Expression und Sekretion von antimikrobiellen Peptiden unterliegt einer genauen Regulation. Einige Peptide werden erst nach Kontakt mit mikrobiellen Produkten oder pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren exprimiert, andere hingegen werden konstitutiv exprimiert, wie zum Beispiel hBD-1 [9]. Die Expression und Abgabe von hBD-2, hBD-3, hBD-4 und einigen anderen AMPs lassen sich in vitro durch pro-inflammatorische Mediatoren oder bakterielle Produkte induzieren [49; 64; 86; 149]. Zum Beispiel kann hBD-2 in Atemwegsepithelzellen durch IL-1, TNF- $\alpha$ , *Pseudomonas aeruginosa*, neutrophile Elastase, LPS und durch bakterielle DNA induziert werden [64; 113]. TLR2 vermittelt die hBD-2 Induktion durch Lipoprotein [21]. In mehreren Studien wurde belegt, dass NF- $\kappa$ B und MAP Kinasen die Expression von hBD-2 durch pro-inflammatorische Zytokine und Mikroorganismen erheblich mitbewirken [21; 64; 75; 80; 86; 149]. Darüber hinaus sind intrazelluläres Kalzium und AP-1 an der Expression von hBD-2 in Atemwegsepithelzellen beteiligt [154]. Mehrere klinische Studien zeigten erhöhte  $\beta$ -Defensin Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten während inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen wie Pneumonien und zystischer Fibrose [10; 72]. Andererseits können chronische Entzündungen dazu führen, dass die Produktion einiger antimikrobieller Peptide herunterreguliert wird. Über Abbau und Inaktivierung von antimikrobiellen Peptiden ist noch nicht viel bekannt. Proteasen zum Beispiel, welche von gewöhnlichen pathogenen Bakterien abgegeben werden, sind imstande, LL-37 zu inaktivieren und abzubauen [126]. In Sekreten der Atemwege wird LL-37 durch Bündelung mit F-Actin und DNA inhibiert [155]. Am Abbau von hBD-2 und hBD-3 scheinen einige elastolytische Cathepsine beteiligt zu sein, die auch eine Rolle bei der zystischen Fibrose spielen [142].

### **1.3.7. Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide**

Antimikrobielle Peptide haben ein breites Wirkspektrum sowohl gegen gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gegen eingehüllte Viren und Pilze. In den meisten Fällen ist für die antimikrobielle Aktivität die Interaktion zwischen dem Peptid und der Oberflächenmembran des Zielorganismus wichtig. Es konnte ein allgemein anerkanntes Modell für antimikrobielle Peptide zur Interaktion mit der Bakterienmembran bestätigt werden [61; 62; 161]. Man nimmt an, dass für die Bindung eines antimikrobiellen Peptides an die Zielzelle elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen AMP und den negativ geladenen Molekülen an der Oberfläche der Zielzelle verantwortlich sind. Darauf folgend verändern Wechselwirkungen zwischen den AMP und der Membran der Zielzelle deren biophysikalische Eigenschaften [38; 135], was letztendlich zu einer Permeabilisierung der Bakterienmembran mit Ionen-durchlässigen Kanälen führt. Dies bewirkt einen Zusammenbruch des Membranpotentials, der mit einem Verlust von Ionen und Metaboliten einhergeht und schlussendlich den Untergang der Zelle herbeiführt [24; 171]. Im Gegensatz dazu können einige AMP an intrazelluläre Rezeptormoleküle oder intrazelluläre Moleküle wie Nukleinsäuren und Enzyme binden, so dass lebenswichtige bakterielle Funktionen gestört werden. Die Hemmung von essentiellen Stoffwechselaktivitäten führt schließlich zum Untergang des Bakteriums. Das neutrophile  $\alpha$ -Defensin 1 (HNP-1) hemmt intrazellulär sowohl die Protein- als auch die DNA-Synthese von *Staphylococcus aureus*. HNP-1 hat ebenfalls eine Aktivität auf die Zytoplasmamembran, bewirkt diesbezüglich allerdings keine Zellyse sondern leitet über die Inhibition von essentiellen Synthesen im Zellinneren durch Bindung an die ribosomale Untereinheit 50S den Zelltod ein [162; 112]. Die Histatine haben hauptsächlich antimykotische Eigenschaften. Sie binden an Membranrezeptoren von Hefen und gelangen in das Zytoplasma, wo sie am Mitochondrium der Hefe einen ATP-Verlust induzieren, welcher zum Zelltod führt [83]. Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenität der Bakterien. Es wurden bisher einige unterschiedliche Resistenzmechanismen von gram-positiven und gram-negativen Bakterien

gegenüber AMP beschrieben, wie beispielsweise die Produktion von Exoproteinen [77], ladungsabhängiger Abstoßung [38; 138] oder durch Ausbildung von Efflux-Pumpen [129].

#### **1.4. Zelllinien des Atemwegsepithels**

Da sich das Atemwegsepithel aus unterschiedlichen Zelllinien zusammensetzt, wurden in dieser Arbeit mehrere verschiedene Zelllinien verwendet. Die Zelllinien 1HAEO (human airway epithelial cells) und 16HBE (human bronchial epithelial cells) sind etablierte, für *in vitro* Studien transformierte Zelllinien, welche die Fähigkeit haben, eine differenzierte Zellmorphologie und Epithelzellfunktion auszubilden, wie beispielsweise aktive Chlorid-Kanäle [31; 32; 56]. Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Atemwegssekretion. Beide Zelllinien reagieren bekanntermaßen gut auf inflammatorische Stimuli [32; 57; 99]. Durch Transfektion mit dem Wildtyp SV 40 Virus entstand aus primären HTGS (human tracheal gland serous cells) die transformierte Zelllinie MM-39. Diese tracheale, seröse Drüsenzelllinie hat ebenfalls alle sekretorischen Fähigkeiten der Nativzelllinie und wird für *in vitro* Studien verwendet [102]. Die Zelllinie BEAS-2B entstand aus einer Transfektion humaner Bronchiepithelzellen mit dem Adenovirus 12-SV 40, und zeichnet sich dadurch aus, dass sie nicht nur für *in vitro* Studien bezüglich Karzinogenese sondern auch für differenzierte Epithelzellfunktionen verwendet werden kann [118]. Die Zelllinie Calu-3 (human caucasian lung adenocarcinoma), wurde aus humanen serösen Submukosazellen der Atemwege abgeleitet und ist ebenfalls etabliert für Studien bezüglich der Chlorid-Sekretion und diverser Funktionen im Atemwegsepithel [130]. Die serösen Zellen scheinen durch die Produktion von Flüssigkeit eine wichtige Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Mukoziliären Clearance zu haben [123; 153].

### **1.5. Fragestellung**

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Studien belegt, dass die Funktion des Atemwegsepithels über die einer physikalischen Barriere weit hinausgeht. Besonders die Beteiligung des Respirationstrakts an der angeborenen Immunität war von besonderem Interesse.

1. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, welche Zelllinien des Atemwegsepithels Toll-like Rezeptoren exprimieren, und diese mit der TLR Expression in Primärzellen zu vergleichen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Aktivierung der TLR zu einer Induktion pro-inflammatorischer Zytokine führt. Anhand der Ergebnisse sollte definiert werden, ob diese Zelllinien für Studien über epitheliale Abwehr sinnvoll eingesetzt werden können.

2. Diesbezüglich sollte ebenfalls untersucht werden, ob Toll-like Rezeptoren auch von Endothelzellen exprimiert werden und ob eine Aktivierung der TLR hier ebenfalls zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine führt, da diese Zellen eine wichtige Funktion in der Erkennung und der Abwehr bei hämatogen gestreuten Keimen einnehmen.

3. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob bestimmte antimikrobielle Peptide in Atemwegsepithel induziert werden und inwiefern dies konstitutiv oder erst reaktiv durch Kontakt mit bakteriellen Erregern zustande kommt. Diesbezüglich lagen bestimmte antimikrobielle Peptide des Hautepithels im Mittelpunkt unserer Forschungen, insbesondere das Psoriasin (S100A7), da über das Vorkommen dieser AMP im Respirationstrakt noch nicht viel bekannt ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zelllinien, Zellkulturmedien, Bakterien und Reagenzien

Die verwendeten Zellkulturmedien wurden von Gibco (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Das PBS stammt von PAA (Cölbe, Deutschland). Die Medien für die Bakterienkulturen stammten von LabM (Lancashire, UK) bzw. Roth (Karlsruhe, Deutschland). 1HAEO- und 16HBE14o-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FCS (fötale Kälberserum, foetal calf serum) kultiviert. Die Zelllinie MM-39 bestand aus einer 1:1 Mischung von DMEM und HAM F-12 mit 10% BAS (bovine adult serum; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 2% Ultrosor G (Biosepra, Fremont, USA). Calu-3 wurden in HAM-F12: DMEM = 1:1 mit 10% FCS und BEAS-2b in RPMI mit 10% FCS kultiviert. Alle diese Kulturmedien enthielten Penicillin G (100 IU / ml) und Streptomycin Sulfat (100 IU / ml). Für die Experimente mit primären humanen Endothelzellen wurden Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) von der Firma Clonetics (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz) verwendet. *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 wurde in LB Medium unter Schütteln bei 37°C über Nacht angezogen. Die Bakterien wurden überimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 geerntet. Im Anschluss wurden sie einmal mit PBS gewaschen und 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien in der gewünschten Konzentration in PBS aufgenommen. *Streptococcus pneumoniae* PN36 (Dr. M. Witzenrath, Charité Berlin, Deutschland) wurde auf Blutagarplatten über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden sie in CASO Bouillon + 10% FCS + 3% Hefeextrakt in einem unverschlossenem Röhrchen (50 ml) stehend bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,3 angezogen. Die Bakterien wurden zehn Minuten lang bei 3100 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert.



## **2.2. Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel und air liquid interface Kulturen**

Zellen für Primärzellen von humanem Atemwegsepithel wurden aus den Bronchien und der Trachea von Patientenmaterial gewonnen. Für diesen Vorgang wurde das Patientenmaterial enzymatisch mit der Protease 14 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verdaut. Die Epithelzellen wurden anschließend mit einem Skalpell abgetragen und in Flüssigkultur mit airway epithelial cell growth medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Die Ethikkommission der Universität Marburg hat dieses Protokoll genehmigt. Die Patienten wurden aufgeklärt und ihre Zustimmung wurde eingeholt. Für das Anlegen von *air liquid interface* Kulturen wurden primäre Epithelzellen verwendet, die vorher bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert worden sind. Die Zellen wurden auf vereinzelt mit Trypsin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und auf mit Typ 1-Kollagen vorbeschichtete (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), semipermeable Membranen mit einer Porengröße von 0,4 µm ausgesät (Millicell-HA; Durchmesser 12 bzw 30 mm; Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA). Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde das Medium von apikaler Seite entfernt. Es erfolgte nun eine Auswechslung des basolateralen Kulturmediums, welches aus einer 1:1 Mischung von DMEM und HAM F-12 bestand mit 2% Ultrosor G (Biospera, Fremont, USA), Penicillin G [100 U/ml] und Streptomycin Sulfat [100 U/ml]. Durch Messung des transepithelialen Widerstands (Widerstand > 1000 Ω x cm<sup>2</sup>) wurde die Ausbildung von *tight junctions* überprüft. Es nahm 2 bis 3 Wochen in Anspruch, bis sich sichtbare Zilien ausgebildet hatten und die Zellkulturen für Experimente verwendet werden konnten.

## **2.3. Stimulationsexperimente**

### **2.3.1. Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien**

Für alle Experimente mit abgetöteten Bakterien wurden *Streptococcus pneumoniae* PN36 bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3 abzentrifugiert und *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 abzentrifugiert.

Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und im Ausgangsvolumen PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde diese Suspension für 30 Minuten bei 95°C inkubiert, um die Bakterien abzutöten, und danach in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung auf die Zellen gegeben.

### **2.3.2. Stimulation mit TLR-Liganden**

Für die Stimulation wurden folgende Liganden verwendet: Poly(I:C), Ultra Pure *E. coli* K12 LPS, MALP 2 und Flagellin. Sämtliche dieser Liganden wurden von InvivoGen (Toulouse, Frankreich) bezogen. Die Zellen wurden jeweils in folgenden Konzentrationen für sechs Stunden mit einem Liganden stimuliert:

25 µg/ml Poly (I:C), 100ng Ultra Pure *E. coli* K12 LPS, 1µg/ml MALP 2 und 500 ng/ml Flagellin.

### **2.4. Isolation von RNA und RT-PCR (real time PCR)**

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit verwendet (Quiagen, Hilden, Deutschland). Unter Verwendung des RNase free DNase Sets (Quiagen, Hilden, Deutschland) wurde ein DNase Verdau während der RNA Isolation auf der Säule durchgeführt. Für die cDNA Synthese wurden 1,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Mittels eines cDNA Synthese Kits (MBI Fermentas, ST. Leon-Rot, Deutschland) wurde die cDNA durch oligo(dT)<sub>18</sub> Primer synthetisiert. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt und in jede PCR Reaktion mit einem Volumen von 25µl wurden 5µl cDNA eingesetzt. Die RT-PCR wurde unter Verwendung eines SYBR Green PCR Mix nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und dem ICycler (Biorad, München Deutschland) durchgeführt. Folgende PCR Protokolle wurde verwendet: Protokoll 1: 3 Minuten 95°C, 40 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und 45 Sekunden mit 60°C, eine Minute 95 °C, eine Minute 55°C, Schmelzkurve (55°C bis 94°C in 0,5°C Schritten). Protokoll 2: 15 Minuten 95°C, 40 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und eine Minute 60 °C, eine Minute 95°C; eine Minute

55°C, Schmelzkurve (55°C bis 94°C in 0,5°C Schritten). Als Negativkontrollen wurden Wasser und die –RT-Proben verwendet. Alle verwendeten Primer (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die relative Expression wurde normalisiert auf  $\beta$ -actin (und GAPDH) und mittels  $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet [68; 96]. Die PCR Effizienz war für alle Reaktionen vergleichbar.

Ziel Gen	5'-Primer	3'Primer
TLR 1	CTGGTATCTCAGGATGGTGTGC	TTGGAGTTCTTCTAAGGGTATGTTCC
TLR 2	GAGAGTGGGAAATATGGACACCTT	GCAGTTCCAAACATTCGCCACG
TLR3	CCTGCAGCTGACTAGGAACT	TGCTGCAAATCGAGAATTT
TLR 4	ACCTGGAGTGGGAGGACAGT	AGATAGATGTTGCTTCCTGCCAA
TLR 5	GAAAACCGCATTGCCAATAT	GGCCACCTCAAATACTGCTG
TLR 6	CTATTGTAAAAGCTTCCATTTTGT	ACCTGAAGCTCAGCGATGTAGTTC
TLR 7	TGCTCTGCTCTCTTCAACCA	GAGTGACATCACAGGGCAGA
TLR 8	TCCTTCAGTCGTCAATGCTG	CGTTTGGGGAACCTTCCTGTA
TLR 9	ACTTCACCTTGGATCTGTCACG	TGACTGCCTGCGAGATGC
TLR 10	GAAAGTTCCCGCAGACTTG	TGGAGTTGAAAAGGAGGTTATAG
hBD-1	GCCTCAGGTGGTAACTTTCTCA	GCGTCATTTCTTCTGGTCACT
hBD-2	TCAGCTCCTGGTGAAGCTC	GGGCAAAGACTGGATGACA
hBD-3	TATTATTGCAGAGTCAGAGCGC	CACTCTCGTCATGTTTCAGGG
hBD-4	GGCAGTCCCATAACCACATATTC	TGCTGCTATTAGCCGTTTCTCTT
Psoriasis	GGTCCATAATAGGCAT	GGCACTAAGGAAGTT
Dermcidin	CTGTGCCTATGATCC	TTTGGTGCCTGTCTG
Lactoferrin	CCTCCCAGGAACCGT	AGCCTCGACTGACAGG
Histatin 1	GTCTTTGCTTTAGTC	GATGCTTTTCATGG
Histatin 3	GGAGCTGATTACAT	TCAATTGTCATACAA
GAPDH	CAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGC	TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT
B-actin	AGCCCTCGCCTTTGCCGA	CTGGTGCCTGGGGCCG

**Tabelle 2: Verwendete Primer**

### 2.5. ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

Die Konzentration von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurde mittels kommerziell erhältlicher ELISA Kits nach Anleitung des Herstellers bestimmt (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland). Durch dieses Verfahren wurden die Konzentrationen der humanen Zytokine IL-6 und IL-8 bestimmt.

## **2.6. Statistische Analyse**

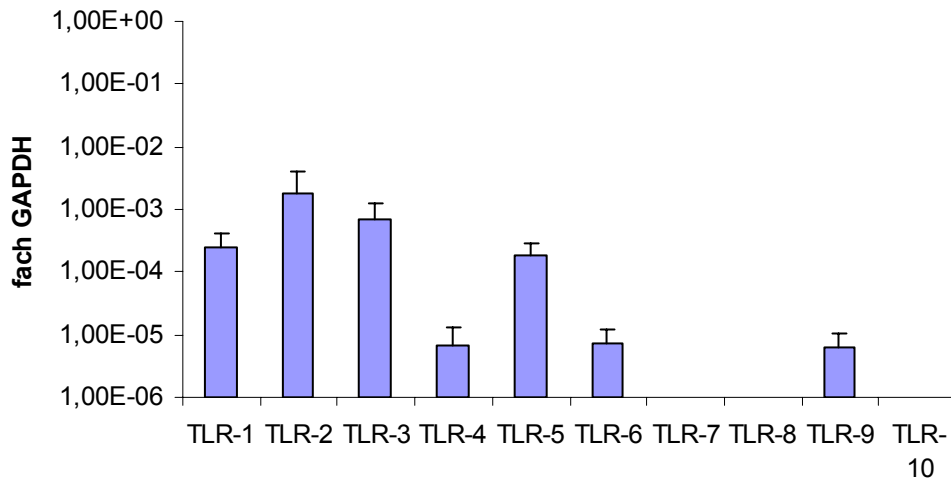
Die Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels T-Tests (zweiseitig) oder mittels ANOVA (analysis of variance) bei Experimenten mit mehr als zwei Untergruppen analysiert. Post hoc Tests wurden mittels T-Test (zweiseitig) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Ergebnisse für einen P-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

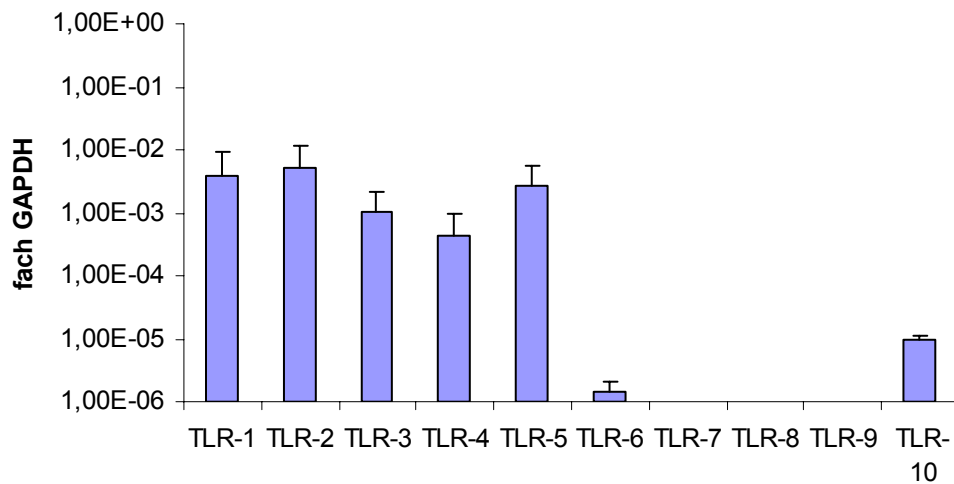
#### 3.1. TLR werden in verschiedenen Zelllinien des Atemwegsepithels exprimiert

Den TLR ist es möglich, mit verschiedenen unterschiedlichen Viren, Pilzen und Bakterien (bzw. bakteriellen Bestandteilen) in Wechselwirkung zu treten. Das Ziel war es, zu definieren, welche Zelllinien eine ähnliche Ausstattung an TLRs besitzen wie pAEC (primary airway epithelial cells). Es wurden daher mehrere Zelllinien des Atemwegsepithels betrachtet und systematisch bezüglich der Expression von TLR 1-10 untersucht und verglichen (Abb. 6-10). Zudem wurde auch die Expression von TLR 1-10 in primären Atemwegsepithelzellen, welche einerseits in Flüssigkultur und andererseits als *air liquid interface* Kultur gehalten wurden, untersucht (Abb. 4-5). Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem Vergleich der TLR Expression in den unterschiedlichen Zelllinien.

Es war möglich, die TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 in primären Atemwegsepithelzellen nachzuweisen (Abb. 4-5). Hierbei waren die TLR 6, 9 und 10 allerdings nur schwach exprimiert. Auffällig war jedoch, dass die primären Atemwegsepithelzellen, die in Flüssigkultur gehalten wurden, TLR 9 exprimierten, nicht aber TLR 10. Jene primären Atemwegsepithelzellen, welche in *air liquid interface* Kultur gehalten wurden, exprimierten dagegen TLR 10, aber nicht TLR 9. TLR 7 und TLR 8 konnten diesbezüglich nicht nachgewiesen werden (Abb 4-5).

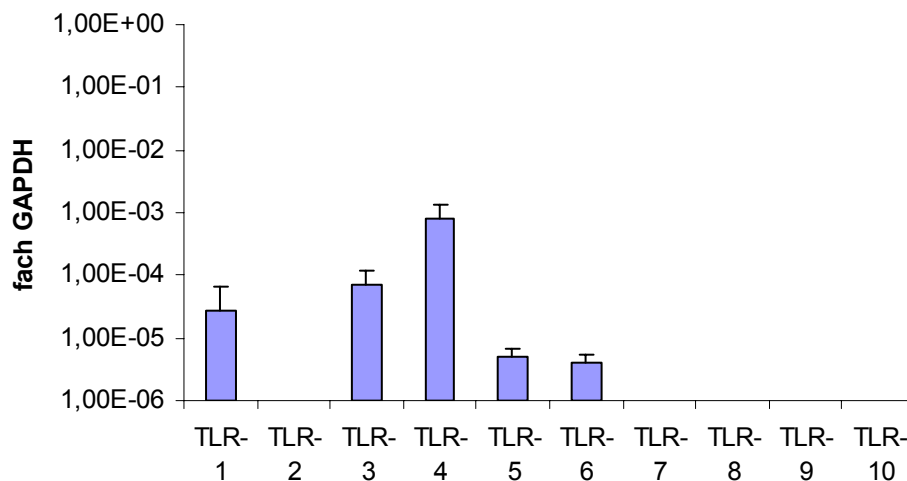


**Abbildung 4: Expression von TLR 1-10 in primären Atemwegsepithelzellen (PZ) in Flüssigkultur (FK).** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels der  $\Delta CT$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta CT}$  errechnet.



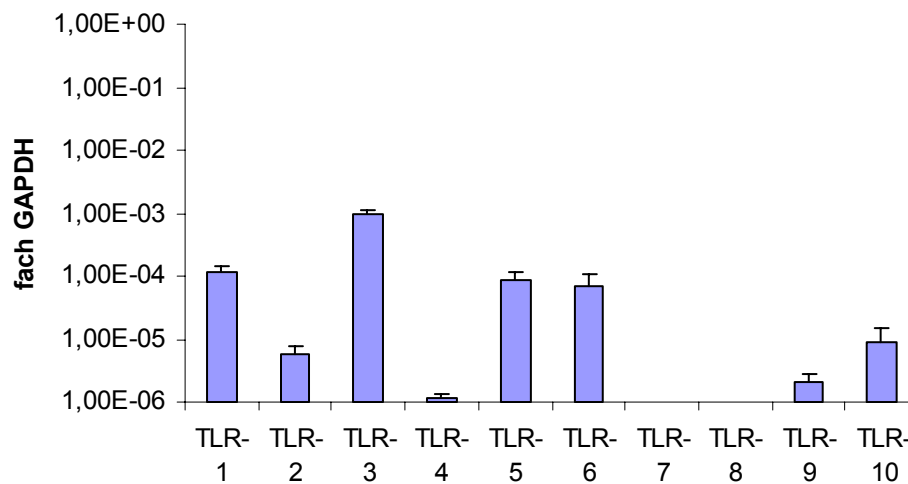
**Abbildung 5: Expression von TLR 1-10 in primären Atemwegsepithelzellen (PZ) in air liquid interface Kultur (ALI).** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels  $\Delta CT$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta CT}$  errechnet.

Die Zelllinie 1HAEo (HAE) exprimiert die TLR 1, 3, 4, 5 und 6. Hierbei bei waren TLR 5 und TLR 6 nur schwach, TLR 4 dagegen am stärksten vertreten. Die TLR 2, 7, 8, 9 und 10 konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 6).



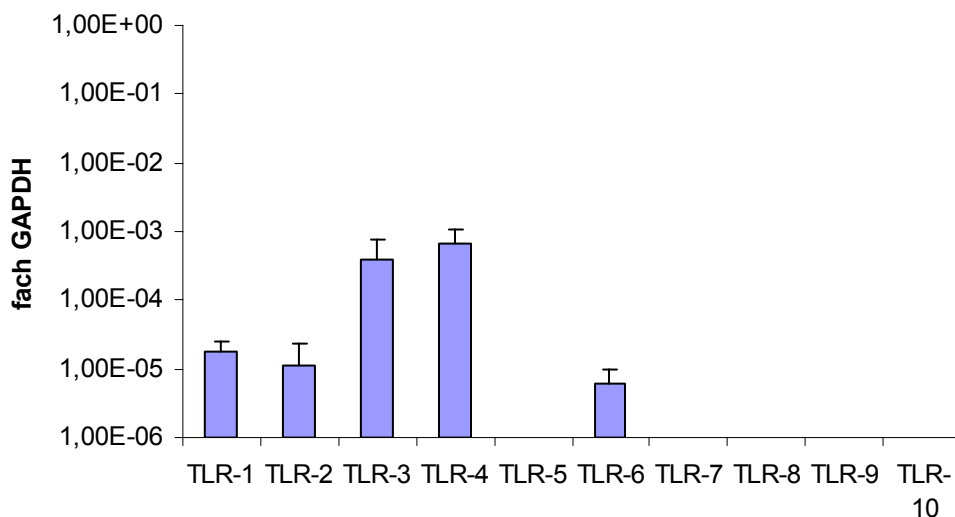
**Abbildung 6: Expression von TLR 1-10 in der Zelllinie 1HAEo (HAE) des Atemwegsepithels.** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels der  $\Delta\text{CT}$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta\text{CT}}$  errechnet.

Die Zelllinie 16HBE14o (HBE) exprimiert die TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10, wobei TLR 4 allerdings nur sehr schwach exprimiert wird. Am stärksten war hier TLR 3 vertreten. TLR 9, TLR 2 und TLR10 wurden schwach exprimiert. Die TLR 7 und 8 konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 7).



**Abbildung 7: Expression der TLR 1-10 in der Zelllinie 16HBE14o (HBE) des Atemwegsepithels.** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR errechnet. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels der  $\Delta\text{CT}$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta\text{CT}}$  errechnet.

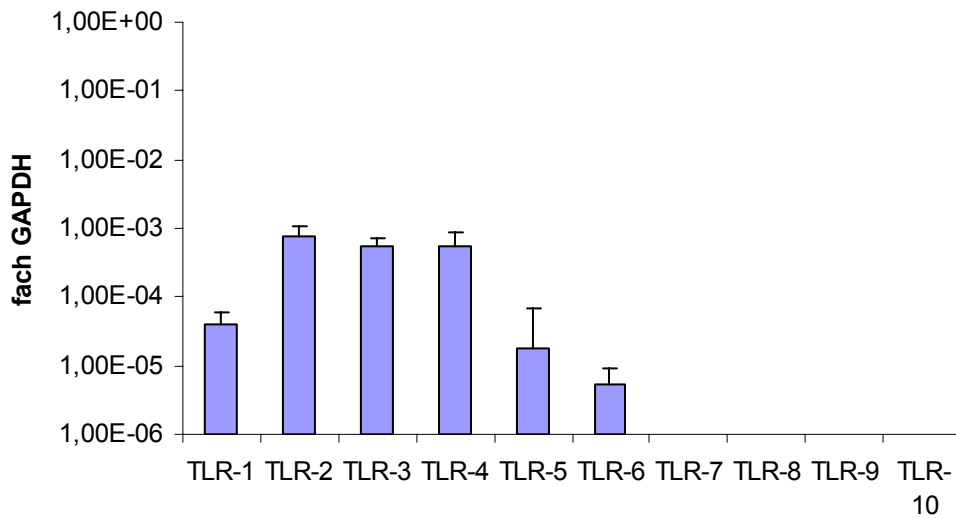
In der Zelllinie BEAS-2B wurde die Expression der TLR 1, 2, 3, 4 und 6 nachgewiesen. Am stärksten wurden TLR3 und TLR 4 exprimiert. Die Expression des TLR war etwas schwach. Eine Expression der TLR 5, 7, 8, 9 und 10 blieb aus (Abb. 8).



**Abbildung 8: Expression der TLR 1-10 in der Zelllinie BEAS-2B des Atemwegsepithels.** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels der  $\Delta\text{CT}$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta\text{CT}}$  errechnet.

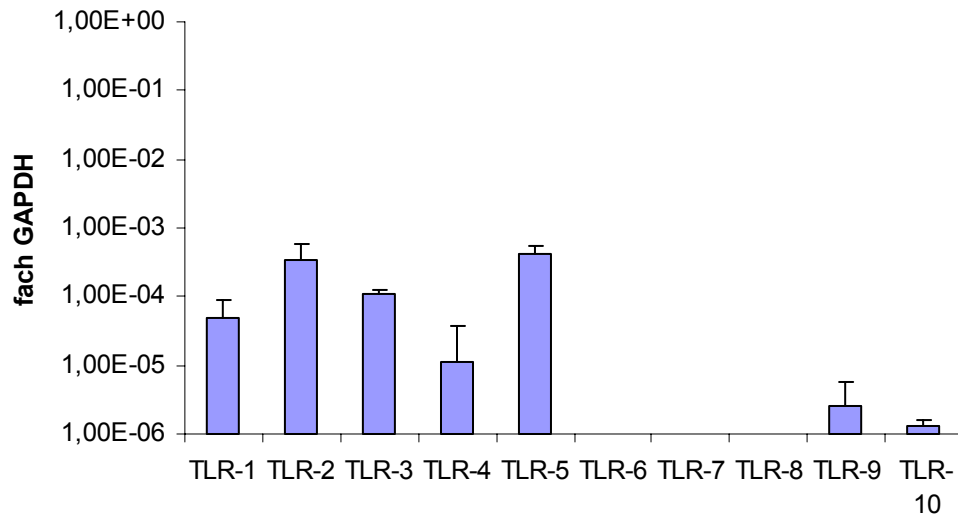


In der Zelllinie MM-39 wurde die Expression der TLR 1-6 nachgewiesen. Am stärksten wurden die die TLR 2, 3 und 4 exprimiert. Die Expression des TLR 6 war etwas schwach. Eine Expression der TLR 7-10 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).



**Abbildung 9: Expression der TLR 1-10 in der Zelllinie MM-39 des Atemwegsepithels.** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels der  $\Delta\text{CT}$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta\text{CT}}$  errechnet.

In der Zelllinie Calu-3 konnte eine Expression der TLR 1, 2, 3, 4, 5, 9 und 10 nachgewiesen werden. Am stärksten wurden die TLR 2 und 5 exprimiert. Schwach hingegen war die Expression von TLR 9 und 10. Es erfolgte keine Expression der TLR 6, 7 und 8 (Abb. 10).



**Abbildung 10: Expression der TLR 1-10 in der Zelllinie Calu-3 des Atemwegsepithels.** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen zu GAPDH wurde mittels der  $\Delta\text{CT}$  Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1)*\Delta\text{CT}}$  errechnet.

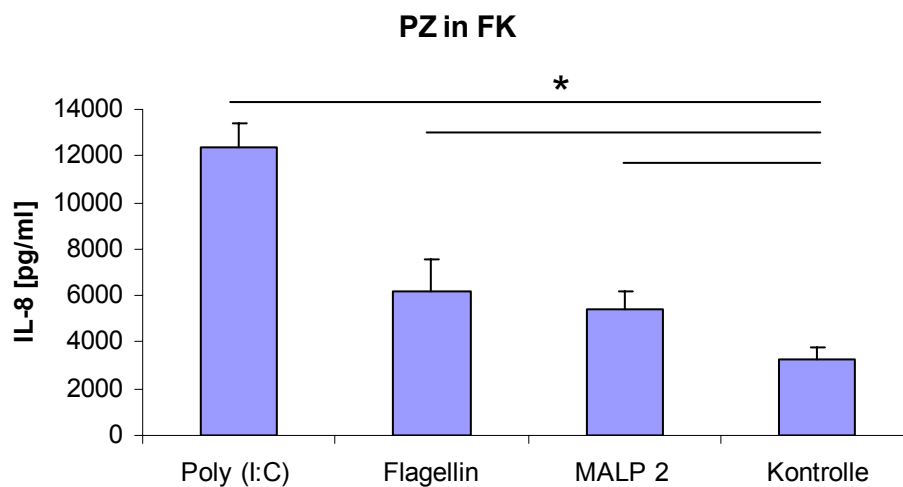
Das Atemwegsepithel ist eine wichtige physikalische Barriere. Darüber hinaus ist es aber auch aktiv an der angeborenen Immunantwort beteiligt. Voraussetzung hierfür ist allerdings die Expression von TLR in den verschiedenen Atemwegsepithelzellen, damit verschiedene mikrobielle Bestandteile spezifisch erkannt und dementsprechend eine Immunantwort eingeleitet bzw. moduliert werden kann.

Zelllinie Rezeptor	HAE	HBE	MM-39	BEAS-2B	Calu-3	PZ in FK	PZ ALI
TLR-1	2	3	2	2	2	3	4
TLR-2	0	1	3	2	3	3	3
TLR-3	2	4	3	3	3	3	4
TLR-4	3	1	3	3	2	2	3
TLR-5	1	2	2	0	3	3	4
TLR-6	1	2	1	1	0	1	1
TLR-7	0	0	0	0	0	0	0
TLR-8	0	0	0	0	0	0	0
TLR-9	0	1	0	0	1	1	0
TLR-10	0	2	0	0	1	0	2

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Expressionswerte von TLR 1-10 in den untersuchten Zelllinien. Semiquantitative Darstellung der Werte: 0 =  $< 1^{-06}$ ; 1 =  $1^{-06} - 1^{-05}$ ; 2 =  $1^{-05} - 1^{-04}$ ; 3 =  $1^{-04} - 1^{-03}$ ; 4 =  $> 1^{-03}$**

### 3.2. TLR Liganden stimulieren primäre Atemwegsepithelzellen

Die Stimulation von TLR in Epithelzellen und Immunzellen kann eine Abgabe verschiedener Zytokine, Chemokine und antimikrobieller Peptide induzieren. Es wurde daher untersucht, wie sich die Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen *in vitro* mit bakteriellen und viralen Bestandteilen, welche als TLR Liganden bekannt sind, auf die Abgabe von IL-8 auswirkt. Die Signaltransduktion der TLR verläuft auf zwei unterschiedlichen Signalwegen, dem MyD88 abhängigen und dem MyD88 unabhängigen Weg, die in eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B münden können. Die Abgabe von IL-8 erfolgt NF- $\kappa$ B vermittelt. Es wurden folgende Liganden verwendet: LPS aus *E. coli* für TLR 4, Flagellin aus *S. typhimurium* für TLR 5, Poly (I:C) für TLR 3 sowie MALP 2 für TLR 2 und TLR 6.



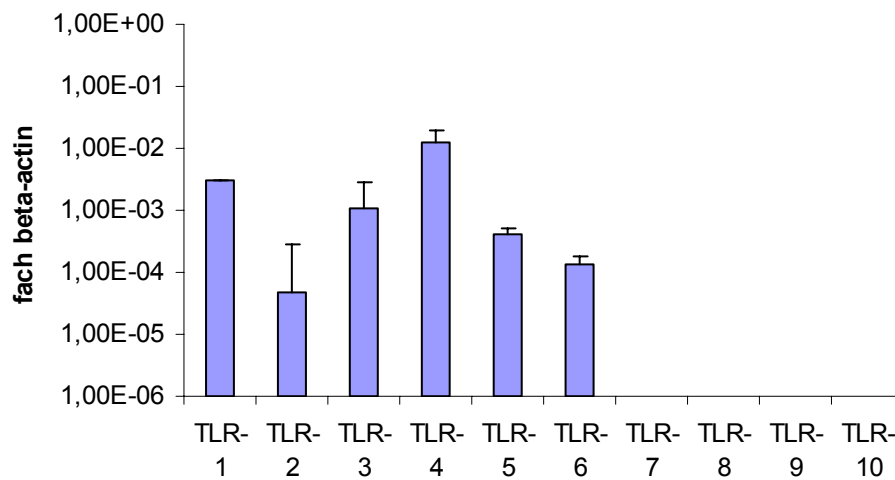
**Abbildung 11: Abgabe von IL-8 in primären Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit TLR Liganden.** Die primären Atemwegsepithelzellen (PZ) in Flüssigkultur (FK) wurden mit Flagellin [500  $\mu$ g/ml], Poly (I:C) [25  $\mu$ g/ml] und MALP 2 [1 $\mu$ g/ml] für 6 Stunden stimuliert. Die Konzentration von IL-8 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 4$ ).

Die Abgabe von IL-8 wurde nach Stimulation der primären Atemwegsepithelzellen mit Poly (I:C), Flagellin und MALP 2 in allen untersuchten Fällen signifikant gesteigert (Abb. 11).

Die gesteigerte Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen zeigt, dass das Atemwegsepithel in der Lage ist, über Toll-like Rezeptoren bestimmte virale und bakterielle Bestandteile spezifisch zu erkennen und bestimmte Signalwege zu aktivieren. Nachfolgend wurde untersucht, ob Toll-like Rezeptoren nicht nur von Epithelzellen, sondern auch von Endothelzellen exprimiert werden.

### **3.3. Endothelzellen exprimieren TLR**

Endothelzellen stellen eine Grenzfläche dar, die in Kontakt mit unterschiedlichen Mikroorganismen bei hämatogener Aussaat kommt. Somit wurde nun untersucht, ob TLR auch in Endothelzellen exprimiert werden, da diese ebenfalls eine Schutzfunktion bekleiden. Entzündungsvorgänge im Endothel werden für einige Krankheiten als relevant angesehen, wie beispielsweise Arteriosklerose. Hierfür wurden primäre Zellen aus menschlichen Nabelschnüren verwendet, so genannte HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Anhand dieser Zellen konnten im RT-PCR Verfahren die Expression der TLR 1, 2, 3, 4, 5 und 6 in Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 11). Es war kein Nachweis der TLR 7, 8, 9 oder 10 möglich.



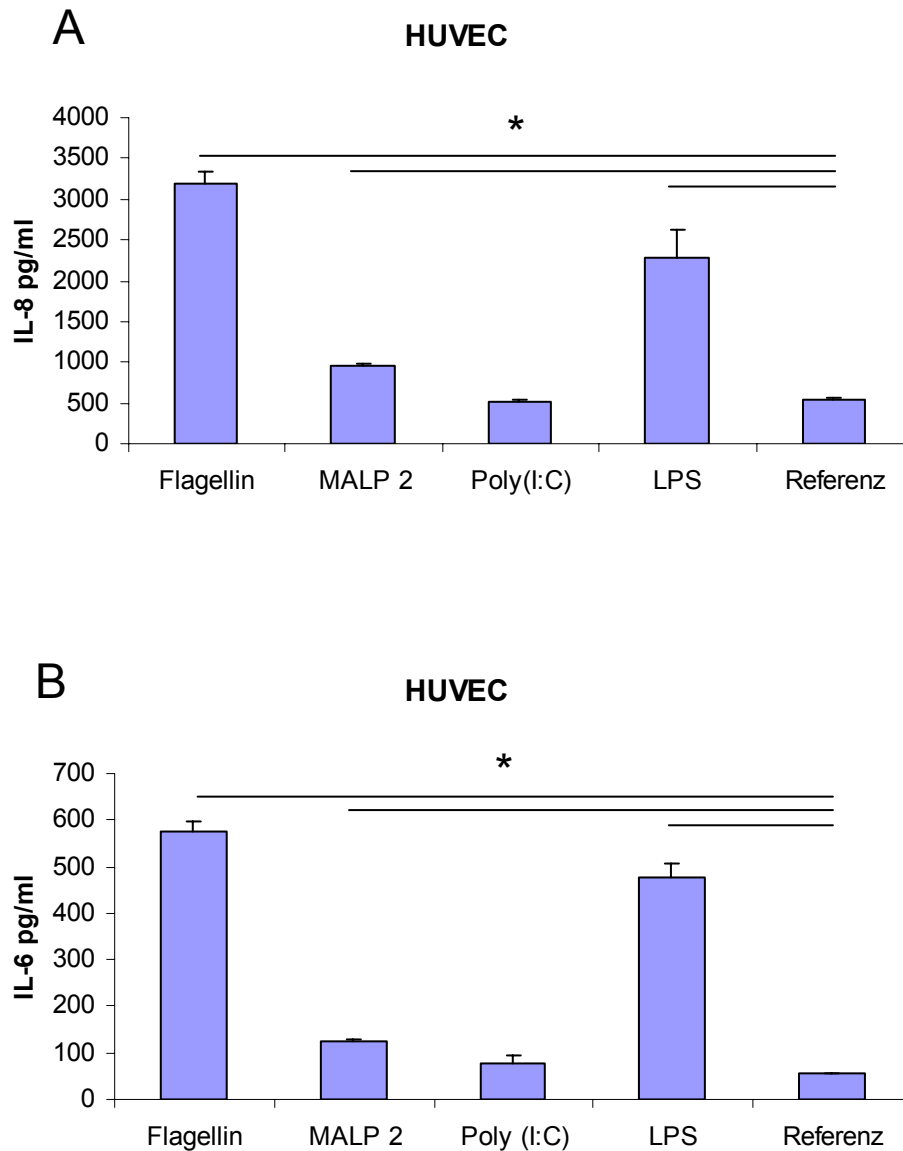
**Abbildung 12: Expression der TLR 1-10 in HUVEC-Endothelzellen.** Die TLR Expression auf mRNA Ebene wurde durch RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen von TLR zu beta-actin wurde mittels der  $\Delta$ CT Werte unter Verwendung der Formel  $2^{(-1) \cdot \Delta CT}$  errechnet.

### 3.4. TLR Liganden stimulieren HUVEC Endothelzellen

Die Stimulation von Epithelzellen und Immunzellen durch TLR kann eine Expression und Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und AMP induzieren. Es wurde daher untersucht (*in vitro*), wie sich die Stimulation von Endothelzellen mit verschiedenen bakteriellen und viralen Bestandteilen, die als spezifische Liganden von TLR bekannt sind, auf die Abgabe der Interleukine IL-6 und IL-8 auswirkt. Die Abgabe von IL-6 und IL-8 erfolgt NF- $\kappa$ B vermittelt über den MyD88 abhängigen Signalweg. Es wurden LPS aus *E. coli* für TLR 4, Flagellin aus *S. typhimurium* für TLR 5, Poly (I:C) für TLR 3 sowie MALP 2 für TLR 2 und TLR 6 als Liganden verwendet.

Die Abgabe von IL-8 war besonders bei Stimulation mit Flagellin und LPS gesteigert. Eine leicht erhöhte Abgabe erfolgte ebenfalls nach der Stimulation mit MALP 2 (Abb. 13 A).

Die Abgabe von IL-6 wurde besonders durch die Stimulation mit Flagellin und LPS gesteigert. Bei den mit MALP 2 stimulierten Zellen war ebenfalls eine leicht gesteigerte Abgabe erkennbar (Abb. 13 B).



**Abbildung 13 A+B: Abgabe von IL-8 (A) und IL-6 (B) in HUVEC nach Stimulation mit TLR Liganden.** In beiden Abbildungen ist die Auswirkung von bakteriellen und viralen Bestandteilen auf die Abgabe von IL-6 und IL-8 dargestellt. Die Zellen wurden mit Flagellin [500 ng/ml], MALP 2 [1 µg/ml], Poly (I:C) [25 µg/ml] oder LPS [100ng] für 6h stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in den Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede von  $P < 0,05$  wurden mit \* markiert (n = 4).

Die durch bakterielle Bestandteile von TLR Liganden induzierte Abgabe von Zytokinen zeigt, dass auch Endothel in der Lage ist, TLR vermittelt und spezifisch verschiedene bakterielle Bestandteile zu erkennen und darauf zu reagieren. Somit wird eine NF- $\kappa$ B vermittelte Freisetzung von IL-6 und IL-8, über den MyD88 abhängigen Signalweg bewirkt. Wie bereits erwähnt, können TLR auch eine Induktion von antimikrobiellen Peptiden bewirken. Nachfolgend wurde das Vorkommen bestimmter antimikrobieller Peptide im Atemwegsepithel untersucht.

### **3.5. Antimikrobielle Peptide werden im Atemwegsepithel exprimiert**

Epithelzellen der Haut sind imstande, verschiedene antimikrobielle Peptide zu produzieren. Dies sind unter anderem die Peptide Psoriasin (S100A7), Dermcidin und Lactoferrin. Es wurde untersucht, welche dieser antimikrobiellen Peptide auch vom Atemwegsepithel exprimiert werden und auf unterschiedliche bakterielle Erreger reagieren. Darüber hinaus wurde in diesem Zusammenhang auch die Expression anderer antimikrobieller Peptide wie hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4, Histatin 1, Histatin 3 und SLPI untersucht. Für die Versuche wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit einem gram-positiven und einem gram-negativen Bakterium, welche häufig zu infektiösen Lungenerkrankungen führen, stimuliert. Somit wurden die Zellen mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit hintzeinaktivierten Erregern in unterschiedlichen Verdünnungen von 1:10 und 1:100, jeweils 6 Stunden und 24 Stunden lang. Anschließend wurde mittels RT-PCR (real time PCR) ermittelt, welche AMP exprimiert werden und wie hoch die jeweilige Induktionssteigerung ausfiel.

In mit *Pseudomonas aeruginosa* stimulierten primären Atemwegsepithelzellen wurde Psoriasin (S100A7) exprimiert (Abb. 15). Bereits nach 6-stündiger Stimulation erfolgte ein signifikanter Induktionsanstieg, der nach 24 Stunden bereits wieder leicht abfiel. Des



Weiteren wurde in diesen Zellen hBD-3 exprimiert (Abb. 14 B). Nach 6-stündiger Stimulation war noch keine Reaktion erkennbar, nach 24 Stunden war allerdings eine deutliche Induktionssteigerung auszumachen.

Am stärksten reagierte hBD-2 (Abb. 14 A). Bereits nach 6-stündiger Stimulation war eine deutliche Induktionssteigerung zu erkennen, die nach 24 Stunden noch weiter angestiegen war. Bei den restlichen antimikrobiellen Peptiden Dermcidin, Lactoferrin, Histatin1, Histatin 3 und hBD-4 konnten Daten gewonnen werden, die auf keine signifikante Induktion hinweisen. hBD-1 zeigte eine konstitutive Expression in primären Atemwegsepithelzellen, allerdings keine Induktionssteigerung nach Stimulation. Bezüglich Psoriasin wurde zusätzlich noch untersucht, wie schnell es exprimiert wird. Nach 1-stündiger und 3-stündiger Stimulation der primären Atemwegsepithelzellen mit *Pseudomonas aeruginosa* ist bereits eine stete Induktionssteigerung von Psoriasin erkennbar (Daten nicht gezeigt).

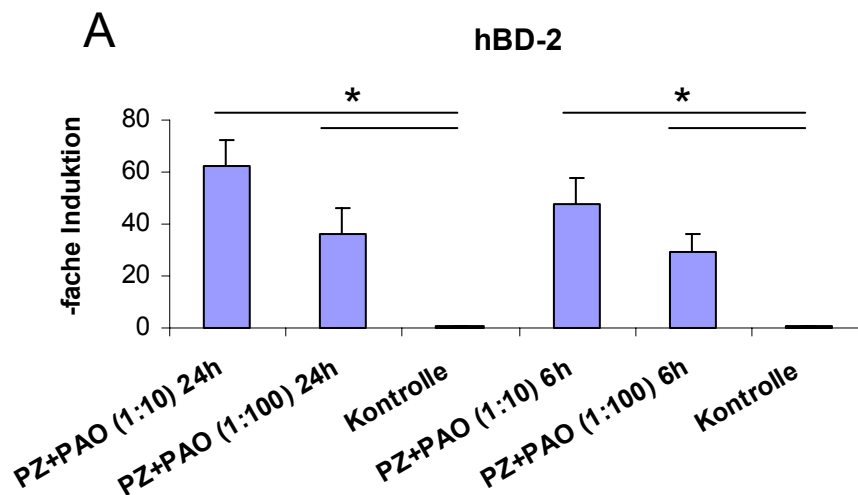
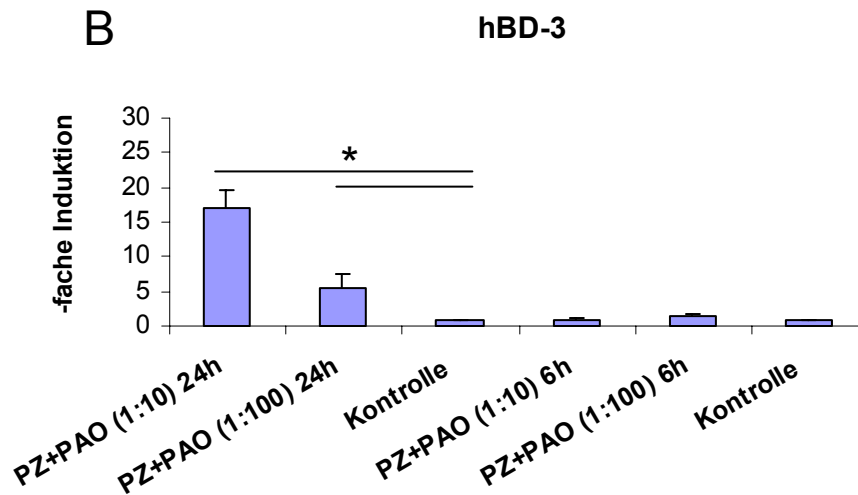
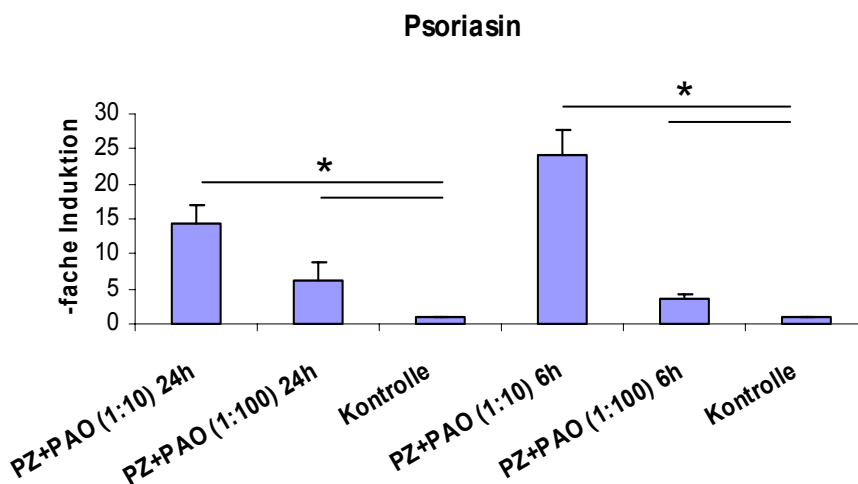


Abbildung 14 A: Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen mit *Pseudomonas aeruginosa* führt zu einer erhöhten Induktion von hBD-2.

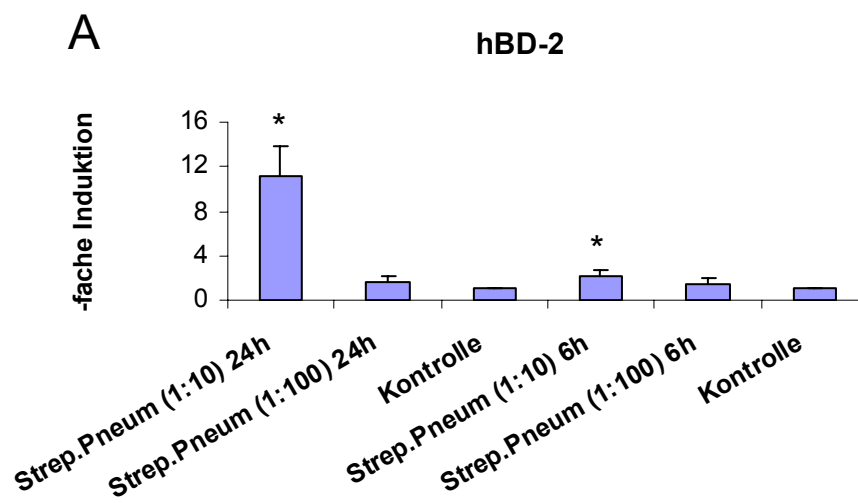


**Abbildung 14 A+B: Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen mit *Pseudomonas aeruginosa* führt zu einer erhöhten Induktion von hBD-2 (A) und hBD3 (B).** Die Zellen wurden mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* kur (PAO) in unterschiedlicher Verdünnung von 1:10 und 1:100, jeweils 6 und 24 Stunden stimuliert. Die Induktion von hBD-2 mRNA wurde mittels RT-PCR gemessen. Signifikante Unterschiede von  $P < 0,05$  wurden mit \* markiert ( $n = 4$ ).

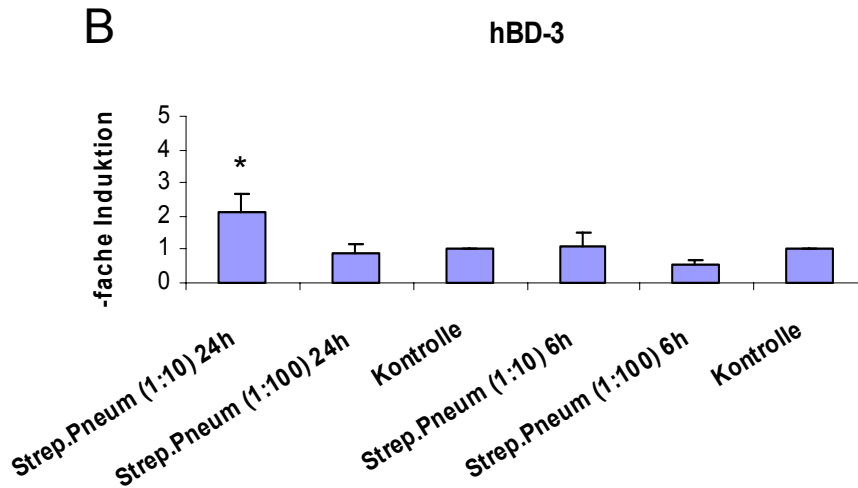


**Abbildung 15: Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* führt zu einer gesteigerten Induktion von Psoriasisin in primären Atemwegsepithelzellen.** Primäre Atemwegsepithelzellen (PZ) wurden mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* kur (PAO) in unterschiedlicher Verdünnung von 1:10 und 1:100, jeweils 6 und 24 Stunden stimuliert. Die Induktion der Psoriasisin mRNA Expression wurde mittels RT-PCR gemessen. Signifikante Unterschiede von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 4$ ).

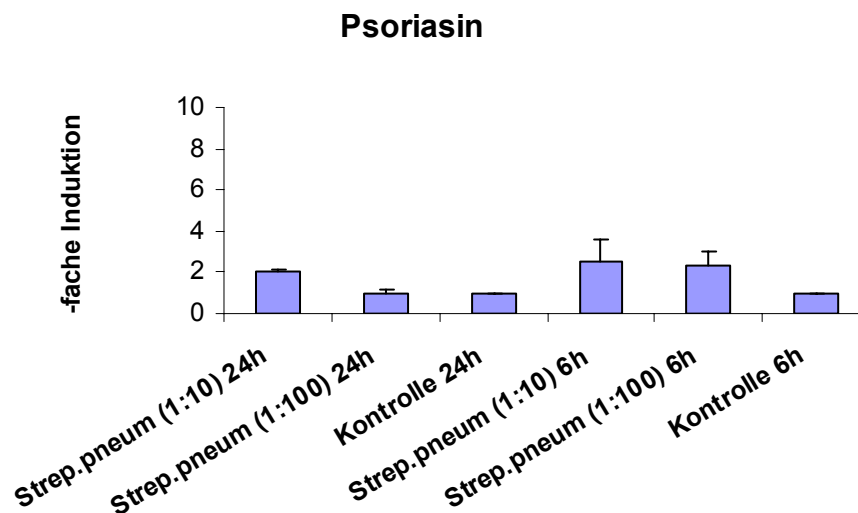
In mit *Streptococcus pneumoniae* stimulierten primären Atemwegsepithelzellen wurde Psoriasin exprimiert, allerdings nur in geringem Maße (Abb. 17). Es erfolgte bereits nach 6 stündiger Stimulationszeit eine leichte Induktionssteigerung, die nach 24 Stunden noch in geringem Maße bestand. hBD-2 zeigte ebenfalls eine geringe Induktionssteigerung, die nach 24 Stunden größer war als nach 6 Stunden (Abb. 16 A). hBD-3 wies nur geringe signifikante Werte in Bezug auf eine Induktionssteigerung nach 24 Stunden auf (Abb. 16 B). Im Hinblick auf hBD-1 konnte erneut eine konstitutive Expression, allerdings keine Induktionssteigerung in stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Bei den restlichen antimikrobiellen Peptiden Dermcidin, Lactoferrin, Histatin 1, Histatin 3 und hBD-4 kam es zu keinem signifikanten Induktionanstieg.



**Abbildung 16 A:** Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* k führt zu einer Steigerung von hBD-2 (A) in primären Atemwegsepithelzellen.



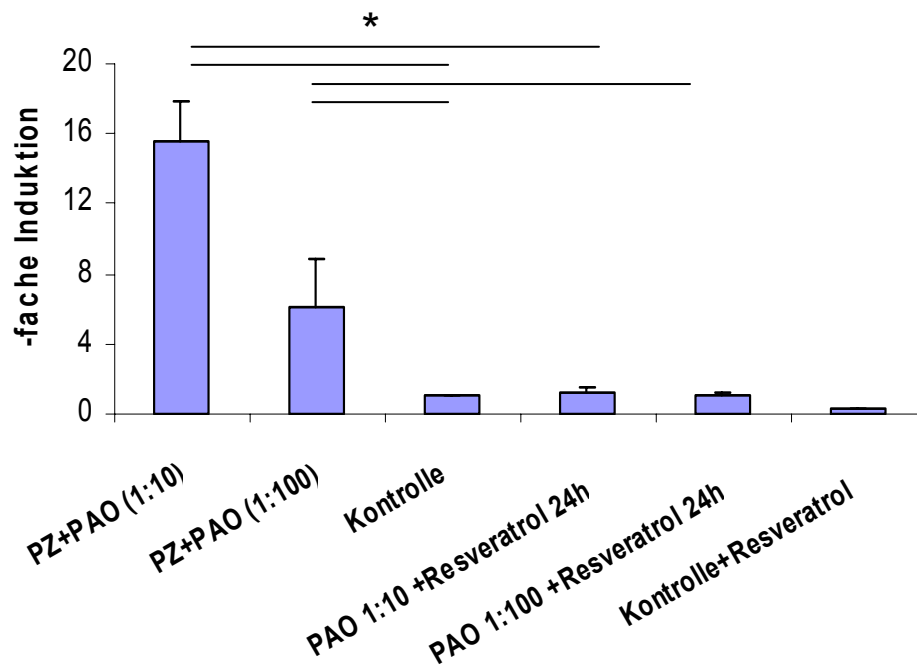
**Abbildung 16 A+B: Stimulation mit Streptococcus pneumoniae k führt zu einer Steigerung von hBD-2 (A) und in geringerem Maße von hBD-3 (B) in primären Atemwegsepithelzellen.** Die Zellen wurden mit hitzeinaktivierten Streptococcus pneumoniae k (PN36) in unterschiedlicher Verdünnung von 1:10 und 1:100, für jeweils 6 und 24 Stunden stimuliert. Die Induktion der hBD-2 und hBD-3 mRNA Expression wurde mittels RT-PCR gemessen. Signifikante Unterschiede von  $p < 0,05$  zur jeweiligen Kontrolle sind mit \* markiert (n=4).



**Abbildung 17: Stimulation mit Streptococcus Pneumoniae führt zu keiner signifikanten Steigerung von Psoriasisin in primären Atemwegsepithelzellen.** Die Zellen wurden mit hitzeinaktivierten Streptococcus pneumoniae k (PN36) in unterschiedlicher Verdünnung von 1:10 und 1:100, für jeweils 6 und 24 Stunden stimuliert. Die Induktion der Psoriasisin mRNA Expression wurde mittels RT-PCR gemessen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass Psoriasin nicht nur im Epithel der Haut, sondern auch im Atemwegsepithel exprimiert wird. Bei Kontakt mit gram-negativen bakteriellen Erregern, in diesem Falle *Pseudomonas aeruginosa*, wurde Psoriasin bereits früh induziert. Die Induktion fiel im weiteren Verlauf nach 24 Stunden bereits wieder ab. hBD-3 hingegen wurde später induziert und verzeichnete nach 24 Stunden erst einen deutlichen Anstieg. In mit *Streptococcus pneumoniae* stimulierten Atemwegsepithelzellen kam es allerdings zu keinem signifikanten Anstieg der Psoriasin-Induktion. hBD-1 wies eine konstitutive Expression in primären Atemwegsepithelzellen auf, ohne dass eine Induktionssteigerung durch einen der beiden Erreger auslösbar war.

Nachdem das Vorkommen von Psoriasin im Atemwegsepithel nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, auf welchem Signalweg seine Induktion zustande kommt. Hierfür wurde Resveratrol verwendet, ein Antioxidans, das zu den Polyphenolen gehört und in pflanzlichen Lebensmitteln, zum Beispiel Trauben, enthalten ist. Resveratrol inhibiert selektiv die Kinasen TBK1 und RIP1, die ein essentieller Bestandteil des TRIF Signalweges sind [172]. Die Signaltransduktion des MyD88 unabhängigen Signalwegs verläuft über das Adapterprotein TRIF. Dieser TRIF Signalweg wird selektiv durch Resveratrol inhibiert. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Expression von Psoriasin und hBD-3 durch Resveratrol beeinflusst wird. Es wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit Resveratrol [50µM] vorinkubiert und anschließend mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Expression von Psoriasin und hBD-3 untersucht. In den Zellen, die nicht mit Resveratrol inkubiert wurden, fand eine erwartungsgemäße Induktionssteigerung von Psoriasin statt. In jenen mit Resveratrol inkubierten Zellen allerdings erfolgte lediglich eine sehr geringe Expression von Psoriasin (Abb. 18). hBD-3 hingegen zeigte keine Beeinträchtigung in seiner Expression auf (Daten nicht aufgeführt). In Zellen mit und ohne Inkubation von Resveratrol erfolgte eine deutliche Induktionssteigerung von hBD-3. Somit kann man von einer inhibierenden Wirkung von Resveratrol auf Psoriasin sprechen, was darauf hinweist, dass die Psoriasin-Induktion auf dem TRIF vermittelten Signalweg abläuft.



**Abbildung 18: Auswirkung von Resveratrol auf die Induktion von Psoriasin in mit *Pseudomonas aeruginosa* stimulierten Atemwegsepithelzellen.** Primäre Atemwegsepithelzellen wurden mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* (PAO) in unterschiedlicher Verdünnung von 1:10 und 1:100 jeweils 24 Stunden stimuliert. In einem weiteren Ansatz wurden zusätzlich die primären Atemwegsepithelzellen Resveratrol [50µM] vorinkubiert. In Zellen ohne Resveratrol wurde Psoriasin erwartungsgemäß induziert. In jenen Zellen mit dem Zusatz von Resveratrol, konnte keine Induktion von Psoriasin nachgewiesen werden. Die Induktion von Psoriasin und hBD-3 gegenüber den nichtstimulierten Zellen wurde mittels RT-PCR, Normierung auf  $\beta$ -actin und der  $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 4$ ).

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl das Atemwegsepithel als auch Endothelzellen Toll-like Rezeptoren exprimieren und somit aktiv an der angeborenen Immunität beteiligt sind. Sie sind imstande, bakterielle und virale Bestandteile direkt zu erkennen und eine Immunreaktion durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in die Wege zu leiten. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit die Expression des antimikrobiellen Peptids Psoriasin (S100A7) im Atemwegsepithel nachgewiesen werden.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war es, die Expression von Toll-like Rezeptoren in unterschiedlichen Zelllinien des Atemwegsepithels und deren Reaktion auf bestimmte bakterielle und virale Bestandteile zu untersuchen. Das Ziel bestand darin, systematisch die Expression von Toll-like Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien des Atemwegsepithels miteinander zu vergleichen. Primärzellen an sich sind imstande Toll-like Rezeptoren zu exprimieren, allerdings bestehen deutliche Expressionsunterschiede im Vergleich mit spezifischen Zelllinien des Lungenepithels. Da Endothelzellen wie Epithelzellen eine Grenzfläche darstellen, wurde zusätzlich in diesem Rahmen untersucht, ob Endothel ebenfalls Toll-like Rezeptoren exprimiert und wie diese auf die Stimulation mit bestimmten Liganden reagieren.

Des Weiteren wurde die Induktion bestimmter antimikrobieller Peptide im Atemwegsepithel durch die Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt auf bereits bekannten antimikrobiellen Peptiden der Haut. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass Psoriasin (S100A7) von Atemwegsepithelzellen exprimiert wird.

### **Unterschiedliche Zelllinien des Atemwegsepithels exprimieren Toll-like Rezeptoren**

Die Funktion des Atemwegsepithels geht weit über die einer rein physikalischen Barriere hinaus [11; 156]. Im Laufe der letzten Jahre rückte die Rolle des Atemwegsepithels in der angeborenen Immunität in den Mittelpunkt zahlreicher Studien. Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen kommt den Toll-like Rezeptoren zu. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Zelllinien im Atemwegsepithel Toll-like Rezeptoren exprimieren und somit die Möglichkeit, auf unterschiedliche Pathogene zu reagieren, haben. Diesbezüglich sollte die Vergleichbarkeit der Zelllinien analysiert werden, auch unter dem Gesichtspunkt einer Verwendung für zukünftige Studien. Die folgende Tabelle (Tab. 3) stellt die sich ergebenden Unterschiede bezüglich der untersuchten Zelllinien dar.

Zelllinie Rezeptor	HAE	HBE	MM-39	BEAS-2B	Calu-3	PZ in FK	PZ ALI
<b>TLR-1</b>	2	3	2	2	2	3	4
<b>TLR-2</b>	0	1	3	2	3	3	3
<b>TLR-3</b>	2	4	3	3	3	3	4
<b>TLR-4</b>	3	1	3	3	2	2	3
<b>TLR-5</b>	1	2	2	0	3	3	4
<b>TLR-6</b>	1	2	1	1	0	1	1
<b>TLR-7</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>TLR-8</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>TLR-9</b>	0	1	0	0	1	1	0
<b>TLR-10</b>	0	2	0	0	1	0	2

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Expressionswerte von TLR 1-10 in den untersuchten Zelllinien. Semiquantitative Darstellung der Werte: 0 =  $< 1^{-06}$  ; 1 =  $1^{-06} - 1^{-05}$  ; 2 =  $1^{-05} - 1^{-04}$  ; 3 =  $1^{-04} - 1^{-03}$  ; 4 =  $> 1^{-03}$**

Diese Ergebnisse weichen ab von denen früherer Studien, deren Ergebnisse eine Expression aller TLR 1-10 in Primärzellen und BEAS-2B ergab [128], wobei TLR 7, 8 und 10 in letzterer Zelllinie nur äußerst schwach exprimiert waren. Eine Expression der TLR 7, 8 und 9 konnte,



wie in Tabelle 4 ersichtlich, in keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Eine andere Studie wies die TLR 1-6 und 9 in HBE nach [55]. Diese Daten konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt und um den Nachweis von TLR 10 sogar ergänzt werden. Selbst die etwas schwache Expression von TLR 4 war in beiden Studien vergleichbar. Bei Betrachtung der Primärzellen ergab sich ein interessantes Ergebnis bezüglich TLR 10. Die *air liquid interface* Kulturen mit Flimmerepithel, welche unter respirationstraktähnlichen Bedingungen angezogenen wurden, exprimierten TLR 10, aber nicht TLR 9. In primären Atemwegsepithelzellen in Flüssigkultur hingegen wurde TLR 9 exprimiert, allerdings nicht TLR 10. Da über TLR 10 bis heute immer noch nicht viel bekannt ist und sein Ligand noch nicht bestimmt werden konnte, bleibt die Bedeutung dieses Ergebnisses zunächst unklar. Die Drüsenzelllinie MM-39 wurde bezüglich ihrer TLR Expression zuvor noch nicht untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Zelllinie von Ihrer Expressionsstärke im Bereich TLR 1-6 der von Primärzellen in Flüssigkultur nahe kommt und somit eine sinnvolle Zelllinie für weitere Studien im Rahmen der Abwehr des Atemwegsepithels darstellt. Für die Zelllinie Calu-3 wurde zuvor eine Expression von TLR 2, 4 und 9 nachgewiesen [66; 113]. Auch wenn die Expression von TLR 9 nur schwach ausgeprägt war, so konnten diese Ergebnisse nicht nur bestätigt sondern ebenfalls um den Nachweis der Rezeptoren TLR 1, 3, 5 und TLR 10 ergänzt werden. Die Expressionsstärke der TLR ist mit der von Primärzellen in Flüssigkultur vergleichbar, was diese Zelllinie wertvoll für weitere Studien bezüglich der epithelialen Immunabwehr der Lunge macht.

Insgesamt wird ein Unterschied in der Expression in Primärzellen und speziellen Zelllinien des Atemwegsepithels deutlich (Tab. 3). Frühere Studien zeigten, dass die Stimulation von Atemwegsepithelzellen mit Keimen und TLR Liganden zu einer Expression und Abgabe von Zytokinen und Chemokinen führt [128].

***Endothelzellen exprimieren Toll-like Rezeptoren und werden durch TLR Liganden aktiviert***

Es stellte sich nun die Frage, ob Endothelzellen ebenfalls Toll-like Rezeptoren exprimieren, da diese ebenfalls eine Grenzfläche darstellen und immunologisch wichtig sind bei hämatogener Aussaat. Aktuelle Studien zeigen, dass beispielsweise das Bakterium *Legionella pneumoniae* imstande ist, Endothelzellen zu infizieren, und diese Infektion des Endothels möglicherweise eine wichtige Rolle bezüglich hämatogener Aussaat und Lungenschädigungen im Verlauf der Legionärskrankheit spielt [28]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass *Haemophilus influenzae* zu einer Infektion des Endothels führen und dort Apoptose induzieren kann [141]. Des Weiteren besteht die Hypothese einer Auswirkung von *Chlamydia pneumoniae* auf die Genese der Arteriosklerose [139], welche allerdings noch nicht belegt werden konnte. Es scheint jedoch ein Zusammenhang zwischen *Chlamydia pneumoniae* und erneut auftretenden kardiovaskulären Komplikationen nach perkutaner Intervention zu bestehen [117]. In aktuellen Studien an Mäusen zeichnet sich eine Beteiligung von TLR 2 und TLR 4 an der Genese der Arteriosklerose immer deutlicher ab [34, 148].

Zu diesem Zweck wurden primäre Endothelzellen aus HUVEC (human umbilical vein cells) angezogen, und teilweise mit TLR Liganden stimuliert, um zu untersuchen, ob die Toll-like Rezeptoren konstitutiv exprimiert oder induziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte in diesen Zellen die Expression der TLR 1, 2, 3, 4, 5 und 6 nachgewiesen werden. Hierbei wies TLR 5 kaum Unterschiede bezüglich seiner Expression in stimulierten oder unstimulierten Zellen auf, was auf eine konstitutive Expression hindeutet. Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob diese Toll-like Rezeptoren auch durch bestimmte Pathogene aktiviert werden. Zur Stimulation wurden MALP 2 für TLR 2 / 6, Poly (I:C) für TLR 3, LPS aus *Escherichia coli* für TLR 4 und Flagellin aus *S. typhimurium* für TLR 5 verwendet. MALP 2 zeigte eine geringe, signifikant erhöhte Abgabe von IL-8 und IL-6, was die Expression von TLR 2 und TLR 6 bestätigt. Letzterer erweitert als Heterodimerbildner von TLR 2 das jeweilige Wirkspektrum durch noch differenziertere Erkennung von Pathogenen, im

vorliegenden Fall von MALP 2 um die Erkennung verschiedener Stämme von *Mycoplasmen*. Das Vorkommen von TLR 2 und TLR 4 in HUVEC sowie deren Ansprechen auf LPS konnte bereits in vorherigen Studien nachgewiesen werden [40; 41; 146]. Jene Ergebnisse decken sich teilweise mit denen dieser Arbeit, denn die Stimulation mit LPS führte zu einer deutlich signifikanten Steigerung der IL-8- und IL-6 Abgabe, was die Expression von TLR 4 sowie dessen Fähigkeit den MyD88 abhängigen Weg zu aktivieren belegt. In der vorliegenden Arbeit war die Expression von TLR 9 so gering, dass sie als vernachlässigbar gewertet wurde. Eine aktuelle Studie konnte eine verstärkte Expression von TLR 9 in HUVEC nachweisen [122]. In dieser Studie wurde allerdings das Zellmaterial Neugeborener von Müttern mit Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) untersucht. Dies ist wahrscheinlich die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse, da die Autoren ihre Ergebnisse unter anderem dem pro-inflammatorischen Zustand der SLE HUVEC zusprachen.

Neue Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind zum einen die Expression von TLR 5 und eine durch ihn induzierte Abgabe von IL-8 und IL-6 in mit Flagellin stimulierten HUVEC. Der TLR 5 Ligand stellt den wichtigsten Reiz bei der Erkennung gram-negativer Bakterien, zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa*, dar [97; 114]. Zum anderen wurde die Expression des Heterodimerbildners TLR 6 in HUVEC zuvor noch nicht beschrieben, der das Wirkspektrum von TLR 2 ergänzt, dessen Bedeutung als epithelialer Rezeptor für die Erkennung gram-positiver Bakterien unbestritten ist [36; 131]. Des Weiteren wurde eine Expression von TLR 3 in HUVEC ebenfalls noch nicht beschrieben. Seine Stimulation mit dem Liganden Poly (I:C) führt jedoch nicht zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung von IL-8 oder IL-6. TLR 3 aktiviert ausschliesslich den MyD88 unabhängigen Weg, über den nicht nur NF- $\kappa$ B, sondern auch der Transkriptionsfaktor IRF3 aktiviert wird, welcher die Induktion anderer Gene reguliert (Abb. 1). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der von Endothelzellen exprimierte TLR 3 bei Stimulation nicht zu einer TRIF/RIP1- vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Ob es in diesem Zusammenhang über TRIF zu einer Aktivierung der IKK

Kinasen, IKK $\epsilon$  und TBK1, zu einer Translokation von IRF3 kommt, wäre ein Ansatz für zukünftige Studien. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass HUVEC-Endothelzellen durch die Expression der TLR 1, 2, 4, 5 und 6 ein relativ breites Wirkspektrum gegen bakterielle Pathogene aufweisen (Tab. 1). Ergänzend erkennt der TLR 3 doppelsträngige RNA von Viren, was das Wirkspektrum noch erweitert. Aktuelle Studien zur Pathogenese der Arteriosklerose haben bisher TLR 2 und TLR 4 betrachtet. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wäre ein Ansatz für zukünftige Studien, zu analysieren, ob weitere TLR eine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose einnehmen.

### ***Atemwegsepithelzellen exprimieren Psoriasin***

Es ist bekannt, dass durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren antimikrobielle Peptide freigesetzt werden können. Das Vorkommen mehrerer antimikrobieller Peptide im Atemwegsepithel ist bereits bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das antimikrobielle Peptid Psoriasin (S100A7), das nachweislich in Keratinozyten der Haut gebildet wird, auch in Atemwegsepithelzellen vorkommt. Für die Versuche wurde jeweils ein gram-negatives, *Pseudomonas aeruginosa*, und ein gram-positives, *Streptococcus pneumoniae*, Bakterium verwendet, das häufig zu Infektionen im Respirationstrakt führt. Es wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit den jeweiligen hitzeinaktivierten Erregern in unterschiedlichen Verdünnungen für jeweils 6 und 24 Stunden stimuliert. Vergleichsweise wurden einige AMP analysiert, die für das Atemwegsepithel bereits beschrieben wurden, die  $\beta$ -Defensine hBD-2 und hBD-3. In größeren Ansätzen wurde zunächst sondiert, ob eine bestimmte Auswahl von AMP der Haut im Atemwegsepithel exprimiert wird. Dermcidin, Histatin 1, Histatin 3, hBD-4 und Lactoferrin zeigten weder in stimulierten noch in unstimulierten Primärzellen des Atemwegsepithels einen signifikanten Induktionsanstieg. Lediglich hBD-1 zeigte eine erwartungsgemäße konstitutive Expression in primären Atemwegsepithelzellen, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt [89; 176]. Diesbezüglich wurde auch keine signifikante

Induktionssteigerung durch Stimulation mit den oben genannten Erregern ausgelöst. Eine Studie beschreibt das Vorkommen von Lactoferrin im Respirationstrakt [89]. Dort wurde allerdings, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, Atemwegsflüssigkeit, airway surface fluid (ASF), untersucht, was wahrscheinlich die Ursache für das unterschiedliche Ergebnis ist. Mit dem Vorkommen von Lactoferrin im Atemwegsepithel befassten sich Dubin et al., die die Zelllinien HTE (human tracheal epithel), 16HBE14o und Calu-3 verwendeten, allerdings keinen Nachweis erzielen konnten, außer sehr geringer Werte bezüglich HTE. Sie beschrieben in ihrer Studie die Freisetzung von Lactoferrin als refraktär gegenüber einer Vielfalt von neurohumoralen Mediatoren und inflammatorischen Reizstoffen, wie LPS, Methacholin, Forskolin, ATP und neutrophiler Elastase, was eine weitere Erklärung für die vorliegenden Resultate liefert. hBD-4 konnte ebenfalls in einer anderen Studie im Lungengewebe des unteren Respirationstrakts nachgewiesen werden [166]. Zum einen wurde in diesem Zusammenhang allerdings die Zelllinie SAEC (small airway epithelial cells) verwendet, zum anderen untersuchte man die hBD-4 Expression im Atemwegssekret von Patienten mit chronischen Infekten des unteren Respirationstrakts, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklärt. Des Weiteren wurde in dieser Studie beschrieben, dass eine gewisse Vorstimulation notwendig war, um eine hBD-4 Expression durch Kontakt mit Pathogenen zu bewirken, was eine weitere Erklärung liefert. In dieser früheren Studie konnte somit durch die Stimulation mit bestimmten Pathogenen auch keine spontane Freisetzung von hBD-4 erzielt werden, was mit den vorliegenden Resultaten kongruent ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von Psoriasin (S100A7) in primären Atemwegsepithelzellen nachgewiesen werden. In mit *Pseudomonas aeruginosa* stimulierten Zellen erfolgte eine deutlich signifikante Induktion von Psoriasin. In früheren Studien konnte eine erhöhte Psoriasin Expression in Hautbereichen mit verstärkter bakterieller Kolonisation nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Wirksamkeit von Psoriasin gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*

beschrieben [53]. Einige dieser Resultate decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Induktion von Psoriasin erfolgte nur in Atemwegsepithelzellen, die mit *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert wurden. In jenen Zellen, die mit *Streptococcus pneumoniae* stimuliert wurden, blieb eine signifikante Induktion aus, was allerdings kein überraschendes Ergebnis war, da bisher noch keine Wirkung oder Reaktion von Psoriasin auf gram-positive Bakterien beschrieben wurde. Es bestand ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Stärke der jeweiligen Induktion und der Erregerkonzentration. Nach verhältnismäßig kurzer Stimulationszeit mit einer höheren Konzentration von *Pseudomonas aeruginosa*, erfolgte eine hohe Induktion von Psoriasin. Weitere Versuche zeigten, dass die Stimulation mit einer niedrigeren Erregerkonzentration zunächst einen langsameren Induktionsanstieg verzeichnete, welcher allerdings stetig weiter verlief und über einen längeren Zeitraum bestehen blieb als im Fall der höheren Erregerkonzentration. Dies lässt darauf schlussfolgern, dass eine höhere Erregerkonzentration zu einer schnellen Induktion von Psoriasin führt, wohingegen eine geringere Konzentration von Erregern erst länger auf die Atemwegsepithelzellen einwirken muss, um den jeweiligen Reiz zur Induktion zu erreichen. Somit weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Geschwindigkeit und Intensität der Psoriasin-Induktion in Atemwegsepithelzellen von der Erregerkonzentration und der Dauer des Erregerkontaktes abhängt. hBD-2 und hBD-3 zeigten erwartungsgemäße Ergebnisse auf. Ihre Expression im Atemwegsepithel und ihr Wirkspektrum wurden in früheren Studien bereits untersucht [64; 124; 137], deren Ergebnisse sich mit denen dieser Arbeit decken. hBD-2 wird vornehmlich eine große Aktivität gegen gram-negative Bakterien zugesprochen, insbesondere gegen *Pseudomonas aeruginosa*, weniger gegen gram-positive Erreger. Die Resultate zeigen zwar eine Expression von hBD-2 durch Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae*, allerdings ist diese viel geringer als jene, die durch *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst wurde. Des Weiteren sagt diese Expression nichts über die tatsächliche antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Erreger aus, da insbesondere einige gram-positive Erreger Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Defensinen

aufweisen [43]. Für hBD-3 wird ein relativ breites Wirkspektrum gegen sowohl gram-negative, als auch gram-positive Erreger beschrieben. Die relativ geringe hBD-3-Induktion im Zusammenhang mit der Stimulation durch *Streptococcus Pneumoniae* lässt sich anhand der Ergebnisse einer aktuellen Studie erklären, bei deren Forschungen sich herausstellte, dass aufgrund der vorherrschenden Insensitivität im Atemwegsepithel, infolge eines ständigen Erregerkontaktes, eine verstärkte Induktion von hBD-3 erst durch eine Vorinkubation mit Makrophagen-Medium erfolgte [eigene Daten, submitted]. Auch in diesen Versuchsreihen zeigte hBD-3 nur eine geringe Induktionssteigerung durch Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae*.

Um genaueres über die Signaltransduktion von Psoriasin herauszufinden, wurde die Auswirkung von Resveratrol auf Psoriasin, und im Vergleich auf hBD-3 analysiert. Das pflanzliche Polyphenol Resveratrol inhibiert selektiv die Kinasen TBK1 und RIP1, welche essentielle Bestandteile des TRIF Signalweges sind, und die Translokation von NF- $\kappa$ B und IRF3 bewirken [172]. Zu diesem Zweck wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit Resveratrol vorinkubiert und im Anschluss 24 Stunden mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert. Die Induktion von hBD-3 wurde erwartungsgemäß nicht beeinflusst, da diese MyD88 abhängig verläuft. Die Induktion von Psoriasin hingegen wurde durch Resveratrol nahezu vollständig inhibiert. In Atemwegsepithelzellen, die mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert und nicht mit Resveratrol vorinkubiert wurden, erfolgte eine erwartungsgemäße Induktion von Psoriasin. In jenen Zellen, die mit Resveratrol vorinkubiert wurden, konnte keine signifikante Steigerung der Psoriasin-Induktion mehr gemessen werden. In früheren Studien wurde ein inhibierender Effekt von Resveratrol auf den MyD88 unabhängigen-, nicht jedoch auf den MyD88 abhängigen Signalweg festgestellt. Folglich wurden auch inhibierende Effekte auf die Aktivierung von TLR 3 und TLR 4 beschrieben [172]. Somit sind die vorliegenden Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass Psoriasin über den TRIF Signalweg induziert, und diese Signaltransduktion über TLR 3 und TLR 4 aktiviert werden kann. Dies ergänzt sich mit Ergebnissen früherer Studien, in denen Keratinozyten Psoriasin exprimierten, nachdem

sie mit einem Adenovirus stimuliert worden waren [25]. TLR 3 wird in Keratinozyten exprimiert [90] und erkennt bekanntlich doppelsträngige DNA von Viren, was den TRIF Signalweg aktiviert.

### ***Schlussbemerkung***

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Atemwegsepithel aktiv an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist. Es ist mit Hilfe der Toll-like Rezeptoren imstande, bestimmte Pathogene zu detektieren und durch die Abgabe von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden die Immunantwort aktiv mitzugestalten. Allerdings wurde nicht nur eine breite Expression von Toll-like Rezeptoren in mehreren Zelllinien des Atemwegsepithels nachgewiesen, sondern auch in Endothelzellen, wo sie ebenfalls die Immunantwort aktiv mitgestalten. Es zeigten sich hier gewisse Unterschiede in Expression und Aktivität der Toll-like Rezeptoren im Vergleich zum Atemwegsepithel. Die Tatsache, dass Endothel an der angeborenen Immunität durch Toll-like Rezeptoren beteiligt ist, steht jedoch außer Frage. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort, sind Toll-like Rezeptoren in der Lage antimikrobielle Peptide im Atemwegsepithel zu exprimieren. Die Resultate zeigen, dass mit Psoriasin (S100A7) ein weiteres antimikrobielles Peptid vom Atemwegsepithel induziert werden kann. In früheren Studien wurde bereits einiges über die Aktivität von Psoriasin in der Haut beschrieben.



## 5. Zusammenfassung

Das Atemwegsepithel bildet eine Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und unserer Umwelt. Es ist einerseits eine physikalische Barriere und verhindert das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen und Fremdkörpern. Andererseits ist es aber auch aktiv an der angeborenen Immunität beteiligt. In diesem Zusammenhang spielt die Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Komponenten der angeborenen Immunantwort des Respirationstrakts und des Atemwegsepithels zu untersuchen. Hierbei lag das spezifische Augenmerk auf der Expression von Toll-like Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien und der Regulation antimikrobieller Peptide.

Zunächst wurde die Expression von TLRs systematisch in unterschiedlichen Zelllinien des Atemwegsepithels untersucht und mit der TLR Expression in Primärzellen verglichen. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Zelllinien des Atemwegsepithels Toll-like Rezeptoren exprimieren und sich durch Pathogene sowie deren Bestandteile aktivieren lassen, was zu einer Induktion pro-inflammatorischer Zytokine führte. Es wurde allerdings auch deutlich, dass sich diese Expression von der in Primärzellen teilweise unterscheidet. Nachdem eine Expression von Toll-like Rezeptoren in verschiedenen Epithelzellen nachgewiesen war, wurde als nächstes die Expression von TLR in Endothelzellen untersucht, da diese ebenfalls eine Grenzfläche darstellen und somit ebenfalls eine Schutzfunktion haben. Auch hier zeigte sich, dass Endothelzellen imstande sind TLR zu exprimieren und sich durch pathogene Bestandteile aktivieren lassen.

Eine Abwehrreaktion des Atemwegsepithels auf bakterielle Erreger besteht unter anderem in der Induktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP). Toll-like Rezeptoren sind in der Lage, neben der Induktion von Zytokinen und Chemokinen, auch die von antimikrobiellen Peptiden einzuleiten. Das Vorkommen einiger AMP im Respirationstrakt konnte

bereits in früheren Studien nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von AMP im Respirationstrakt untersucht, die bisher nur im Hautepithel nachgewiesen wurden, und mit jenen, welche im Respirationstrakt vorkommen, verglichen. So konnte gezeigt werden, dass das antimikrobielle Peptid Psoriasin (S100A7) im Atemwegsepithel exprimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene Zelllinien des Atemwegsepithels TLR exprimieren und sich diese Expression von der in Primärzellen teilweise unterscheidet. Des Weiteren wurde gezeigt dass Endothelzellen ebenfalls diverse TLR exprimieren und aktiv an der angeborenen Immunität beteiligt sind. Darüber hinaus konnte die Expression des AMP Psoriasin (S100A7) im Atemwegsepithel nachgewiesen werden.

## Literatur

- (1) 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 May;30(5):627-34.
- (2) 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 Jul;32(7):1958-68.
- (3) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004 Jul;4(7):499-511.
- (4) Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. J Invest Dermatol 2001 Jul;117(1):106-11.
- (5) Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. Biopolymers 1998;47(6):415-33.
- (6) 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 Sep;23(9):1511-8.
- (7) 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 Aug 4;95(16):9541-6.

- 
- (8) Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998 Sep 1;102(5):874-80.
  - (9) Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999 Feb;103(3):303-7.
  - (10) 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 Jul;25(1):21-5.
  - (11) Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004 Feb;23(2):327-33.
  - (12) Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Shinohara Y, Herzberg MC, Ross KF, et al. Interleukin-1alpha regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. *Immunol Cell Biol* 2007 Oct;85(7):532-7.
  - (13) Beisswenger C, Bals R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr Protein Pept Sci* 2005 Jun;6(3):255-64.
  - (14) Bell S, Degitz K, Quirling M, Jilg N, Page S, Brand K. Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal* 2003 Jan;15(1):1-7.
  - (15) Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1992 May 22;1121(1-2):130-6.
  - (16) Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol* 1992 Dec;73(6):472-9.

- 
- (17) Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol* 1993 May;182(2):97-105.
- (18) Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:393-416.
- (19) Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995 Jul 17;368(2):331-5.
- (20) Bingle CD, Craven CJ. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet* 2002 Apr 15;11(8):937-43.
- (21) Birchler T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 2001 Nov;31(11):3131-7.
- (22) Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:61-92.
- (23) Bowes D, Clark AE, Corrin B. Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax* 1981 Feb;36(2):108-15.
- (24) Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005 Mar;3(3):238-50.
- (25) Carlsson H, Yhr M, Petersson S, Collins N, Polyak K, Enerback C. Psoriasin (S100A7) and calgranulin-B (S100A9) induction is dependent on reactive oxygen species and is downregulated by Bcl-2 and antioxidants. *Cancer Biol Ther* 2005 Sep;4(9):998-1005.

- 
- (26) Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 2007 Feb;4(1):31-41.
- (27) Chen VL, France DS, Martinelli GP. De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1986 Nov;87(5):585-7.
- (28) Chiaraviglio L, Brown DA, Kirby JE. Infection of cultured human endothelial cells by *Legionella pneumophila*. *PLoS ONE* 2008;3(4):e2012.
- (29) Chuang TH, Lee J, Kline L, Mathison JC, Ulevitch RJ. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol* 2002 Mar;71(3):538-44.
- (30) Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 1995 Jul 10;368(1):173-6.
- (31) Cozens AL, Yezzi MJ, Chin L, Simon EM, Friend DS, Gruenert DC. Chloride ion transport in transformed normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 1991;290:187-94.
- (32) Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, et al. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 Jan;10(1):38-47.
- (33) Curtis JL. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(5):412-6.
- (34) Curtiss LK, Tobias PS. Emerging role of toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2008 Nov 1.

- 
- (35) Di SA, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002 Sep;20(3):556-63.
- (36) Dziarski R, Gupta D. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun* 2005 Aug;73(8):5212-6.
- (37) Egan LJ, Toruner M. NF-kappaB signaling: pros and cons of altering NF-kappaB as a therapeutic approach. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Aug;1072:114-22.
- (38) Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, et al. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 1999 Nov 19;286(5444):1561-5.
- (39) Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem* 1996 Aug 9;271(32):19298-303.
- (40) Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000 Apr 14;275(15):11058-63.
- (41) Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 2001 Feb 1;166(3):2018-24.
- (42) Felgentreff K, Beisswenger C, Griese M, Gulder T, Bringmann G, Bals R. The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus. *Peptides* 2006 Dec;27(12):3100-6.

- 
- (43) Fernie-King BA, Seilly DJ, Lachmann PJ. The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensins. *Immunology* 2004 Apr;111(4):444-52.
- (44) Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 Jun;4(3):281-6.
- (45) Gagliardo R, Chanez P, Mathieu M, Bruno A, Costanzo G, Gougat C, et al. Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Nov 15;168(10):1190-8.
- (46) Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Nov 8;91(23):11035-9.
- (47) Gallo RL, Huttner KM. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 1998 Nov;111(5):739-43.
- (48) Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985 Oct;76(4):1427-35.
- (49) Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001 Aug;15(10):1819-21.
- (50) Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2001 Aug;2(8):736-42.
- (51) Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003 Dec;24(12):652-8.



- 
- (52) Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003 Jun 6;300(5625):1584-7.
- (53) 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 Jan;6(1):57-64.
- (54) 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 Feb 21;88(4):553-60.
- (55) Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, et al. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol* 2005 Feb 1;174(3):1638-46.
- (56) Gruenert DC, Basbaum CB, Welsh MJ, Li M, Finkbeiner WE, Nadel JA. Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Aug;85(16):5951-5.
- (57) Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1995 Mar;268(3 Pt 1):L347-L360.
- (58) 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 Jun 1;238(2):325-32.

- 
- (59) Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, et al. 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 Jan 23;279(4):2712-8.
- (60) Guillot L, Le GR, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, et al. 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 Feb 18;280(7):5571-80.
- (61) Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997 Feb 8;349(9049):418-22.
- (62) Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Jun;43(6):1317-23.
- (63) Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997 Jun 26;387(6636):861.
- (64) Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, et al. 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 Jun;22(6):714-21.
- (65) Harder J, Schroder JM. Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* 2005;86:22-41.
- (66) Hauber HP, Tulic MK, Tsiopoulos A, Wallaert B, Olivenstein R, Daigneault P, et al. Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. *Can Respir J* 2005 Jan;12(1):13-8.
- (67) Hayashi T, Faustman DL. Role of defective apoptosis in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Recent Prog Horm Res* 2003;58:131-53.

- 
- (68) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996 Oct;6(10):986-94.
- (69) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004 Mar 5;303(5663):1526-9.
- (70) Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismuller KH, Godowski PJ, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 2003 Dec 15;171(12):6820-6.
- (71) Hilliard BA, Mason N, Xu L, Sun J, Lamhamedi-Cherradi SE, Liou HC, et al. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J Clin Invest* 2002 Sep;110(6):843-50.
- (72) Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, et al. Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Aug 28;249(3):943-7.
- (73) Huang HJ, Ross CR, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol* 1997 May;61(5):624-9.
- (74) Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 1999 Jun;45(6):785-94.
- (75) Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Kwon YK, Shin SW, Kim SC, et al. 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 Jul 30;320(3):1026-33.
- (76) Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 2001 Jan 24;263(1-2):211-8.

- 
- (77) 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. *J Immunol* 2004 Jan 15;172(2):1169-76.
- (78) Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 1992 Nov 15;267(32):23216-25.
- (79) Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 1993 Jan 4;315(2):187-92.
- (80) Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol* 2004 Sep 1;173(5):3482-91.
- (81) Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004 Jan;3(1):17-26.
- (82) Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005 Oct;5(10):749-59.
- (83) Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 2004 Mar;56(3):285-9.
- (84) Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, et al. 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 Nov 15;167(10):5887-94.

- 
- (85) Krensky AM. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Pharmacol* 2000 Feb 15;59(4):317-20.
- (86) 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 Jan 1;168(1):316-24.
- (87) 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 Jul 1;153(1):153-64.
- (88) Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995 Apr;63(4):1291-7.
- (89) Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G. Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;306:153-82.
- (90) Lebre MC, van der Aar AM, van BL, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 2007 Feb;127(2):331-41.
- (91) Lee KC, Eckert RL. S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds. *J Invest Dermatol* 2007 Apr;127(4):945-57.
- (92) Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 1991 Jan 25;64(2):229-30.
- (93) Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 1999 Feb;11(1):23-7.

- 
- (94) 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 Sep 20;86(6):973-83.
- (95) Lillehoj ER, Kim KC. Airway mucus: its components and function. *Arch Pharm Res* 2002 Dec;25(6):770-80.
- (96) 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 Dec;25(4):402-8.
- (97) Lopez-Boado YS, Cobb LM, Deora R. *Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. *Infect Immun* 2005 Nov;73(11):7525-34.
- (98) Mandal S, Curtis L, Pind M, Murphy LC, Watson PH. S100A7 (psoriasin) influences immune response genes in human breast cancer. *Exp Cell Res* 2007 Aug 15;313(14):3016-25.
- (99) Massion PP, Inoue H, Richman-Eisenstat J, Grunberger D, Jorens PG, Housset B, et al. Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1994 Jan;93(1):26-32.
- (100) McCray PB, Jr., Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 Mar;16(3):343-9.
- (101) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- (102) 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 Oct;15(4):520-8.

- 
- (103) Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004 May;5(5):503-7.
- (104) Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, et al. Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun* 2003 Jul;71(7):3730-9.
- (105) Moubayed N, Weichenthal M, Harder J, Wandel E, Sticherling M, Glaser R. Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007 Apr;133(4):253-61.
- (106) Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van HA, et al. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004 Jun;30(6):777-83.
- (107) Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993 May;155(2):408-13.
- (108) Nguyen TX, Cole AM, Lehrer RI. Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* 2003 Nov;24(11):1647-54.
- (109) Odell EW, Sarra R, Foxworthy M, Chapple DS, Evans RW. Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. *FEBS Lett* 1996 Mar 11;382(1-2):175-8.
- (110) Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988 Jun 5;263(16):7472-7.

- 
- (111) 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 Dec 12;278(50):49751-62.
- (112) Otvos L, Jr. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Pept Sci* 2005 Nov;11(11):697-706.
- (113) Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, et al. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2004 Jul 15;173(2):1219-23.
- (114) Prince A. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 May;34(5):548-51.
- (115) Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 1998 Jun;66(6):2791-7.
- (116) Radhakrishnan Y, Hamil KG, Yenugu S, Young SL, French FS, Hall SH. Identification, characterization, and evolution of a primate beta-defensin gene cluster. *Genes Immun* 2005 May;6(3):203-10.
- (117) Rahel BM, Visseren FL, Suttorp MJ, Plokker TH, Kelder JC, de Jongh BM, et al. Cytomegalovirus and Chlamydia pneumoniae as predictors for adverse events and angina pectoris after percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2004 Oct;148(4):670-5.
- (118) Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenemy MG, Lechner JF, Su RT, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 1988 Apr 1;48(7):1904-9.



- 
- (119) Rieg S, Garbe C, Sauer B, Kalbacher H, Schittek B. Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br J Dermatol* 2004 Sep;151(3):534-9.
- (120) Risso A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 2000 Dec;68(6):785-92.
- (121) Rodriguez-Jimenez FJ, Krause A, Schulz S, Forssmann WG, Conejo-Garcia JR, Schreeb R, et al. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* 2003 Feb;81(2):175-83.
- (122) Rodriguez E, Guevara J, Paez A, Zapata E, Collados MT, Fortoul TI, et al. The altered expression of inflammation-related molecules and secretion of IL-6 and IL-8 by HUVEC from newborns with maternal inactive systemic lupus erythematosus is modified by estrogens. *Lupus* 2008 Dec;17(12):1086-95.
- (123) Salinas D, Haggie PM, Thiagarajah JR, Song Y, Rosbe K, Finkbeiner WE, et al. Submucosal gland dysfunction as a primary defect in cystic fibrosis. *FASEB J* 2005 Mar;19(3):431-3.
- (124) Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, Jr., et al. 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.
- (125) Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2001 Dec;2(12):1133-7.

- (126) 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 Oct;46(1):157-68.
- (127) Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, et al. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Feb 19;99(4):2129-33.
- (128) 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 Sep;31(3):358-64.
- (129) Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Feb 17;95(4):1829-33.
- (130) Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ, Widdicombe JH. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion. *Am J Physiol* 1994 May;266(5 Pt 1):L493-L501.
- (131) Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J, et al. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J* 2006 Apr;20(6):782-4.
- (132) Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 8;95(25):14961-6.

- 
- (133) Smahi A, Courtois G, Rabia SH, Doffinger R, Bodemer C, Munnich A, et al. The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 2002 Oct 1;11(20):2371-5.
- (134) Smith KD, Ozinsky A. Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;270:93-108.
- (135) Sokolov Y, Mirzabekov T, Martin DW, Lehrer RI, Kagan BL. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. *Biochim Biophys Acta* 1999 Aug 20;1420(1-2):23-9.
- (136) Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001 Jun 15;97(12):3951-9.
- (137) Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB, Jr. Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol* 2005 Feb 1;174(3):1608-15.
- (138) Staubitz P, Neumann H, Schneider T, Wiedemann I, Peschel A. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol Lett* 2004 Feb 9;231(1):67-71.
- (139) Stille W, Stephan C. [Arteriosclerosis--an ultrachronic Chlamydia infection]. *Internist (Berl)* 2001 Sep;42(9):1189-5.
- (140) Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M. Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Aug 5;94(16):8686-90.

- 
- (141) Sumikoshi M, Hashimoto K, Kawasaki Y, Sakuma H, Suzutani T, Suzuki H, et al. Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. *J Med Virol* 2008 Jun;80(6):1072-8.
- (142) Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, Jr., O'Neill S, et al. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol* 2003 Jul 15;171(2):931-7.
- (143) Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001 Jan;107(1):7-11.
- (144) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
- (145) Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004 Feb;16(1):3-9.
- (146) Talreja J, Kabir MH, Filla B, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components. *Immunology* 2004 Oct;113(2):224-33.
- (147) Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 1999 Oct 15;286(5439):498-502.
- (148) Tobias PS, Curtiss LK. Toll-like receptors in atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2007 Dec;35(Pt 6):1453-5.
- (149) Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 2002 Jan;71(1):154-62.

- (150) Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, Takada H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 2007 May;44(12):3100-11.
- (151) Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr., Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998 Apr 15;101(8):1633-42.
- (152) van 't HW, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 2001 Apr;382(4):597-619.
- (153) Verkman AS, Song Y, Thiagarajah JR. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003 Jan;284(1):C2-15.
- (154) Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von MB, Schlee M, Enders C, et al. 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 Oct;72(10):5750-8.
- (155) 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 Jun;28(6):738-45.
- (156) Whitsett JA. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Invest* 2002 Mar;109(5):565-9.
- (157) Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jul 30;248(3):904-9.

- (158) Wingens M, van Bergen BH, Hiemstra PS, Meis JF, van Vlijmen-Willems IM, Zeeuwen PL, et al. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998 Dec;111(6):996-1002.
- (159) Wolfs TG, Buurman WA, van SA, de VB, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 2002 Feb 1;168(3):1286-93.
- (160) Wright JG, Christman JW. The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am J Respir Med* 2003;2(3):211-9.
- (161) Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999 Jun 1;38(22):7235-42.
- (162) Xiong YQ, Yeaman MR, Bayer AS. In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 May;43(5):1111-7.
- (163) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002 Nov 21;420(6913):324-9.
- (164) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003 Nov;4(11):1144-50.
- (165) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003 Aug 1;301(5633):640-3.

- 
- (166) Yanagi S, Ashitani J, Ishimoto H, Date Y, Mukae H, Chino N, et al. Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir Res* 2005;6:130.
- (167) Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999 Oct 15;286(5439):525-8.
- (168) Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000 Jul;68(1):9-14.
- (169) Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* 2001 Jun;58(7):978-89.
- (170) Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 2004;22:181-215.
- (171) Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003 Mar;55(1):27-55.
- (172) Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol* 2005 Sep 1;175(5):3339-46.
- (173) Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 1995 Oct 23;374(1):1-5.

- (174) Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002 Jan 24;415(6870):389-95.
- (175) Zhang H, Wang Y, Chen Y, Sun S, Li N, Lv D, et al. Identification and validation of S100A7 associated with lung squamous cell carcinoma metastasis to brain. *Lung Cancer* 2007 Jul;57(1):37-45.
- (176) Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996 Nov 4;396(2-3):319-22.
- (177) Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 2003 Apr 3;22(13):2054-64.



---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Daniel Stanze  
Geburtsdatum: 11.08.1978 in Hildesheim  
Familienstand: ledig  
Adresse: Sachsenhäuser Landwehrweg 265  
60598 Frankfurt  
Tel.: 069 – 13 82 31 66 o. 0151 - 56 35 11 78

### **Beruflicher Werdegang**

04/2009 – **Klinikum der Johann Wolfgang Goethe  
Universität Frankfurt am Main**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Zentrum für Innere  
Medizin, Medizinische Klinik II: Hämatologie und  
Onkologie, Rheumatologie, Infektiologie, Therapie  
der HIV-Erkrankung (Assistenzarzt in Weiterbildung  
zur Facharztanerkennung „Innere Medizin“) bei Herrn  
Prof. Dr. med. H. Serve

10/2007 – 03/2009 **Klinikum Fulda, Lehrkrankenhaus der Universität  
Marburg**  
Assistenzarzt zur Facharztanerkennung „Innere  
Medizin“ in der Abteilung für Hämatologie und  
internistische Onkologie bei Herrn Prof. Dr. med.  
H.-G. Höffkes

### **Hochschulausbildung**

25.06.2007 **Philipps-Universität Marburg**  
Approbation (Gesamtnote: -gut-)

10/2000 – 06/2007 **Philipps-Universität Marburg**  
**Studium der Humanmedizin**

---

## **Zivildienst**

08/1998 – 09/1999 Medizinischen Hochschule Hannover  
Abteilung Neurochirurgie  
Zivildienst

## **Schulbildung**

1991 – 1998 Besuch des Gymnasiums in Alfeld/Leine  
Abschluss: Abitur (Hochschulreife)

1985 – 1991 Besuch der Grundschule und Orientierungsstufe in  
der Grundschule am Wildfang mit der Empfehlung  
für das Gymnasium

---

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren

In Marburg:

Aumüller

Bals

Barth

Görg

Kohlmann

Kuhlmann

Maisch

Moll

Neubauer

Ritter

Röhm

Rothmund

Vogelmeier

Weihe

In Fulda:

Bonzel

Fassbinder

Höffkes

Jaspersen

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Robert Bals für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute fortwährende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie der Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Ich möchte Christian und Christoph danken, die mir vom ersten Tag an mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenso den guten Seelen des Labors: Thomas, Annette, Viktor und Katrin, für die Hilfe in jeglichen Laborfragen, sowie die aufmunternden Momente an grauen Labortagen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die immerwährende Unterstützung in privater, beruflicher und finanzieller Hinsicht und das in mich gesetzte Vertrauen.

---

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Systematische Analyse von Rezeptoren und Effektormechanismen der pulmonalen angeborenen Immunität“ im Klinikum der Philipps-Universität, Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Robert Bals mit Unterstützung durch die unten genannten Personen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Eine Unterstützung der Arbeit fand durch folgende Personen statt:

Prof. Dr. Dr. Robert Bals:	Bereitstellung des Themas und fortwährende Betreuung
Christian Hess:	Etablierung von Zellkulturen
Thomas Damm:	technische Unterstützung
Christoph Beisswenger:	technische Unterstützung

Frankfurt, März 2009