

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie der
Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Vogelmeier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Die Rolle von Cathelizidin und des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei Asthma und COPD



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

Frank Friedhelm Kleesz
aus Stuttgart

Marburg an der Lahn, 2010

Angenommen im Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

17.02.2010

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. R. Bals

Korreferent: Prof. Dr. A. Brehm

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	IV
1.1.	Deutsche Zusammenfassung	IV
1.2.	Abstract.....	VI
2.	Einleitung.....	1
2.1.	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	1
2.1.1.	NF- κ B-Proteine	1
2.1.2.	I κ B-Proteine.....	2
2.1.3.	NF- κ B-aktivierende Stimuli	5
2.1.4.	Regulation von NF- κ B durch I κ B und IKK-Proteine	6
2.1.5.	Regulation von NF- κ B durch direkte Phosphorylierung und Modifizierung von Histonen	7
2.1.6.	NF- κ B und das erworbene Immunsystem	8
2.2.	Antimikrobielle Peptide	9
2.3.	Asthma bronchiale.....	12
2.4.	Lungenemphysem und COPD	14
2.5.	Pathologische Veränderungen der Lunge bei Asthma und COPD	15
2.5.1.	Pathologische Veränderungen der Lunge bei Asthma.....	16
2.5.2.	Pathologische Veränderungen der Lunge bei COPD.....	18
2.6.	Immunbiologie der Lunge bei Asthma und COPD	18
2.6.1.	Immunbiologie von Asthma.....	19
2.6.2.	Immunbiologie von COPD.....	20
2.7.	Zielsetzung.....	21
3.	Materialien und Methoden	22
3.1.	Isolation von Monozyten aus Buffycoat und Transdifferenzierung zu Dendritischen Zellen.....	22
3.2.	Air Liquid Interface (ALI) Kultur.....	22
3.3.	Kokultur von primären Bronchialepithelzellen mit Dendritischen Zellen.....	23
3.4.	Vitalfärbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	24
3.5.	Visualisierung der <i>zona occludens</i> mittels indirekter Immunofluoreszenz	25
3.6.	Herstellung von Dauerpräparaten aus ALI-Kulturen für die Elektronenmikroskopie.....	25
3.7.	Herstellung von Dauerpräparaten aus ALI-Kulturen für die konfokale Laserscanmikroskopie	26
3.8.	Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	27
3.9.	Hitzeinaktivierung von Bakterien	27
3.10.	FACS-basierte Analyse des Migrationsverhaltens Dendritischer Zellen	28
3.11.	Kokultivierung von DZ mit naiven T-Zellen und Messung am FACS-Gerät.....	28
3.12.	Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA.....	31
3.13.	Haltung und Genotypisierung von Mäusen	32
3.14.	CRAMP Knockout	33
3.15.	NF- κ B Knockout	33
3.15.1.	LysM::Cre transgene Mäuse.....	33
3.15.2.	p65 ^{lox/lox} transgene Mäuse	34
3.15.3.	I κ B α ^{lox/lox} transgene Mäuse	35
3.15.4.	p65 ^{lox/lox} LysM::Cre transgene Mäuse.....	35
3.15.5.	I κ B α ^{lox/lox} LysM::Cre transgene Mäuse.....	35
3.16.	Experimentell induziertes <i>Asthma bronchiale</i> nach dem Ovalbumin-Modell.....	36

- Inhaltsverzeichnis -

3.17.	Experimentell induzierte COPD	36
3.18.	Sektion von Mäusen und Analyse	37
3.18.1.	Bestimmung der Gesamt- und Differenzialzellzahl der bronchoalveolären Lavage	37
3.18.2.	Nachweis von ovalbuminspezifischen Immunglobulinen im Serum mittels ELISA	38
3.18.3.	Aufbereitung von fixiertem Lungengewebe	39
3.18.4.	Färbung von rehydratisierten Lungenschnitten nach der HE-Methode	40
3.18.5.	Färbung von rehydratisierten Lungenschnitten nach der PAS-Methode	40
3.18.6.	Nachweis von Kollagen in rehydratisierten Lungenschnitten	41
3.19.	Statistik	41
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Dendritische Zellen migrieren durch das Lungenepithel	42
4.2.	Die Migration Dendritischer Zellen durch das Lungenepithel ist zeitabhängig	44
4.3.	Hitzeinaktivierte Bakterien beeinflussen nicht das Migrationsverhalten Dendritischer Zellen	44
4.4.	Dendritische Zellen stehen in Wechselwirkung mit Atemwegsepithelzellen	45
4.5.	Die Die Rolle des murinen Cathelizidins CRAMP bei experimenteller COPD	47
4.5.1.	Cathelizidin wirkt entzündungshemmend bei akuter Rauchexposition	47
4.5.2.	Cathelizidin wirkt entzündungshemmend bei experimentell induzierter COPD	49
4.6.	Die Rolle von CRAMP bei <i>Asthma bronchiale</i>	51
4.6.1.	Cathelizidin spielt keine Rolle bei induziertem akutem experimentellem Asthma	51
4.6.2.	Cathelizidin wirkt ambivalent bei induziertem chronischem experimentellem Asthma	53
4.7.	Die Rolle von NF-κB bei COPD	55
4.7.1.	Myeloisches NF-κB spielt keine Rolle bei kurzzeitiger Rauchexposition	56
4.7.2.	Myeloisches NF-κB wirkt entzündungshemmend bei experimentell induzierter COPD	57
4.8.	Die ambivalente Rolle von myeloischem NF-κB bei experimentellem akuten Asthma	59
5.	Diskussion	63
5.1.	Atemwegsepithelzellen und Dendritische Zellen stehen in Wechselwirkung zueinander	63
5.2.	Die immunmodulatorische Wirkung des murinen Cathelizidins CRAMP im Mausmodell	64
5.2.1.	Das murine Cathelizidin CRAMP wirkt entzündungshemmend bei Rauchexposition	65
5.2.2.	Die ambivalente Rolle des murinen Cathelizidins CRAMP bei Asthma	67
5.3.	Myeloisches NF-κB wirkt entzündungshemmend bei Rauchexposition	68
5.4.	Myeloisches NF-κB hat eine ambivalente Rolle bei akutem Asthma inne	70
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Anhang	84

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Asthma und COPD sind zwei komplexe Lungenkrankheiten. Sowohl Asthma als auch COPD besitzen eine starke entzündliche Komponente, bei der jeweils verschiedene Teile des Immunsystems und der Lunge involviert sind. NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Aktivität vieler Gene des Immunsystems kontrolliert. Antimikrobielle Peptide sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, die an Abwehr- und Entzündungsreaktionen des Wirtsorganismus beteiligt sind. Da Cathelicidine sowohl antimikrobielle als auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, könnten sie sich auf die Pathogenese des Asthma und der COPD auswirken. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des murinen Cathelicidins CRAMP und des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Asthma und COPD zu klären.

Die Analyse der bronchoalveolaren Lavage (BAL), der in der Lunge enthaltenen Zytokine und des im Serum enthaltenen IgE zeigte, dass Cathelicidin keine Rolle bei experimentell induziertem akutem Asthma spielt. Bei chronischem experimentellen Asthma hatte Cathelicidin einen komplexen Effekt, da CRAMP^{-/-}-Mäuse einen leicht erhöhten Gesamtzellgehalt und mehr Eosinophile in ihrer BAL als Wildtypmäuse (WT-Mäuse) aufwiesen. Allerdings war der Spiegel an Serum-IgE und TH₂-Zytokinen in der Lunge bei CRAMP^{-/-}-Mäusen niedriger als bei WT-Mäusen. Bei kurzzeitiger Zigarettenrauchexposition wirkte CRAMP entzündungshemmend, da die BAL bei CRAMP^{-/-}-Mäusen mehr Zytokine als bei gleichbehandelten WT-Mäusen enthielt. Im chronischen COPD-Modell konnte ebenfalls eine entzündungshemmende Wirkung von CRAMP festgestellt werden, da bei CRAMP^{-/-}-Mäusen sowohl die Gesamtzellzahl in ihrer BAL als auch verschiedene Zytokinkonzentrationen im Serum und in der Lunge gegenüber gleichbehandelten WT-Mäusen erhöht waren.

Bei akutem experimentellen Asthma konnte gezeigt werden, dass der p65-vermittelte NF- κ B-Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Eine ständige Aktivierung des p65-vermittelten NF- κ B-Signalwegs in myeloischen Zellen führte zu einem neutrophilen Phänotyp und wirkte teilweise entzündungshemmend, wohingegen eine dauerhafte Hemmung des p65-vermittelten NF- κ B-Signalwegs in myeloischen Zellen teilweise entzündungsfördernd wirkte. Im akuten Rauchexpositionsmodell konnte keine Beteiligung des myeloischen NF- κ B-Signalwegs an den Reaktionen der untersuchten Tiere im Rahmen der untersuchten Parameter festgestellt werden. Im chronischen COPD-Modell jedoch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von p65 in myeloischen Zellen entzündungshemmend wirkt.

- Zusammenfassung -

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das murine Cathelizidin CRAMP neben seiner antimikrobiellen Wirkung auch immunmodulatorische Funktionen besitzt. CRAMP wirkt bei COPD entzündungshemmend, und im Asthmodell wirkt CRAMP als proasthmatischer Faktor. Die NF- κ B-Signalkaskade myeloischer Zellen wirkt teilweise entzündungshemmend und teilweise entzündungsfördernd. Bei experimenteller COPD wirkt sich aktives myeloisches NF- κ B entzündungshemmend aus, bei experimentell induziertem Asthma hingegen teils entzündungsfördernd und entzündungshemmend. Cathelizidin und NF- κ B greifen in die komplexe Genese entzündlicher Lungenerkrankungen ein.

1.2. Abstract

Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are two complex diseases of the lung. Asthma as well as COPD have a strong inflammatory component in which different parts of the immune system and the lung are involved. NF- κ B is an important transcription factor which controls the expression of many immune genes. Antimicrobial peptides are effector molecules of innate immunity and involved in host defense and inflammation. Since cathelicidins have antimicrobial as well as immunomodulatory functions they could also be involved in asthma and COPD. The aim of the present study was to evaluate the role of the murine cathelicidin CRAMP and the transcription factor NF- κ B in asthma and COPD.

Analysis of the bronchoalveolar lavage (BAL), lung cytokines and serum-IgE showed that cathelicidin plays no role in experimentally induced acute asthma. In the model of chronic asthma, cathelicidin had a complex effect since CRAMP^{-/-} mice had a slightly higher total cell count and more eosinophils in their BAL than wildtype (WT) mice but the load of serum-IgE and T_{H2} cytokines in the lungs of serum-IgE of CRAMP^{-/-} mice was lower than in WT mice after experimental induced acute asthma. During short-term exposure to cigarette smoke CRAMP had an anti-inflammatory effect as the BAL of CRAMP^{-/-} mice contained more cytokines than identically treated wild type mice. In the chronic COPD model, CRAMP also had an anti-inflammatory effect since the BAL of CRAMP^{-/-} mice contained more cells and more cytokines than identically treated wild type mice.

In experimental acute asthma, this work showed that the p65-mediated NF- κ B signaling pathway plays an important role. Activation of p65-mediated myeloid NF- κ B resulted in a neutrophilic phenotype and had a partly anti-inflammatory effect contrary to a constitutive inhibition of the p65-mediated myeloid NF- κ B signaling pathway leading to a partly proinflammatory effect. During short-term exposure to cigarette smoke the p65-mediated NF- κ B signaling pathway played no role regarding the investigated parameters. In contrast to the chronic model of COPD the activation of myeloid p65 had an anti-inflammatory effect.

The results of this work show that the murine cathelicidin CRAMP also has immunomodulatory functions in addition to its antimicrobial functions. CRAMP has an anti-inflammatory effect in COPD and in asthma CRAMP acts as a proasthmatic factor. The NF- κ B signaling cascade of myeloid cells leads to partly anti-inflammatory and partly proinflammatory effects. In case of experimentally induced COPD, myeloid p65 acts as an anti-inflammatory factor and in case of experimentally induced asthma myeloid NF- κ B has proinflammatory and anti-inflammatory effects. Cathelicidin and NF- κ B interfere with the complex genesis of inflammatory lung diseases.

2. Einleitung

2.1. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor "*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*" (NF- κ B) ist ein sehr wichtiger immunmodulatorisch wirkender Transkriptionsfaktor mit weitreichenden Funktionen für das Immunsystem. NF- κ B-Proteine sind Schlüsselproteine zur Kontrolle des angeborenen und des erworbenen Immunsystems. Sie sind im Zytoplasma an inhibitorische Proteine assoziiert, welche als I κ B-Proteine bezeichnet werden. Im Zuge der Aktivierung von NF- κ B findet zuerst eine Phosphorylierung und anschließende proteasomale Abbau der I κ B-Proteine statt, so dass die nunmehr freigesetzten NF- κ B-Dimere in den Zellkern gelangen und ihre Zielgene aktivieren können. Die Aktivierung von NF- κ B ist essentiell für die Aktivierung von Lymphozyten und deren Überleben sowie die normale Funktion des Immunsystems.

2.1.1. NF- κ B-Proteine

Die NF- κ B-Familie der Transkriptionsfaktoren umfasst mehrere Mitglieder: RELA (p65), NF- κ B1 (p50, p105), NF- κ B2 (p52, p100), c-REL und RELB [Verma et al., 1995; Gosh et al., 1998]. All diesen Proteinen ist eine N-terminale 300 Aminosäuren lange Region gemein. Sie beinhaltet eine Dimerisierungs-, eine Kernimport- und eine DNA-Bindedomäne (s. Abb. 1). Die Proteine c-REL, RELB und RELA besitzen außerdem eine C-terminale, sehr stark wirkende Transaktivierungsdomäne. Anderen Proteinen wie beispielsweise Homodimeren aus p50 fehlt diese Transaktivierungsdomäne, aber sie binden dennoch an NF- κ B-Konsensussequenzen und fungieren folglich als Repressoren [May & Gosh, 1997]. Die p50- und p52-Proteine gehen durch proteolytische Prozessierung aus ihren jeweiligen Vorgängern p105, bzw. p100 hervor [Silverman & Maniatis, 2001]. Jedes NF- κ B-Protein mit Ausnahme von RELB kann sowohl Homodimere als auch Heterodimere untereinander ausbilden. Die Hauptform aktiven NF- κ Bs ist ein Homodimer aus p65, entweder gebunden an p50 oder an p52. Die Proteine p50 und p65 werden in vielerlei verschiedenen Zelltypen exprimiert. Allerdings ist die Expression von RELB auf spezifische Regionen des Thymus, der Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques begrenzt. Die Expression von c-REL ist auf hämatopoetische Zellen und Lymphozyten beschränkt, und die Transkription von RELB, c-REL und p105 wird durch NF- κ B reguliert [Verma et al., 1995; Gosh et al., 1998]. Alle für die fünf Isoformen kodierenden Gene wurden bei Mäusen durch homologe Rekombination experimentell deletiert (s. Tab. 1). Dadurch lässt sich die distinkte Rolle der verschiedenen NF- κ B-Proteine bezüglich des angeborenen und des adaptiven Immunsystems sowie der Lymphozytenfunktionalität und des zellulären Überlebens aufzeigen. So ist eine Deletion

der p65-Untereinheit von NF- κ B während der Embryonalentwicklung aufgrund von Leberdegeneration tödlich. Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse, deren Genom eine Deletion in den anderen NF- κ B-Untereinheiten aufweist, eine Störung des Immunsystems auf, ohne allerdings Entwicklungsstörungen während der Embryonalentwicklung zu haben. Mäuse, bei denen mehr als ein NF- κ B-kodierendes Gen defekt ist, zeigen schwerere Phänotypen als Mäuse, bei denen lediglich ein NF- κ B-kodierendes Gen defekt ist. Dies deutet darauf hin, dass es eine gewisse Redundanz unter den einzelnen NF- κ B-Proteinen geben muss.

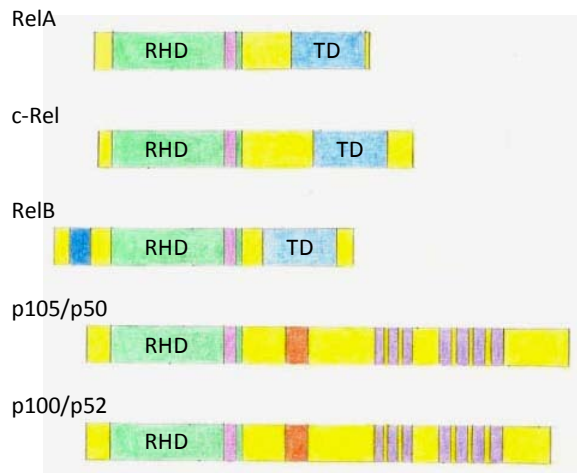


Abb. 1: NF- κ B Proteine.

Es gibt fünf Vertreter der NF- κ B-Proteine. Diese sind RELA (p65), c-REL, RELB, NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52). Ihnen gemeinsam ist eine N-terminal gelegene Rel-homologe Domäne (RH-Domäne, RHD). Diese sorgt für die Dimerisierung der NF- κ B-Proteine sowie für deren Kernimport und der Bindung an NF- κ B-korrespondierende Konsensussequenzen. Die Proteine p105/p50 und p100/p52 besitzen anstelle einer Transaktivierungsdomäne (TD) mehrere Ankyrin-Domänen (AD).

2.1.2. I κ B-Proteine

NF- κ B liegt im Zytoplasma als inaktive Form vor. Diese Inaktivierung wird durch Bindung an I κ B-Proteine erreicht, von denen die häufigsten I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ sind [Gosh et al., 1998]. Ihnen gemein ist ein 33 Aminosäuren-langes, als Ankyrindomäne bezeichnetes Strukturmotiv, welches Interaktionen zwischen Proteinen vermittelt [Verma et al., 1995] (s. Abb. 2). Die NF- κ B-Proteine p100 und p105 besitzen den vorher beschriebenen Proteinen ähnliche Ankyrindomänen, welche als I κ B-ähnliche Proteine fungieren. Bei diesen Vorläuferproteinen kann die ankyrindomänenbeinhaltende Domäne proteolytisch abgespalten und degradiert werden. Ein weiterer Ausnahmevertreter der NF- κ B-Proteine ist Bcl-3. Bcl-3 interagiert spezifisch mit p50- und p52-Homodimeren und kann die Expression von Genen mit NF- κ B-Bindestellen induzieren [May & Gosh, 1998; Silverman & Maniatis, 2001].

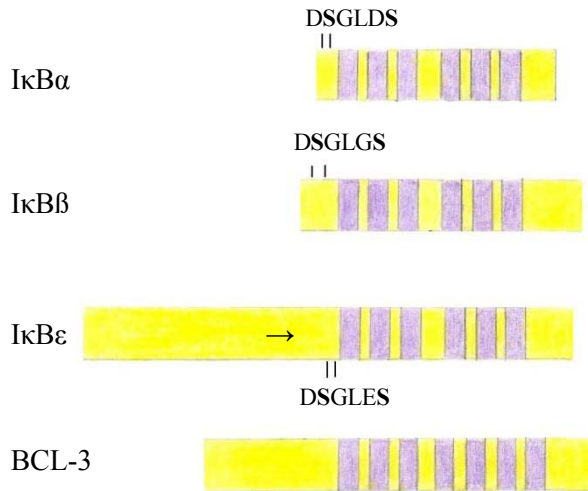


Abb. 2: IκB-Proteine.

Es gibt vier verschiedene Vertreter der IκB-Proteine. Diese sind: IκBα, IκB, IκBε in zwei verschiedenen Transkriptionsvarianten (s. „→“) und BCL-3. Charakteristisch für alle IκB-Proteine sind ihre Ankyrin-Domänen. Die jeweiligen N-terminalen zur proteasomalen Degradation nötigen Phosphorylierungsstellen der einzelnen IκB-Vertreter sind durch die einstelligen Aminosäurecode angegeben.

IκB-Proteine halten NF-κB-Dimere im Zytoplasma zurück, indem sie deren Kernimportsequenzen (NL-Sequenzen) maskieren. Die zytoplasmatische Lokalisation aktiver NF-κB-Komplexe ist das Resultat eines Gleichgewichts zwischen Kernimport und Kernexport [Huxford et al., 1998; Johnson et al., 1999; Huang et al., 2000; Huang & Miyamoto, 2001; Malek et al., 2001; ; Birbach et al., 2002]. Experimentelle Arbeiten bezüglich Struktur und Biochemie zeigten, dass nur eine der beiden NL – Sequenzen durch IκBα maskiert wird. Dies ermöglicht trotz Bindung von IκBα einen Kernimport via NL – Sequenz. Gleichzeitig ermöglicht die am N-Terminus lokalisierte Kernexportsequenz (NE-Sequenz) von IκBα einen Kernexport des an IκBα gebundenen NF-κB-Komplexes. Da der Kernimportprozess effizienter verläuft als der Kernexportprozess, kann eine Lokalisation von NF-κB-Komplexen nur dann beobachtet werden, wenn der Kernexport durch Leptomycin B gehemmt wird [Lee & Hannink, 2002]. Demgegenüber werden Komplexe aus NF-κB mit IκBβ durch Maskierung beider NL-Sequenzen des NF-κB-Dimers durch IκBβ im Zytoplasma zurückgehalten [Tam & Sen, 2001]. Erwähnenswerterweise besitzt nur IκBα und nicht IκBβ eine funktionale NE-Sequenz, welche essentiell für den Kernexport der NF-κB-IκBα-Komplexe ist.

IκBα und IκBβ wirken sich unterschiedlich auf die Aktivierbarkeit von NF-κB aus: IκBα reguliert die transiente Aktivierung von NF-κB, wohingegen IκBβ die dauerhafte Aktivierung von NF-κB reguliert [May & Gosh, 1997]. Dementsprechend wird IκBα nach erfolgtem Stimulus schnell abgebaut und wieder resynthetisiert [Verma et al., 1997]. Das frisch synthetisierte IκBα wird mittels seiner intrinsischen NL-Sequenz in den Kern transportiert und sorgt dort für die Dissoziation aktivem NF-κB von seinen Promotoren. Im Gegensatz dazu ist IκBβ weniger empfindlich gegenüber einem stimulusinduzierten Abbau. Da IκBβ keine funktionale NE-Sequenz besitzt und nicht durch NF-κB induziert wird, wirkt

I κ B β folglich als dauerhafter Aktivator für NF- κ B. Genetische Studien zeigten sowohl distinkte als auch redundante Funktionen für I κ B α , - β und - ϵ bezüglich der Kontrolle der Aktivierung von NF- κ B auf (s. Tab. 1). So führt beispielsweise das Fehlen von I κ B α zu einer erhöhten Aktivität von NF- κ B in hämatopoetischem Gewebe, allerdings nicht in murinen embryonalen Fibroblasten [Beg et al., 1995].

Tab. 1: Phänotyp diverser NF- κ B-Knockouts bei Mäusen.

Defekte des NF- κ B-Signalwegs wirken sich mehr oder weniger stark auf den Gesamtorganismus (Maus) aus. Diese Auswirkungen reichen von einem gestörten Immunsystem über eine Störung der Entwicklung von Knochen und Gliedmaßen bis hin zum Abbruch der Embryonalentwicklung (Einzelheiten s. Text) [Auszug aus Li & Verma, 2002].

Mutiertes Gen	Phänotyp bei Knockout in Mäusen
NF-κB-Proteine	
P65 (RelA)	Tod während der Embryonalentwicklung (zwischen Tag 15,5 und 16,5); TNF-abhängige Apoptose der Leber; gestörte Lymphozytenaktivierung
NF- κ B1 alleine	Gestörte Lymphozytenentwicklung
NF- κ B2 alleine	Keine Reifung der B-Zellen; gestörte Lymphozytenaktivierung; gestörte Organisation der Milz und der Lymphknoten
RelB	Postnataler Tod aufgrund multipler Organentzündungen; nötig zur Entwicklung Dendritischer Zellen
c-Rel	Gestörte Funktion der Lymphozyten und Makrophagen
p65 + NF- κ B1	Tod während der Embryonalentwicklung zwischen Tag 13,5 und Tag 14,5
NF- κ B1 + NF- κ B2	Postnataler Tod; kein Vorhandensein reifer B-Zellen und Osteoblasten
NF- κ B1 + RelB	Postnataler Tod aufgrund von Immunschwäche
IκB-Proteine	
I κ B α alleine	Postnataler Tod aufgrund von Immunschwäche; entzündliche Dermatitis und Granulozytose, gesteigerte konstitutive NF- κ B-Aktivität in Lymphozyten bei normalen embryonalen Fibroblasten (MEFs)
I κ B α + NF- κ B1	Teilweise Kompensation eines I κ B α -Knockouts
I κ B ϵ	Normale NF- κ B-Aktivierung; keine schweren Immundefekte
Bcl-3	Gestörte Organisation der Milz
NF- κ B1 Δ C (p105)	Postnataler Tod aufgrund von Immunschwäche
NF- κ B2 Δ C (p100)	Postnataler Tod aufgrund von Immunschwäche
IKK-Proteine	
IKK1 alleine	Gestörte Differenzierung der Keratinozyten, der Knochen und der Gliedmaßen; gestörte Proliferation des Epithels der Milchgänge; Fehlen reifer B-Zellen; gestörte Aktivierung von NF- κ B durch RANKL; gestörte Prozessierung von p100 durch NIK
IKK2 alleine	Tod während der Embryonalentwicklung zwischen Tag 13,5 und 14,5 aufgrund von TNF-abhängiger Apoptose der Leber; gestörte IL-1-, TNF- und LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B
IKK1 + IKK2	Tod während der Embryonalentwicklung zwischen Tag 11,5 und 12,5 aufgrund von TNF-abhängiger Apoptose der Leber; keine Induzierung der Aktivierung von NF- κ B bei embryonalen Fibroblasten (MEFs)
NEMO	Tod während der Embryonalentwicklung zwischen Tag 11,5 und 12,5 aufgrund von TNF-abhängiger Apoptose der Leber; keine Induzierung der Aktivierung von NF- κ B bei embryonalen Fibroblasten (MEFs)

I κ B α ist jedoch nach wie vor nötig für die Hemmung von NF- κ B nach dessen Aktivierung in Fibroblasten. I κ B α und I κ B β scheinen ähnliche biochemische Eigenschaften zu besitzen, da das Ersetzen von I κ B α durch I κ B β bei I κ B α -k.o.-Mäusen zu einem scheinbaren WT-Phänotyp in diesen Mäusen führt [Cheng et al., 1998].

2.1.3. NF- κ B aktivierende Stimuli

NF- κ B wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Dazu gehören Pathogene, Stresssignale und proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise TNF und IL-1. Viele Pathogene werden durch spezifische Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) erkannt. Sie ermöglichen es, Substanzen pathogener Herkunft wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Lipoproteine, unmethylierte DNA bakterieller Herkunft und doppelsträngige RNA zu erkennen [Imler & Hoffmann, 2000]. Die am besten untersuchten PRR sind die sogenannten TL-Rezeptoren (engl. *Toll-like receptors*, TLR). TL-Rezeptoren sind Transmembranproteine, die nach erfolgter Pathogenerkennung die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden vermitteln. Bisher wurden 10 dieser Rezeptoren (TLR1 – TLR10) in Säugern beschrieben. TLR2 und TLR4 beispielsweise sind essentiell für die Erkennung distinkter Bakterienzellwandkomponenten [Imler & Hoffmann, 2000; Akira et al., 2001]: TLR2 vermittelt die Erkennung von Peptidoglykan, Lipoproteinen, Lipoarabinomannan und Zymosan wohingegen TLR4 für die Erkennung von LPS und Lipoteichonsäure zuständig ist [Akira et al., 2001]. Genetische und biochemische Daten zeigen, dass zur Bindung von LPS an TLR4 die Kofaktoren CD14 und MD-2 nötig sind. Dies führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung des I κ B-Kinasekomplexes und somit zur Aktivierung von NF- κ B [Silverman & Maniatis, 2001; Wang et al., 2001].

Ein weiterer Weg zur Aktivierung von NF- κ B führt über Zytokine wie beispielsweise TNF α und IL-1. Beide Zytokine werden hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten sezerniert und tragen zur Aktivierung von Lymphozyten und Leukozyten bei. TNF α und IL-1 aktivieren Signalkaskaden, die zur Aktivierung von AP-1 (engl. *activator protein 1*) und NF- κ B führen. IL-1 aktiviert NF- κ B in ähnlicher Weise wie LPS, da die zytoplasmatisch gelegene Signaltransduktionsdomäne des IL-1-Rezeptors den TLRs homolog ist (s. Abb. 3). Eine Vielzahl von Zellen besitzt TNF α -Rezeptoren. Bindung von TNF α resultiert in Rezeptortrimerisierung und Rekrutierung des Adapterproteins TRADD, was letztlich über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung von NF- κ B führt (s. Abb. 3) [Kelliher et al., 1998; Yang et al., 2001].

NF- κ B kann außerdem durch den T-Zellrezeptor peripherer T-Zellen aktiviert werden. Dies erfordert ein zusätzliches kostimulatorisches Signal von CD28, an dem die Proteinkinase C θ (PKC θ) und IKK2, bzw. IKK β beteiligt sind [Arendt et al., 2002]. PKC θ wird schnell nach erfolgter T-Zellrezeptorstimulation an die Zellmembran rekrutiert und leitet das stimulierende Signal über mehrere Zwischenschritte weiter zum IK-Komplex, was zur Aktivierung von NF- κ B führt (s. Abb. 3) [Arendt et al., 2002; Ruland et al., 2001; MC Allister-Lucas et al., 2001].

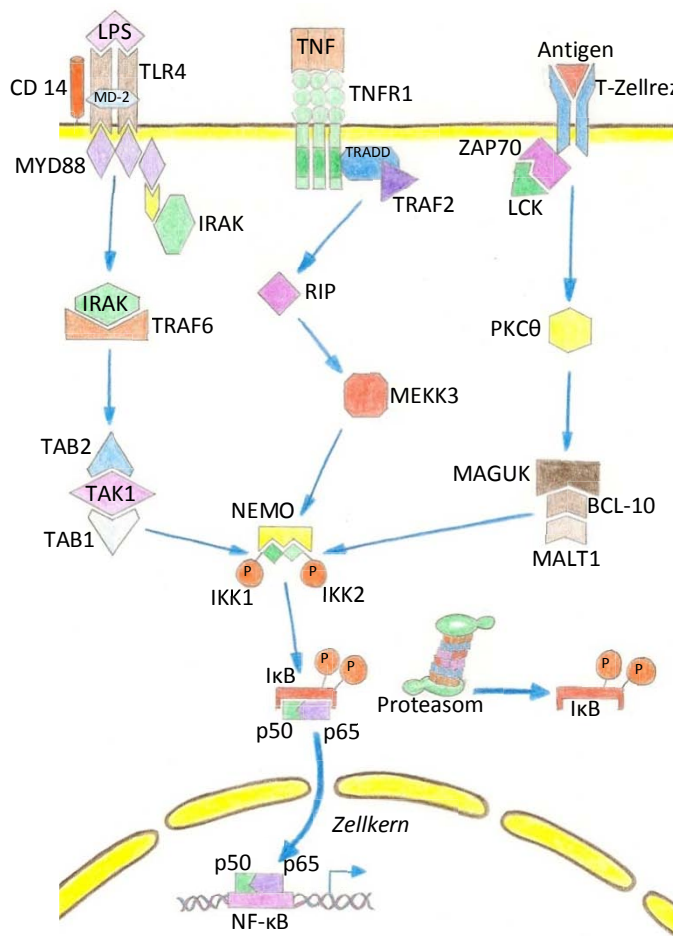


Abb. 3: Aktivierung von NF- κ B. Grundsätzlich sind drei Wege zur Aktivierung von NF- κ B beschrieben. Sie alle führen letztlich zum Abbau von I κ B, so dass NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern transportiert wird, wo es an seine korrespondierenden Konsensussequenzen bindet und die Transkription seiner Zielgene einleitet. Die eingehenden Signale sind vielfältiger Natur und umfassen pathogen spezifische Charakteristika (a), immunmodulatorische Mediatoren wie beispielsweise TNF (b) und Antigene (c) (näheres s. Text).

2.1.4. Regulation von NF- κ B durch I κ B und IKK-Proteine

Zur Aktivierung von NF- κ B ist in den meisten Fällen der Abbau des an NF- κ B gebundenen I κ B erforderlich [Karin & Ben-Neriah, 2002]. Dazu ist die Phosphorylierung von I κ B an spezifischen N-terminalen Serinresten (im Falle von I κ B α Ser32 und Ser36) vonnöten. Dies wird durch den I κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex, IKK) bewerkstelligt. Phosphoryliertes I κ B wird anschließend an einen N-terminalen Lysinrest (Lys21 im Falle von I κ B α) ubiquitiniert und anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut [Ben-Neriah, 2002]. Dies

führt zur Freisetzung von NF- κ B und dessen anschließenden Kernimport [Karin & Ben-Neriah, 2002]. Proteasomale Abbauprozesse spielen nicht nur im Falle der Degradierung von I κ B, sondern auch bei der Prozessierung der NF- κ B-Vorläuferproteine p100 und p105 eine Rolle [Ben-Neriah, 2002].

Der zur Phosphorylierung der I κ B-Proteine nötige IK-Komplex hat ein Molekulargewicht von 700 bis 900 kDa (je nach Zusammensetzung der Untereinheiten). Die wichtigsten Untereinheiten des IK-Komplexes sind IKK1 bzw. IKK α , IKK2 und die regulatorische Untereinheit NEMO (engl. *NF- κ B essential modulator*) bzw. IKK γ [Karin & Ben-Neriah, 2002]. IKK1 und IKK2 sind fähig, alle drei bekannten I κ B-Proteine in vitro zu phosphorylieren [Karin & Ben-Neriah, 2002]. Am IK-Komplex laufen verschiedenste NF- κ B-aktivierende Signalkaskaden zusammen. Dies konnte durch genetische Analysen gezeigt werden: Sind IKK1 und IKK2 oder NEMO unfunktional, so findet keine Aktivierung mehr von NF- κ B statt [Li et al., 2000; Rudolph et al., 2000].

2.1.5. Regulation von NF- κ B durch direkte Phosphorylierung und Modifizierung von Histonen

Neben der Möglichkeit zur Regulation von NF- κ B durch proteasomalen Abbau von I κ B verfügt die Zelle noch über weitere Regulationsmechanismen. Einige Arbeiten haben gezeigt, dass IL-1 und TNF die Phosphorylierung und Aktivierung der NF- κ B-Untereinheit p65 durch Wege induzieren, die sich von denjenigen unterscheiden, die sich durch den proteasomalen Abbau von I κ B und der nachfolgenden Translokation von NF- κ B in den Kern ereignen. So ist die Phosphorylierung von p65 an Ser276 durch die Proteinkinase A (PKA) nach erfolgtem Abbau von I κ B essentiell für eine effiziente Bindung von p65 an das transkriptionskoaktivierende Protein CBP/p300 [Zhong et al., 1998]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p65 an Ser529 und Ser536 durch IKK2 notwendig für die transkriptionsaktivierende Funktion von p65 ist [Sakurai et al., 1999].

Neben der Regulation des Aktivierungsstatus von NF- κ B durch dessen Phosphorylierungsstatus ist außerdem der Acetylierungsstatus der Chromatinabschnitte der NF- κ B-Zielgene entscheidend für ihre Aktivierbarkeit [Eberharter & Becker, 2002]. Einige Arbeiten haben gezeigt, dass die Interaktion von NF- κ B mit Histonacetylasen wie beispielsweise CBP/p300 der Expression relevanter Gene dienlich ist. Die Wechselwirkung von NF- κ B mit Histondeacetylasen wie beispielsweise HDAC1 oder HDAC2 wirkt sich hingegen sowohl auf basalem wie auch auf induziertem Level hemmend auf die Expression der durch NF- κ B regulierten Gene aus [Lee et al., 2000; Ito et al., 2000; Ashburner et al., 2001; Chen et al., 2001].

Der Phosphorylierungsstatus von p65 bestimmt dessen Bindung an CBP/p300 oder HDAC1. In unstimulierten Zellen binden nur wenige p50- und p65-Homodimere an HDAC1. Nach erfolgter Zellstimulation wird p65 phosphoryliert und bindet vorzugsweise an CBP/p300. Dieser so entstandene Proteinkomplex aktiviert NF- κ B-Zielgene durch Verdrängung von p50-HDAC1-Proteinkomplexen und anschließende Bindung an NF- κ B-Konsensussequenzen [Zhong et al, 2002].

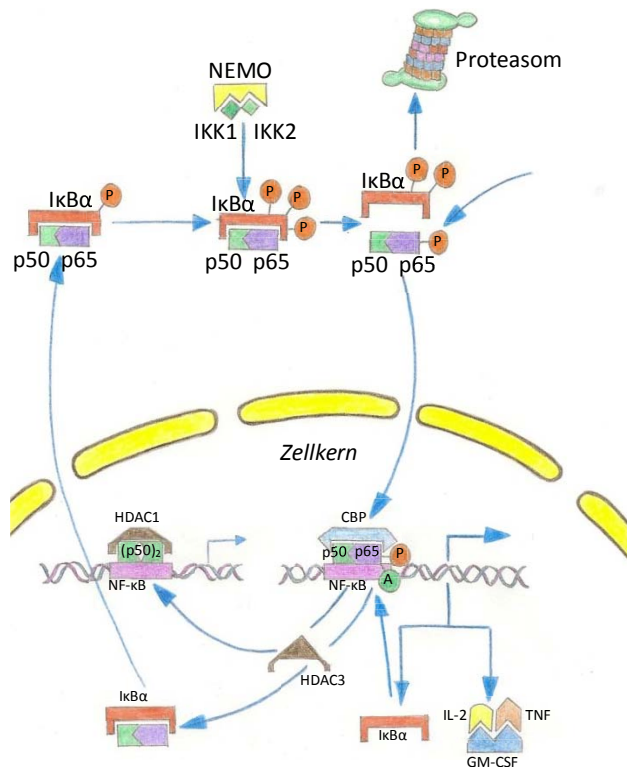


Abb. 4: Regulation von NF- κ B.

Die aus vielerlei Stimuli induzierte Aktivierung des IKK-Komplexes bewirkt die Phosphorylierung von I κ B, was zu dessen proteasomalem Abbau und dem nachfolgenden Kernimport von NF- κ B führt. Im Kern führt die direkte Phosphorylierung von NF- κ B an seiner Untereinheit p65 zu einer verstärkten Bindung an die Histonacetylase CBP und somit zu einer Umstrukturierung des Chromatins, so dass die Transkription der relevanten Gene erleichtert wird. Die Interaktion der Histondeacetylase HDAC1 an NF- κ B (p50-Homodimere) verhindert jedoch die Transkription von NF- κ B-Zielgenen. (näheres s. Text).

2.1.6. NF- κ B und das erworbene Immunsystem

Neben seiner Funktion als schneller Induktor von antimikrobiellen Akute-Phase-Genen als Antwort auf Pathogene [Grumont, 1999; Perkins, 2000] spielt NF- κ B außerdem eine wichtige Rolle im erworbenen Immunsystem: Mäuse, denen einzelne NF- κ B-Proteine fehlen, haben Schwierigkeiten bei der Proliferation ihrer T- und B-Zellen, deren Aktivierung und beim Isotypenwechsel ihrer Antikörper [Gerondakis et al, 1998]. T-Zellen von transgenen Mäusen, die I κ B α M, eine nicht degradierbare Form von I κ B α , in T-Zellen exprimieren, haben, verglichen mit dem Wildtyp, ein merklich eingeschränktes Proliferationsvermögen. Diese T-Zellen sind nach Stimulation mit IL-2 und IL-4 nicht in der Lage, den Transkriptionsfaktor STAT5a zu aktivieren, welcher normalerweise nach Stimulation mit IL-2 und IL-4 in T-Zellen aktiviert wird [Mora et al, 2001]. T-Zellantworten können grob unterteilt werden in T_{H1}- und T_{H2}-Antworten. NF- κ B ist beteiligt an der Produktion von IL-18 und IFN- γ (Inter-

feron- γ), welche beide nötig zur Funktion von T_{H1}-Zellen sind [Kojima et al, 1999]. I κ B α M exprimierende T-Zellen produzieren weniger IFN- γ nach erfolgter Stimulation als ihre WT-Pendants [Ferreira et al., 1999; Aronica et al., 1999; Aune et al., 1999].

Des Weiteren ist zur Entwicklung CD8-positiver Zellen p65 nötig [Kojima et al, 1999], und NF- κ B-Inhibitoren wirken außerdem hemmend auf die Reifung dendritischer Zellen ein [Caamano & Hunter, 2002].

Bezüglich der Rolle von NF- κ B in B-Zellen konnte gezeigt werden, dass NF- κ B an einer Vielzahl von Vorgängen beteiligt ist. Dazu zählen z. B. der Antikörperklassenwechsel, die Keimzentrenbildung sowie die Ausbildung mikroanatomischer Strukturen der Milz. Allerdings spielt NF- κ B bei der Reifung der B-Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei T-Zellen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die B-Zellreifung von Mäusen, denen sowohl funktionales NF- κ B1 als auch funktionales NF- κ B2 fehlt, gestört ist (s. Tab. 1) [Sakurai et al., 1999]. In ähnlicher Weise wirkt sich auch ein Knockout von NIK oder IKK1 aus: Die betreffenden Mäuse haben zwar eine normale B-Zellentwicklung, allerdings ist die Reifung ihrer B-Zellen gestört [Senfleben et al., 2001; Yin et al., 2001; Kaisho et al., 2001].

Wie durch diese Sachverhalte ersichtlich, ist NF- κ B an den verschiedensten Aufgaben während der Lymphozytenentwicklung beteiligt. Die derzeitige gängige Meinung ist, dass NF- κ B-Proteine die Lymphozytenentwicklung durch Proliferation, Schutz vor TNF-induzierter Apoptose und die Regulation antiapoptotischer Gene reguliert [Senfleben, 2001; Hettmann, 1999].

2.2. Antimikrobielle Peptide

Als antimikrobielle Peptide (AMPs) werden im Allgemeinen Eiweißstoffe bezeichnet, die Mikroorganismen abtöten oder in ihrem Wachstum hemmen können. Sie sind phylogenetisch gesehen sehr alt und kommen sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen und Tieren vor. Da AMPs von mannigfaltiger Struktur sind, gibt es bis heute keine einheitliche Klassifizierung. Ihre antimikrobielle Wirkung kommt durch Wechselwirkungen mit der bakteriellen Zellmembranzustände, wobei die Erkennung der Zielmembran auf strukturellen Unterschieden zwischen Pro- und Eukaryonten zu beruhen scheint. Die initialen Interaktionen zwischen den positiv geladenen AMPs und der negativ geladenen Bakterienzellmembran beruhen auf elektrostatischer Wechselwirkung. Der weitere genaue Wirkungsmechanismus der AMPs auf die bakterielle Zellmembran ist noch nicht vollständig geklärt. Es existieren hierzu mehrere Theorien: AMPs könnten einen stabilen Kanal in der Bakterienmembran oder unstrukturierte Aggregate bilden, die sich dann zu Poren formieren [Wu et al, 1999]. Alternativ dazu könn-

ten AMPs die Bakterienmembran großflächig bedecken und so deren Integrität stören, was schließlich zur Bildung von Löchern in der Membran führt [Heller et al., 2000]. Letztlich führt dies zum Verlust intrazellulärer Bestandteile und damit zum Tod der betreffenden Zelle. Außer ihrer antimikrobiellen Wirkung besitzen die meisten AMPs zusätzlich noch weitere Eigenschaften. So wirken Defensine beispielsweise immunmodulatorisch und sind an Heilungsprozessen beteiligt [Yang et al, 2002; Aarbiou et al, 2002].

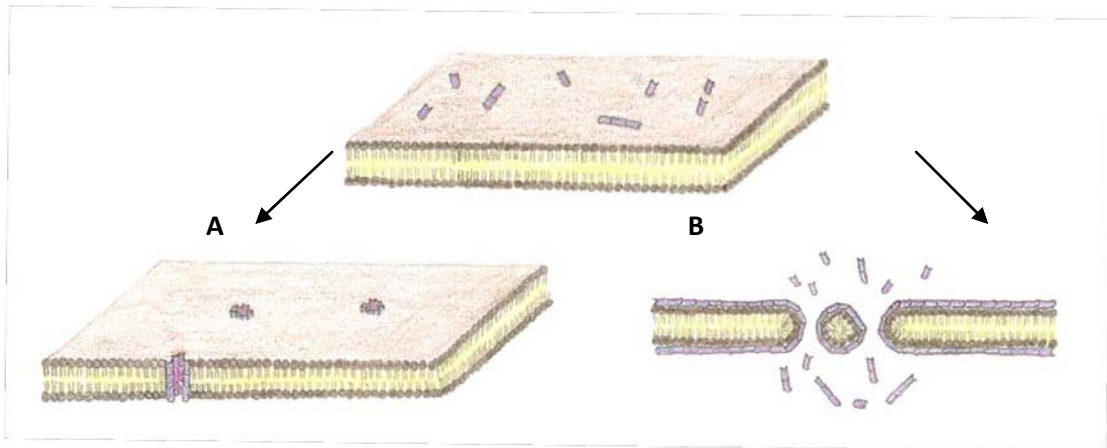


Abb. 5: Wirkungsweise antimikrobieller Peptide.

Die genaue Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide (als blaue Partikel dargestellt) ist noch nicht vollständig geklärt. Prinzipiell existieren zwei Modelle. AMPs könnten Poren in der Membran der Bakterienzelle bilden (A) oder großflächig die gesamte Membran bedecken und schließlich große Stücke aus der Membran herauslösen (B). Beides führt letztlich zum Kollaps des Transmembranpotentials und damit zum Tod der betroffenen Zelle.

Cathelizidine gehören ebenfalls zu den AMPs und zeichnen sich durch das Vorhandensein einer sogenannten Cathelindomäne (Cathepsin L Inhibitor) aus. Sie ist hoch konserviert, besitzt antimikrobielle Aktivität und hemmt, wie der Name schon sagt, die Protease Cathepsin L [Zaiou et al., 2003]. Zusätzlich zur Cathelindomäne besitzen Cathelizidine eine Signalsequenz und eine C-terminal lokalisierte Domäne, deren Sequenz von Spezies zu Spezies relativ heterogen ist. Diese C-terminale Aminosäuresequenz besteht aus 12 bis 80 überwiegend positiv geladenen Aminosäuren, deren Sequenzen von Spezies zu Spezies sehr unterschiedlich sind und stellt das eigentliche AMP dar. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus existiert nur ein einziger Vertreter der Cathelizidine. Das humane Cathelizidin LL-37/hCAP18 und das murine Cathelizidin CRAMP besitzen beide ein ähnliches Wirkungsspektrum, allerdings zeigt CRAMP keine Toxizität gegenüber Erythrozyten [Agerberth et al., 1995; Cowland et al., 1995; Gallo et al., 1997]. LL37/hCAP18 wird größtenteils von Neutrophilen gebildet, wo es als Propeptid in speziellen Granulae gespeichert wird [Cowland et al., 1995]. Im Zuge seiner Sezernierung wird das Propeptid durch die gleichzeitige Freisetzung von Proteinase 3 geschnitten, so dass Cathelin und aktives LL-37 entstehen [Soren-

sen et al., 2001]. In den Atemwegen erfolgt die Biosynthese und Sezernierung von LL37/hCAP18 durch Immun- und Epithelzellen [Bals et al., 1998], wo es mittels Lungenspülung nachgewiesen werden kann [Agerberth et al., 1999]. Weitere Bildungsorte humanen Cathelizidins sind Makrophagen, Lymphozyten und einige Epithelien [Agerberth et al., 2000; Hase et al., 2002; Hase et al., 2003; Bals et al., 1998; Frohm et al., 1997; Malm et al., 2000; Frohm et al., 1999]. Das murine Cathelizidin CRAMP besteht aus 38 Aminosäuren und ist strukturell dem humanen Cathelizidin LL37/hCAP18 sehr ähnlich [Yu et al., 2002]. Funktionell gesehen gleicht es nach bisherigen Erkenntnissen weitestgehend dem humanen Cathelizidin. Da Cathelizidine mit Biomembranen interagieren, sind sie in höheren Konzentrationen ebenfalls für eukaryontische Zellen toxisch. Dies trifft insbesondere für Tumorzellen, proliferierende Zellen und Erythrozyten zu. Diese Toxizität wird allerdings durch Serum teilweise verringert oder neutralisiert [Genaro & Zanetti, 2002; Risso et al., 1998; Oren et al., 1990; Johansson et al., 1998].

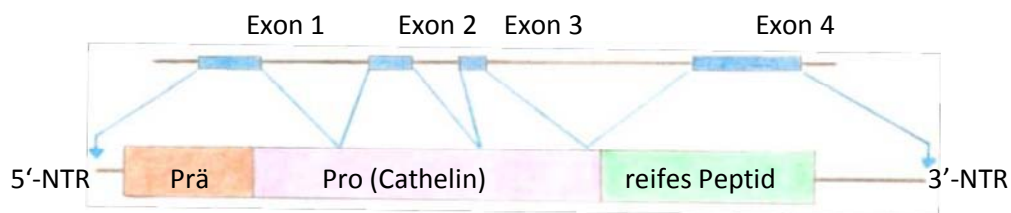


Abb. 6: CRAMP.

Das für LL-37/hCAP18 kodierende Gen enthält vier Exons und drei Introns. Das Präpropeptid enthält die Signalsequenz, die Cathelindomäne und eine antimikrobielle Domäne, die extrazellulär von der Prodomäne abgespalten wird.

Neben antimikrobiellen Eigenschaften wirken sowohl das humane als auch das murine Cathelizidin immunmodulatorisch. LL-37 wirkt chemotaktisch für CD4⁺-T-Zellen, Makrophagen und Neutrophile [De et al., 2000]. Dies wird durch Bindung an FPRL1 (*formyl peptide receptor like 1*), einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, auf der Zielzelle vermittelt. CRAMP wirkt in der Maus auf ähnliche Weise wie LL-37, indem es an FPR-2, dem murinen Ortholog von FPRL1, bindet und so chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und Makrophagen wirkt [Kuroska et al., 2005]. Außer mittels G-Protein-gekoppeltem Rezeptor existiert bei humanen Monozyten und bronchialen Epithelzellen noch eine weitere, nicht näher charakterisierte Signalkaskade, bei der ERK1/2 und p38 involviert sind. Bei diesen Zellen führt LL-37 mittels der ERK1/2- und p38-vermittelten Signalkaskade zur Ausschüttung von IL-8 [Bowdish et al., 2004]. Außerdem kann LL-37 in das Zytosol und in den Zell-

kern gelangen, indem es die Zellmembran passiert [Sandgren et al., 2004; Lau et al., 2005]. Eine weitere immunmodulatorische Eigenschaft von LL-37 ist dessen Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu DZ: DZ, die in Gegenwart von LL-37 aus Monozyten herangezüchtet werden, geben erhöhte Mengen an Zytokinen ab, haben ein erhöhtes Potential zur T-Zellaktivierung und eine erhöhte Endozytosekapazität [Davidson et al., 2004]. Außerdem wirken Cathelizidine antiapoptotisch auf Neutrophile [Nagaoka et al., 2006] und LPS-neutralisierend [Hirata et al., 1994; Larrick et al., 1995; Scott et al., 2002; Kirikae et al., 1998; Bals et al., 1999; Rosenfeld et al., 2006; Nagaoka et al., 2001, 2002].

2.3. Asthma bronchiale

Im Allgemeinen wird Asthma bronchiale (im folgenden Asthma genannt) als eine chronisch entzündliche Krankheit der Atemwege, bei der viele Zelltypen – besonders Mastzellen, Eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten – eine Rolle spielen, bezeichnet. Die asthmabedingte Entzündung der Atemwege führt beim Erkrankten besonders nachts oder morgens zu wiederkehrenden Episoden von expiratorischer Stenoseatmung, Brustenge und Husten. Mit diesen Symptomen gehen typischerweise mehr oder weniger starke Obstruktionen der Atemwege einher, die reversibel sind [WHO/NHLBI Workshop Report, 1995]. Jahrelang wurden lediglich Bronchospasmen, Ödeme und Überproduktion von Schleim als krankhafte asthmatische Veränderungen betrachtet. Die Analyse von bronchoalveolärer Lavage [Godard et al., 1982], Lungenbiopsien [Jeffery, 1996] und induziertem Sputum [Maestrelli et al., 1993] wiesen jedoch darauf hin, dass mit Asthma auch eine Entzündung der Bronchien einhergeht. Des Weiteren wird die Entstehung von Asthma durch genetische Prädisposition begünstigt [Holgate et al., 1994]. Eine weitere Erklärung zur Entstehung von Allergien und insbesondere Asthma liefert die Hygienehypothese. Sie besagt, dass sich die Exposition von Mikroorganismen positiv auf den Verlauf von Allergien, z. B. Asthma, auswirkt: Infektionen im frühen Kindesalter verringern die Chance der Entstehung einer allergischen Erkrankung. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in ländlichen Gegenden das Vorkommen von allergischen Erkrankungen, z. B. Asthma, geringer als in urbanen Gegenden ist [Will-Karp et al., 2001]. Die IgE-vermittelte Reaktion auf Allergene ist die häufigste Form der Krankheit während der Kindheit und im jungen Erwachsenenalter [Platts-Mills et al., 1996].

Die asthmatische Reaktion läuft in zwei Phasen ab. Die erste Phase stellt eine unmittelbare Sofortreaktion auf das Allergen dar. Nach Allergenkontakt erfolgt die Freisetzung von allergenspezifischem IgE, welches Mastzellen in der Lunge aktiviert [Murray et al., 1997; Liu et al., 1998; Tonnel et al., 1999; Calhoun et al., 1992]. Die durch das freigesetzte IgE aktivierten Zellen sezernieren Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Histamine [Jarjour et al.,

1989], Eicosanoide [Wenzel et al., 1989] und reaktive Sauerstoffspezies, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, eine vermehrte Schleimproduktion sowie eine Erweiterung der Gefäße verursachen. Der Blutkreislauf im Bereich des Kapillarsystems der Bronchien ist von zentraler Bedeutung für die asthmatische Entzündungsreaktion [Persson et al., 1995]. Die im Zuge der asthmatischen Sofortreaktion freigesetzten Entzündungsmediatoren verursachen ein Hindurchtreten von Blutplasma im Bereich der Kapillaren der Atemwege, da sie die dortigen Gefäße durchlässiger machen [Greiff et al., 1993; Van-Vyve et al., 1995]. Dies führt zu lokalen Ödembildungen im Gewebe und somit zu einer Verengung der Atemwege. Des Weiteren kann Blutplasma durch das Atemwegsepithel hindurch in den Innenraum der Atemwege gelangen und sich dort ansammeln. Die lokalen Ödeme können der Integrität des Atemwegsepithels schaden und zu einem erschwerten Schleimabtransport nach der asthmatischen Sofortreaktion führen [Wanner et al., 1996].

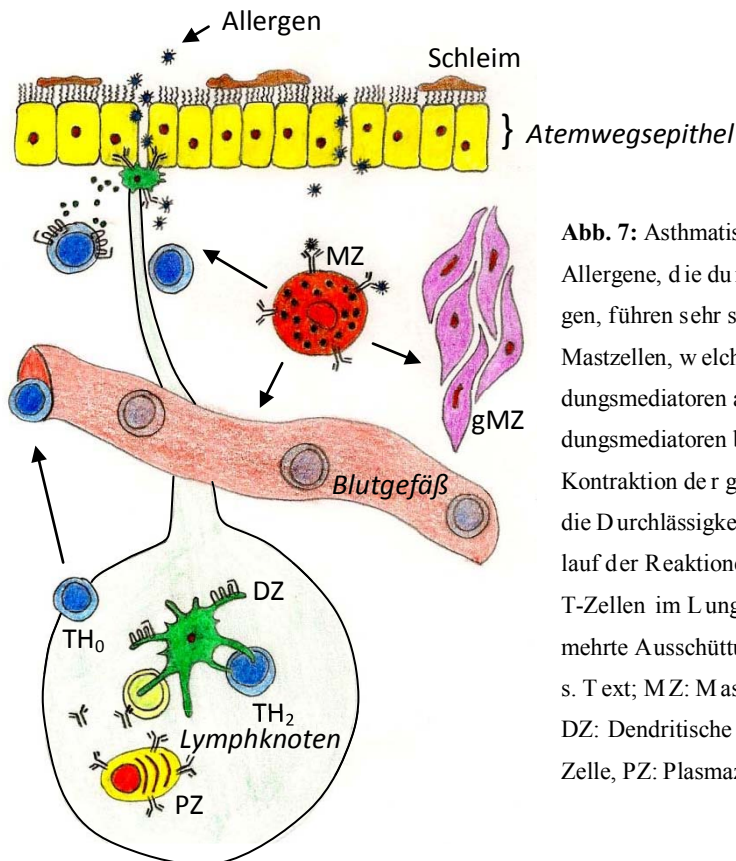


Abb. 7: Asthmatische Reaktionen.

Allergene, die durch das Epithel hindurch gelangen, führen sehr schnell zu einer Aktivierung von Mastzellen, welche daraufhin zahlreiche Entzündungsmediatoren ausschütten. Diese Entzündungsmediatoren bewirken unter anderem die Kontraktion der glatten Muskulatur und erhöhen die Durchlässigkeit der Gefäße. Im weiteren Verlauf der Reaktionen findet eine Ansammlung von T-Zellen im Lungengewebe statt sowie eine vermehrte Ausschüttung von T_{H2}-Zytokinen (näheres s. Text; MZ: Mastzelle, gMZ: glatte Muskulatur, DZ: Dendritische Zelle, T_{H0}: T_{H0}-Zelle, T_{H2}: T_{H2}-Zelle, PZ: Plasmazelle).

Die Spätreaktionen allergischen Asthmas setzen 6 bis 9 h nach Allergenkontakt ein. Diese bestehen aus der Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen Granulozyten [De Monchy et al., 1985], CD4⁺-T-Zellen [Robinson et al., 1993], Basophilen Granulozyten [Guo et al., 1994], Neutrophilen Granulozyten [Koh et al., 1993; Montefort et al., 1994] und Makrophagen [Calhoun et al., 1993]. Im Zuge dessen findet ein selektiver Rückhalt von T-Zellen der Atemwege statt [Mosmann, 1994], Adhäsionsmoleküle werden exprimiert [Las-

salle et al., 1993; Georas et al., 1992; Wanner et al., 1996] und die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren [Liu et al., 1991; Smith et al., 1992] und Zytokine, die an der Rekrutierung und an der Aktivierung der Immunzellen beteiligt sind [Jarjour et al., 1997; Zangrilli et al., 1995], wird eingeleitet. Die Aktivierung der T-Zellen nach Allergenkontakt führt zur Ausschüttung von T_{H2}-spezifischen Zytokinen [Kay et al., 1992]. Die von den Mastzellen sezernierten Zytokine sind der vermutliche Auslöser für die frühe Rekrutierung von weiteren Immunzellen [Bradding et al., 1994]. 24 Stunden nach Allergenexposition können ein Ansteigen aktivierter IL-2 positiver T-Zellen sowie ein Ansteigen der Expression von IL-5 oder GM-CSF-mRNA in Bronchialbiopsien beobachtet werden [Bentley et al., 1993]. Dies deutet auf die Beteiligung von T-Zellen an der chronischen Phase der asthmatischen Reaktionen hin. Eine gesteigerte Hyperreagibilität der Atemwege tritt normalerweise erst nach den Spätreaktionen, nicht aber bereits nach den Spontanreaktionen ein [Cockcroft & Murdock, 1987; Fabri et al., 1991].

Die Spätphasereaktionen allergischen Asthmas gelten als Modellsystem zur Erforschung chronisch entzündlichen Asthmas [Holgate, 1993; Bochner et al., 1994]. Zellen des Immunsystems reifen heran, verlassen das Knochenmark und kreisen durch das Gefäßsystem, bevor sie in die Atemwege rekrutiert werden. Zusätzlich dazu sind hämatopoetische Zellen außerdem in den Atemwegen vorhanden [Robinson et al., 1999]. Bei Asthma ist eine erhöhte Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark vorhanden [Sehmi et al., 1996; Denburg et al., 1994]. Die Rekrutierung von Zellen scheint bei Asthma im Vordergrund zu stehen, wohin gegen die Zellteilung eine eher untergeordnete Rolle spielt. Die genauen Mechanismen diesbezüglich sind allerdings noch nicht exakt geklärt [Demoly et al., 1994].

2.4. Lungenemphysem & COPD

Unter dem Begriff Lungenemphysem versteht man – im Gegensatz zu einer Entwicklungsstörung der Alveolarisierung während der Embryonalentwicklung – eine Vergrößerung des Luftraums der erwachsenen Lunge [Snider et al., 1985]. Ein Lungenemphysem entwickelt sich zwischen dem 45. und dem 60. Lebensjahr als Bestandteil der Krankheit COPD (engl. „*chronic obstructive pulmonary disease*“, zu Deutsch: Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung) bei Rauchern [Filly, 1967]. Außerdem können emphysematische Degenerationen der Lunge beispielsweise als Folge einer Infektion mit HIV-1 [Sahebji, 1992] oder einer allergischen Pneumonitis [Tuder & Voelkel, 2002] auftreten. Die klinischen Symptome von COPD beinhalten sowohl pulmonale als auch extrapulmonale Erscheinungsformen. Zu den pulmonalen Erscheinungsformen von COPD gehören eine Verengung der Atemwege, lokale Entzündungen in den Atemwegen und eine Zerstörung der Lungenbläschen [Finkelstein et

al., 1995]. Zu den extrapulmonalen Erscheinungsformen von COPD gehören Muskelschwund, Osteoporose und Anämie [Cote et al., 2007; Engelen et al., 1999; Sabit et al., 2007]. Obwohl eine vermehrte Schleimproduktion und Husten zu den häufigsten Symptomen gehören, werden schwere COPD-Patienten am meisten durch Dyspnoe in ihrer Lebensqualität beeinträchtigt. Bis heute gilt COPD als unheilbar. Lediglich die Symptome können teilweise durch Inhalation von Bronchodilatoren und, falls nötig, durch zusätzliche Sauerstoffgabe kuriert werden [Celli, 2006].

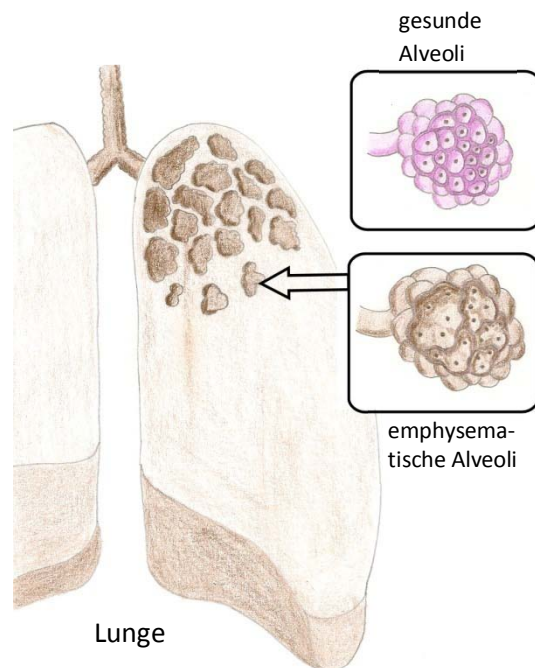


Abb. 8: Lungenemphysem.

Eine gesunde Lunge enthält zahlreiche, in ihrer Integrität und Funktionalität unbeeinträchtigte Lungenbläschen (oberer Teilausschnitt). Ständige Schadstoffbelastung und vorzeitiges Altern der Lunge und Störungen des Protease-Antiprotease-Gleichgewichtes können zu einem Lungenemphysem führen. Bei einem Lungenemphysem sind die Lungenbläschen porös und teilweise miteinander zu einem großen Hohlraum verschmolzen. Die gestörte strukturelle Integrität der emphysematischen Lunge beeinträchtigt deren gesamte Funktion (näheres s. Text)

Als Hauptursache für ein Lungenemphysem gilt Rauchen [Fletcher & Peto, 1998], ausgelöst durch die andauernde Präsenz der im Zigarettenrauch enthaltenen Schadstoffe, die zur Degeneration der Lunge führen. Andere Luftschadstoffe wie Feinstaub oder Ozon werden bezüglich ihres Potentials, ein Lungenemphysem auszulösen, untersucht [Abbey et al., 1998; Jiménez et al., 2000; Karakatsani et al., 2003]. Ein alternatives Konzept zur Genese von COPD stellt die Vorstellung dar, dass COPD das Resultat einer frühzeitigen Alterung der Lunge ist. Die für eine solche frühzeitige Alterung in Frage kommenden Gene kodieren für Proteine, die bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen [Ferrarotti et al., 2003] sowie Gene, die für Antioxidantien und Proteolyseinhibitoren kodieren [Joos et al., 2002; Demeo et al., 2006; Ito et al., 2005]. Viele Aspekte bezüglich der Pathobiologie des Lungenemphysems sind allerdings noch unklar. So kann beispielsweise die ganze Lunge oder nur ein Teil der Lunge von einem Emphysem betroffen sein [Ito et al., 2005].

Die Zerstörung sowohl der epithelialen als auch der endothelialen Kapillarzellen der Alveolen durch proteolytische Enzyme gilt als eine der grundlegenden Mechanismen zur Genese eines Lungenemphysems. Diese Modellvorstellung wird zum einen dadurch untermauert,

dass eine intratracheale Gabe der Cysteinprotease Papain bei Ratten ein Lungenemphysem auslöst [Gross et al., 1964]. Zum anderen führt ein genetischer Defekt eines Inhibitors der Neutrophilen Elastase namens α_1 -Antitrypsin ebenfalls zu einem Lungenemphysem beim Menschen [Eriksson, 1964]. Obwohl viele Forschungsergebnisse das Protease-Antiprotease-Modell stützen, näherten andere Forschungsergebnisse Zweifel daran, ob entzündliche Prozesse in der Lunge notwendig oder ausreichend sind, ein Lungenemphysem zu bedingen [Agusti et al., 2003; Aoshiha et al., 2003; Grumelli et al., 2004; Zhang et al., 2006].

2.5. Pathologische Veränderungen der Lunge bei Asthma und COPD

Sowohl Asthma als auch COPD sind entzündliche Lungenerkrankungen, die teilweise reversibel sind. Zu den Veränderungen der Lunge, die bei beiden Erkrankungen auftreten, zählen eine im Vergleich zu gesunden Menschen geringere Einsekundenkapazität, welche aus einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Obstruktion der Atemwege resultiert. Diese Obstruktion wird, je nach Krankheit, hervorgerufen durch eine Hypertrophie der die Atemwege umgebenden glatten Muskulatur, einer krankhaften Verdickung der Basalmembran und einer vermehrten Schleimproduktion. Außerdem kann bei beiden Erkrankungen das Epithelgewebe der Lunge mehr oder weniger stark geschädigt sein. Zusätzlich dazu können Veränderungen des die Atemwege umgebenden Gefäßnetzes auftreten. Die Summe dieser Veränderungen wird oft als Remodellierung der Atemwege bzw. der Lunge bezeichnet.

2.5.1. Pathologische Veränderungen der Lunge bei Asthma

Bei schwerem Asthma ist der Anteil der Bronchien, die mit glatter Muskulatur ausgekleidet sind, gegenüber gesunden Menschen um ca. 7% erhöht [Dunnill et al., 1969]. Atemwege, deren Durchmesser größer als 2 mm sind, sind bei Asthmatikern 2- bis 4-mal stärker mit glatter Muskulatur versehen als bei gesunden Menschen [Hogg et al., 1993; Pare et al., 1991]. Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der Masse an glatter Muskulatur können neben Hyperplasie und Hypertrophie glatter Muskelzellen [Heard et al., 1973; Ebina et al., 1993; Ebina et al., 1990] auch Transdifferenzierungsvorgänge von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sein, die im Zuge ständiger Allergenprovokation bei Asthma auftreten [Gizycki et al., 1997]. Die direkt unter dem Atemwegsepithel liegende Basalmembran ist bei Asthmatikern ebenfalls verändert. Diese Veränderung betrifft die *lamina fibroreticularis* als Bestandteil der Basalmembran, welche bei der asthmatischen Lunge dicker als bei der gesunden Lunge ist. Die *lamina fibroreticularis* entwickelt sich nach der Geburt [Jeffery, 1998] im frühen Kindesalter bei normal entwickelten gesunden Menschen, und ihre Verdickung

beginnt bei Asthmatikern sehr früh [Payne et al., 2000], lange bevor die Krankheit selbst diagnostiziert wird [Pohunek et al., 1997]. Diese Verdickung bleibt auch dann bestehen, wenn die Asthmaerkrankung therapeutisch mittels Antihistaminika unter Kontrolle gebracht wurde [O'Shaughnessy et al., 1996]. Die Verdickung der *lamina fibroreticularis* steht in positiver Korrelation zu der Hyperreagibilität der Atemwege bei Asthmatikern, der Häufigkeit der Asthmaanfälle sowie der Anzahl von Fibroblasten und Myofibroblasten, die der Basalmembran anliegen [Brewster et al., 1990; Hoshino et al., 1998; Evans et al., 1999]. Eine Hyperplasie der Becherzellen tritt sowohl bei Asthma als auch bei chronischer Bronchitis auf [Aikawa et al., 1992; Shimura et al., 1996; Reid, 1954]. Bei Asthma sind Atemwege, deren Durchmesser kleiner als 2 mm sind, mit Schleim erfüllt. Dies ist allerdings nicht auf eine vermehrte Anzahl an Becherzellen in den besagten Lungenabschnitten zurückzuführen. Ursache dessen könnte sein, dass im Zuge eines Asthmaanfalls massige Mengen an Schleim von den Becherzellen sezerniert werden. Diese könnten sich anschließend an den Becherzellen festsetzen und so zu einer vermehrten Schleimkonzentration in den peripheren distalen Bereichen der Lunge führen [Aikawa et al., 1992]. Bei Asthmatikern sind die submukösen Schleimdrüsen hypertrophiert [Dunnill et al., 1969], und im histologischen Bild können Schädigungen bis hin zum lokalen Verlust des Epithels gefunden werden. Diese Schädigungen sind allerdings nicht flächendeckend über alle Atemwege verteilt: Einige Atemwege weisen trotz deutlicher lokaler Entzündung keinerlei Schädigungen ihres Epithels auf [Carroll et al., 1993]. Sowohl in Sputumproben als auch in BAL-Proben von Asthmatikern können Epithelzellen gefunden werden [Laitinen et al., 1985; Beasley et al., 1989; Jeffery et al., 1989]. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass bei Asthma das Atemwegsepithel geschädigt wird. Dem Verlust des Epithels folgt normalerweise ein Heilungsprozess, an dessen Ende die komplette Regeneration aller Strukturen steht. Ständige Verletzungen des Epithels hingegen führen zu Abnormalitäten wie der Bildung eines Plattenepithelkarzinoms und zu einer Hyperplasie der schleimabsondernden Becherzellen. Bei schwerem Asthma treten Erweiterungen und Verstopfungen der Blutgefäße der Bronchialschleimhaut sowie Ödeme an deren Gefäßwänden auf. Dies kann zu beachtlichen Schwellungen und einer Versteifung der Wände der Atemwege führen [Lambert et al., 1991; Kuwano et al., 1993; Carroll et al., 1997]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Vergrößerung des Gefäßnetzes um die Atemwegswände teilweise auf Angiogenese zurückzuführen ist [Charan et al., 1997]. Angiogenese tritt bei leichtem Asthma und vor allem bei schwerem Asthma auf [Vrugt et al., 2000]. Es ist unklar, ob die erwähnten Veränderungen des Gefäßnetzes eine Konsequenz allergischer Entzündungen oder eine Folge chronischer Infektionen viraler, mykoplasmatischer oder bakterieller Art sind.

2.5.2. Pathologische Veränderungen der Lunge bei COPD

Bei COPD ist die Masse der glatten Muskulatur in den Bronchien und den Atemwegen unverändert [Tiddens et al., 1995]. Allerdings ist bei COPD die Masse an glatter Muskulatur in Bronchien, deren Durchmesser 2 mm unterschreitet, gegenüber gesunden Menschen signifikant erhöht [Bosken et al., 1990; Saetta, 1998; Saetta et al., 2000; Cosio et al., 1980]. Normalerweise besitzen die Bronchien und Bronchiolen, deren Durchmesser kleiner als 2 mm sind, keine oder nur eine sehr geringe Anzahl schleimproduzierender Becherzellen. Bei COPD hingegen befinden sich auch in diesen Lungenbereichen schleimproduzierende Becherzellen, was zu einer vermehrten Schleimansammlung in den entsprechenden Lungenabschnitten führt [Saetta et al., 2000]. Bei COPD sind die submukösen Schleimdrüsen hypertrophiert [Dunnill et al., 1969]. Das Verhältnis seröser zu muköser Acini ist bei COPD im Gegensatz zu gesunden Menschen zu Ungunsten der serösen Acini hin verschoben [Glynn & Michaels, 1960]. Da die serösen Acini ein Sekret absondern, welches unter anderem antimikrobielle Substanzen wie beispielsweise Lysozym, Laktoferrin und die sekretorische Komponente von IgA beinhaltet, könnte dies eine Erklärung dafür sein, warum die Lunge von COPD-Patienten relativ leicht mit Bakterien besiedelt wird. Bei Rauchern, die an COPD oder an Bronchitis leiden, treten Teilverluste des Epithels hingegen weitaus weniger häufig auf als bei Asthmatikern [Beasley et al., 1989; Jeffery et al., 1989; Laitinen et al., 1985]. Bei COPD treten keine Veränderungen dieser Art auf [Kuwano et al., 1993]. Allerdings haben Patienten mit mittelschwerer bis schwerer COPD einen erhöhten pulmonalen Gefäßdruck während körperlicher Anstrengung. Bei Rauchern mit leichter Atemwegsobstruktion sind kleine pulmonale Gefäße in ihren intimalen Bereichen verdickt, bei Rauchern mit schwerer Atemwegsobstruktion sind außerdem zusätzlich zu den intimalen auch die medialen Bereiche der pulmonalen Gefäßwände von einer Verdickung betroffen [Magee et al., 1988; Barbera et al., 1994; Peinado et al., 1998]. Diese Gefäßveränderungen sind höchstwahrscheinlich für den erhöhten pulmonalen Gefäßdruck bei COPD-Patienten verantwortlich.

2.6. Immunbiologie von Asthma und COPD

Asthma und COPD sind unterschiedlich in ihren Entzündungsreaktionen. T-Zellen haben eine wichtige Rolle sowohl bei Asthma als auch bei COPD inne. Die verschiedenen Typen von T-Zellen modulieren die Entzündungsreaktionen beider Krankheiten, was zu jeweils unterschiedlichen Konsequenzen führt. B-Zellen sind ebenfalls wichtig, allerdings ist ihre Rolle bei COPD unklar. Es gibt viele Unterschiede zwischen leichtem Asthma und COPD bezüglich der Art und Weise der Entzündung und daran, welche Zelltypen und Mediatoren an der Entzündung beteiligt sind [Barnes et al., 1998; Barnes, 2004]. Viele der Zytokine und

Chemokine, die bei Asthma und COPD sezerniert werden, werden durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert. Dieser ist sowohl bei Asthma als auch bei COPD in Atemwegsepithelzellen und in Makrophagen aktiv [Hart et al., 1998; Caramori et al., 2003].

2.6.1. Immunbiologie von Asthma

Mastzellen nehmen eine Schlüsselrolle bei Asthma durch Freisetzung von Bronchokonstriktoren einschließlich Histaminen ein, welche als Proforminsekretorischen Granulae vorliegen. Des Weiteren synthetisieren aktivierte Mastzellen die Leukotriene C₄, D₄, E₄ und Prostaglandin D₂. Diese könnten zur Bronchokonstriktion bei Asthma beisteuern, da sie beispielsweise bei Allergenkontakt oder einer Erhöhung der Osmolarität des Blutplasmas als Folge hoher Atemfrequenz bei großer körperlicher Anstrengung ausgeschüttet werden. Außerdem setzen Mastzellen die T_{H2}-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 frei [Galli et al., 2005]. Die Präsenz von Mastzellen in den Atemwegen steht im Zusammenhang mit der bei Asthma auftretenden Atemwegshyperreagibilität: Patienten mit Eosinophiler Bronchitis haben einen vergleichbaren Infiltrationsgrad von Eosinophilen in die Lunge wie Asthmatiker, allerdings leiden sie nicht an einer Hyperreagibilität der Atemwege [Brightling et al., 2002]. Die asthmatische Entzündungsreaktion wird oft als Eosinophile Entzündungsreaktion beschrieben, wohingegen die Entzündungsreaktion, die im Zuge von COPD auftritt, als eine Neutrophile Entzündungsreaktion beschrieben wird. Bei Asthma werden für Eosinophile chemotaktisch wirksame Substanzen wie CCL11/Eotaxin-1 und CC-Chemokine durch Epithelzellen der Atemwege sezerniert. Die funktionelle Rolle der Eosinophilen bei Asthma ist unklar. Es wird angenommen, dass Eosinophile für die erhöhte Hyperreagibilität der Atemwege bei Asthmatikern verantwortlich sind. Dies kann allerdings durch experimentelle Verringerung ihrer Anzahl in den Atemwegen in Frage gestellt werden: Die Gabe von IL-5-spezifischen Antikörpern zur Hemmung von IL-5 führt zu einer deutlichen Abnahme von Eosinophilen im Blut und im Sputum, allerdings tritt keine Besserung der Atemwegshyperreagibilität bei Asthma ein [Leckie et al., 2000; Flood-Page et al., 2007]. Die Anzahl an Makrophagen in der Lunge ist sowohl bei Asthma- als auch bei COPD-Patienten erhöht. Asthmatiker haben einen erhöhten Anteil an CD4⁺-T-Zellen in ihren Atemwegen, von denen ein Großteil dieser Zellen T_{H2}-Zellen sind [Meyer et al., 2008]. T_{H2}-Zellen haben eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen inne, da sie die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 produzieren: IL-4 und IL-13 tragen zur Produktion von IgE durch B-Zellen bei, während IL-5 und IL-9 zur Entwicklung der Eosinophilen, bzw. der Mastzellen im Knochenmark, nötig sind [Kay, 2006].

2.6.2. Immunbiologie von COPD

Bei COPD scheinen Mastzellen keine Rolle zu spielen. Die Anzahl an Makrophagen in der Lunge ist sowohl bei Asthma- als auch bei COPD-Patienten erhöht. Allerdings haben COPD-Patienten einen erheblich höheren Anteil an Makrophagen in der Lunge als Asthmatiker. Die Makrophagen entwickeln sich aus im Körper kreisenden Monozyten, welche durch Chemoattraktanden wie beispielsweise CCL2/MCP1 und CXCL1 in die Lunge einwandern [Traves et al., 2004]. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass Makrophagen die Entzündungsreaktionen bei COPD durch Freisetzung von Chemokinen, die Monozyten und T-Zellen anlocken und durch Freisetzung von Proteasen, insbesondere MMP9, antreiben [Barnes, 2004]. Im Gegensatz zu Asthmatikern haben COPD-Patienten einen erhöhten Anteil von T_{HI} -Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen in ihrer Lunge. T_{HI} -Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3. Der erhöhte Anteil an T_{HI} -Zellen könnte durch die bei COPD erhöhten $IFN\gamma$ -induzierten Konzentrationen der CXCR3-Liganden CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL12/I-TAC, verursacht werden [Saetta et al., 2002; Costa et al., 2008]. Der Anteil an $CD8^+$ -T-Killerzellen ist bei COPD größer als der $CD4^+$ -T-Zellanteil [Grumelli et al., 2004], allerdings ist die Rolle der $CD8^+$ -T-Killerzellen bei COPD noch nicht gesichert. Bei COPD dominieren die $CD8^+$ -T-Killerzellen des Typs 1 (im Folgenden als T_{CI} -Zellen bezeichnet). T_{CI} -Zellen sezernieren ebenfalls wie T_{HI} -Zellen $IFN\gamma$ und exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3, so dass sie zu Orten mit erhöhten CXCR3-bindenden Chemokinen (s.o.) angelockt werden [Grumelli et al., 2004; Costa et al., 2008]. Die Chemokine CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL12/I-TAC hemmen die durch die Bindung des Chemokins CCL11 an seinen korrespondierenden Rezeptor CCR3 vermittelte Signalkaskade, so dass sie vermutlich den Einstrom von Eosinophilen in die an COPD erkrankte Lunge verhindern [Xanthou et al., 2003]. Die Konzentration an CCL5/RANTES in der Lunge ist bei COPD-Patienten ebenfalls erhöht. Dies bewirkt eine verstärkte Rekrutierung von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen mittels CCR5 [Costa et al., 2008]. T_{CI} -Zellen sezernieren Perforine und Granzym B, deren Konzentrationen bei Rauchern, die an COPD erkrankt sind, im Vergleich zu gesunden Rauchern erhöht sind [Chrysofakis et al., 2004]. T_{CI} -Zellen könnten zu einer verstärkten Apoptose von Pneumocyten des Typs I und folglich zur Entwicklung eines Lungenemphysems beitragen [Majo et al., 2001]. Die Einwanderung von T_{CI} -Zellen und T_{HI} -Zellen bei COPD in die Lunge könnte ein sich selbst aufschaukelnder Teufelskreis sein, der in seiner Konsequenz zu einer immer größeren Anzahl an T_{CI} -Zellen und T_{HI} -Zellen in der Lunge führt: Beide Zelltypi sezernieren $IFN\gamma$, dieses stimuliert die Neusynthese von CXCR3-Liganden, welche chemotaktisch für T_{CI} -Zellen und T_{HI} -Zellen wirken, so dass sich immer mehr Zellen dieser Art in der Lunge ansammeln.

2.7. Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden sowohl auf zellulärer Ebene als auch im Tiermodell die Wirkungsmechanismen von Asthma und COPD untersucht.

Auf zellulärer Ebene wurde der Frage nachgegangen, inwiefern Dendritische Zellen und Atemwegsepithelzellen in gegenseitiger Wechselwirkung zueinander stehen und wie sich dies auf weitere Zellen des Immunsystems auswirkt.

NF- κ B ist ein für das Immunsystem äußerst wichtiger Transkriptionsfaktor. Da sowohl bei Asthma als auch bei COPD das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von NF- κ B auf beide Krankheiten im Tiermodell untersucht werden.

Das murine Cathelizidin CRAMP, welches dem humanen LL37 homolog ist, besitzt zusätzlich zu seiner antimikrobiellen Wirkung immunmodulatorische Eigenschaften. Diese Arbeit sollte den Einfluss des antimikrobiellen Peptides CRAMP auf den Verlauf von experimentell induziertem Asthma und experimentell induziertem COPD im Tiermodell aufzeigen.

3. Materialien & Methoden

3.1. Isolation von Monozyten aus Buffycoat und Transdifferenzierung zu Dendritischen Zellen (DZ)

Die Isolation von Monozyten (CD14⁺-Zellen) erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Zellen des Buffycoats (Blutbank der Philipps-Universität Marburg) mittels einer Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und so die Lymphozyten isoliert. Dazu wurde der Buffycoat in ca. 80-100 ml eiskalter PBS/EDTA_{aq}-Lösung (2 mM EDTA, Sigma Aldrich, Taufkirchen, in PBS, PAA Laboratories, Cölbe) aufgenommen, so dass sich ein Endvolumen von 140 ml ergab. Dieses Gemisch wurde dann vorsichtig auf vier mit jeweils 15 ml Ficoll Plaque® Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml; Biochrom AG, Berlin) gefüllte Zentrifugenröhrchen verteilt, so dass sich zwei Phasen bildeten. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 350 g wurden die Bestandteile des Buffycoats aufgetrennt: Die obere Schicht enthielt PBS/EDTA_{aq}-Lösung und Serum; die Lymphozyten schwammen unmittelbar auf der unteren Schicht, die den Rest des Buffycoats enthielt. Die Lymphozyten wurden in PBS/EDTA_{aq}-Lösung aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurden sie in MACS-Puffer (0,5% BSA, 2 mM EDTA, beides Sigma Aldrich, Taufkirchen, in PBS) aufgenommen, um sie für die Separation mittels MACS-Säule vorzubereiten. Der zweite Schritt bestand in der Aufreinigung der Monozyten aus dem Lymphozytengemisch durch Magnetsäulenchromatographie. Zur Aufreinigung der Monozyten aus der gesamten Lymphozytenpopulation wurde das „MACS-Kit“ (Säule LS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet. Die Trennung der CD14⁺-Zellen vom Rest der Lymphozyten erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Kits. Nach Abschluss der Trennung wurden die isolierten Zellen in Differenzierungsmedium (40 ml RPMI 1640, PAA Laboratories, Cölbe, 200 µl GM-CSF und 80 µl IL-4, beides Strathman Biotech AG, Hannover) inkubiert, wo sie binnen 7 Tagen zu naiven Dendritischen Zellen heranreiften (nDZ).

3.2. Air Liquid Interface (ALI) Kultur

Die Prozedur zur Gewinnung primärer humaner Bronchialepithelzellen (pHBEZ) wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Marburg genehmigt. Außerdem wurden die Patienten vorher darüber aufgeklärt, und es wurde ihre Zustimmung eingeholt. Zur Gewinnung von pHBEZ wurde Patientenmaterial, große Bronchien, die bei Operationen entfernt wurden, enzymatisch mittels Protease 14 (Sigma Aldrich, Taufkirchen) aufgeschlossen und daraus die pHBEZ isoliert und tiefgefroren, um sie in flüssigem Stickstoff bei -196°C zu lagern. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst in einem speziellen Wachstumsmedium (*airway epithelial cell growth medium*, PromoCell, Heidelberg) kultiviert, um sie zu

expandieren. Bei Eintritt von ca. 80% Konfluenz wurden sie mittels Trypsin/EDTA (Gibco über Invitrogen, Karlsruhe) vom Kulturschalenboden gelöst und in eine Transwellkultur (Corning Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande) überführt. Mit Erreichen 100% iger Konfluenz wurden die Zellen in ALI-Medium (2% Ultrosor G, PALL Life Sciences, 1% Penicillin/Streptomycin 100x, PAA Laboratories, Cölbe, in D-MEM/HAM F12 [1:1], Gibco über Invitrogen, Karlsruhe) überführt, und an ihrer apikalen Seite wurden sie luftexponiert. Als Maß für den Ausdifferenzierungsgrad der Zellen, bzw. den Ausbildungsgrad der *zona occludens* wurde der transepitheliale Widerstand herangezogen. Ab einem Widerstand von 200 Ω galten die Zellen als ausdifferenziert und wurden für weiterfolgende Experimente benutzt.

3.3. Kokultur von primären Bronchialepithelzellen mit Dendritischen Zellen

Zur Herstellung einer Kokultur von primären humanen Bronchialepithelzellen (pHBEZ) mit Dendritischen Zellen (DZ) wurden nur ausdifferenzierte pHBEZ und DZ herangezogen. Des Weiteren wurden DZ vom Differenzierungs- ins ALI-Medium überführt. Es ist das physikalische Interaktionsmodell von dem löslichen Interaktionsmodell zu unterscheiden.

Beim physikalischen Interaktionsmodell, welches für morphologische Analysen der physikalischen Interaktion beider Zelltypen eingesetzt wurde, diente die porige Transwellmembran zur Adhäsion beider Zelltypen: Jeweils ein Zelltyp adherierte auf jeweils einer Seite der Membran zu Beginn der Kokultur. Dies wurde dadurch erreicht, dass pHBEZ zuerst auf einer der beiden Seiten der ALI-Membran kultiviert wurden, bis sie einen ausdifferenzierten Zellrasen bildeten. Anschließend wurden die DZ auf die gegenüberliegende Seite der pHBEZ auf die ALI-Membran ausgesät, wo sie adherierten. Dazu wurden die Transwelleinsätze umgedreht, und es wurden die DZ in reichlich Medium auf die Unterseite der Membran aufgetropft, so dass der Tropfen mit den DZ die ganze Membran bedeckte und die DZ gut über die Membran verteilt waren. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurde eine feuchte Kammer geschaffen: Die Transwelleinsätze wurden invers orientiert in eine Petrischale gestellt. Diese wurde mit 10 ml PBS befüllt und mit einem Deckel versehen. Nach 1 h wurden die Transwelleinsätze wieder in der ursprünglichen Ausrichtung in die Kammern zurückgestellt. Der relativ große Porendurchmesser (3,0 μm) der ALI-Membran erlaubte eine physikalische Interaktion bzw. eine Migration beider Zelltypen durch die Membran hindurch.

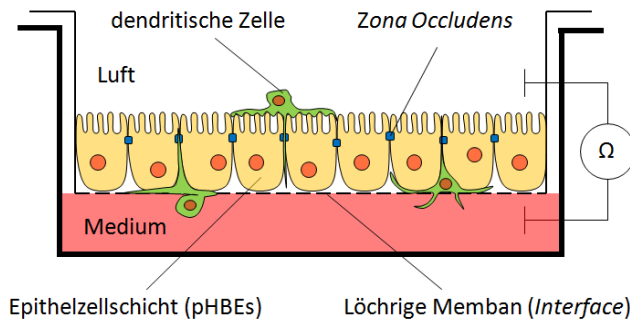


Abb. 9: Ali-Kokultur.

Bronchiale Epithelzellen wachsen auf einer porösen Membran. Die basolaterale Seite der Epithelzellen steht mit Zellkulturmedium in Kontakt; die apikale Seite ist luftexponiert. Als Maß des Ausbildungsgrades der *Zona Occludens* und somit als Maß des Ausdifferenzierungsgrades der Epithelzellen dient der transepitheliale Widerstand zwischen der basolateralen und der (zur Messung mit PBS gefüllten) apikalen Seite der Zellen. Dendritische Zellen wandern durch die poröse Membran in die Epithelzellschicht ein.

Beim löslichen Interaktionsmodell diente die porige ALI-Membran lediglich der Adhäsion ausdifferenzierter pHBEZ. Die geringe Porengröße ($0,4 \mu\text{m}$) ließ hier keine physikalische Interaktion bzw. Zellmigration durch die Membran hindurch zu, so dass lediglich lösliche Faktoren zur Interaktion beider Zelltypen beitragen konnten. Die DZ wurden in die untere Transwellkammer eingebracht. Dieses Kokulturmödel (s. Abb. 9) diente der Erforschung der Rolle von löslichen Faktoren bezüglich der Wechselwirkungen beider Zelltypen.

3.4. Vitalfärbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann mit farbstoffhaltigem Medium (Vitalfarbstoffe: Cell Tracker Orange [$\lambda_A = 541 \text{ nm}$; $\lambda_E = 565 \text{ nm}$], Cell Tracker Green [$\lambda_A = 492 \text{ nm}$; $\lambda_E = 517 \text{ nm}$], Konzentration jeweils $25 \mu\text{M}$ gemäß Standardprotokoll (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe)) für 30 min im Brutschrank (37°C ; $5\% \text{ CO}_2$) inkubiert. Anschließend wurde das vitalfarbstoffhaltige Medium abgesaugt, und die Zellen wurden für weitere 30 min in reichlich Medium im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen ausreichend Zeit hatten, den überschüssigen Farbstoff herauszutransportieren. Danach wurde nochmals zweimal mit reichlich PBS gewaschen. Die so mit Vitalfarbstoff gefärbten Zellen wurden anschließend für weitere Experimente verwendet.

3.5. Visualisierung der *zona occludens* mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zur Visualisierung der *zona occludens* wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Der verwendete Primärantikörper (α -ZO-1 aus Maus; BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) stammte aus der Maus und war gegen das Protein ZO-1, ein Bestandteil der *zona occludens*, gerichtet. Der Sekundärantikörper (α -Maus-TRITC aus Kaninchen [$\lambda_A = 550$ nm; $\lambda_E = 570$ nm]; Acris Antibodies, Herford) war fluorophorgekoppelt und band an den Primärantikörper. Auf diese Weise wurde die *zona occludens* im konfokalen Laserscanmikroskop sichtbar.

Die Zellen wurden zunächst mit reichlich PBS gewaschen und anschließend 30 min lang in Fixierlösung (15% PFA, Roth GmbH, Karlsruhe) in PBS (PAA Laboratories, Cölbe) im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) inkubiert. Danach wurde viermal mit reichlich PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurden die fixierten Zellen über Nacht in Blocklösung (0,1% BSA in PBS) bei 4°C präinkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blocklösung durch Absaugen entfernt. Die nachfolgende Inkubation mit Primärantikörper (α -ZO-1; 7,5 μ g/ml in Blocklösung) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend dreimal mit reichlich PBS gewaschen. Zwischen jedem einzelnen Waschschrift verblieben die Zellen 5 min lang bei Raumtemperatur in PBS. Alle weiteren Schritte erfolgten abgedunkelt, um das am Sekundärantikörper gekoppelte Fluorophor nicht auszubleichen. Die Bindung des Sekundärantikörpers (α -Maus-TRITC; 1:1000 in Blocklösung) wurde 1 h lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit reichlich PBS gewaschen. Zwischen jedem einzelnen Waschschrift verblieben die Zellen 5 min lang bei Raumtemperatur in PBS. Zur Herstellung eines mikroskopierbaren Präparates wurden die Zellen in Mowiol 4-88 (Roth, Karlsruhe) auf Objektträgern eingebettet und mit Deckgläschen abgedeckt. Das frische Präparat wurde über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet.

3.6. Herstellung von Dauerpräparaten aus ALI-Kulturen für die Elektronenmikroskopie

Um Dauerpräparate aus ALI-Kulturen für die Elektronenmikroskopie herzustellen, wurden die ALI-Kulturen zunächst 90 min lang in einer Mischung aus 1,5% Glutaraldehyd (Roth GmbH, Karlsruhe) und 2% Osmiumtetroxid (Roth GmbH, Karlsruhe) in 0,1 M Natriumkacodylatpuffer (Roth GmbH, Karlsruhe) auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Präparate in 0,1 M Natriumkacodylatpuffer gewaschen und für 2h in einer Mischung aus 0,1 M Osmiumtetroxid, welche in 0,1 M Natriumkacodylatpuffer gelöst war, nachfixiert. Als nächstes wurden die Präparate gewaschen; dazu wurden sie viermal für jeweils 5 min in Natriumkacodylatpuffer getaucht und anschließend zweimal mit destilliertem Wasser vor-

sichtig abgespült. Um eine Kontrastfärbung zu erreichen, wurden die Präparate über Nacht in halbgesättigtem Uranylacetat (Roth GmbH, Karlsruhe) inkubiert und anschließend jeweils 5 min lang in destilliertem Wasser gewaschen. Der nächste Schritt bestand in der Dehydrierung der Präparate; dies wurde durch Inkubation mit einer aufsteigenden Acetonreihe erzielt: für jeweils zweimal 10 min wurden die Präparate zunächst in 70% Aceton_{aq}, gefolgt von 90% Aceton_{aq} und schließlich in einem Aceton (Roth GmbH, Karlsruhe) inkubiert. Anschließend wurden die dehydrierten Präparate für 1 h in eine 1:1-Mischung aus Aceton und Araldit (Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und danach über Nacht in 100% Araldit inkubiert. Um die Präparate vollständig zu polymerisieren, wurden diese anschließend erneut in 100% Araldit überführt und 3 Tage lang bei 60°C inkubiert. Nachdem die Präparate auspolymerisiert waren, wurden von ihnen Ultradünnschnitte am Mikrotom (Modell „Ultracut E“; Reichart-Jung, Wien, Österreich) angefertigt und anschließend am Elektronenmikroskop (Modell „Zeiss EM 900“; Zeiss, Oberkochen) analysiert. Sämtliche elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden freundlicherweise von der AG Fehrenbach, Philipps-Universität Marburg, übernommen.

3.7. Herstellung von Dauerpräparaten aus ALI-Kulturen für die konfokale Laserscanmikroskopie

Zur Herstellung mikroskopischer Dauerpräparate für die konfokale Laserscanmikroskopie wurden die ALI-Kulturen zunächst fixiert: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend 15 min lang in Fixierlösung (15% PFA, Roth GmbH, Karlsruhe) in PBS; PAA Laboratories, Cölbe) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, und die Transwellmembran wurde für die Herstellung der Dauerpräparate vorbereitet. Die Transwelleinsätze der ALI-Kulturen wurden an den Rändern der Membran zunächst mit einem Skalpell vorsichtig perforiert. Dann wurde auf einen Objektträger ein Tropfen Mowiol 4-88 (ca. 5 bis 10 µl) pipettiert. Anschließend wurde der perforierte Transwelleinsatz mit der Membranunterseite luftblasenfrei und vorsichtig auf den Tropfen Mowiol 4-88 gelegt. Mittels eines speziellen Röhrchens, welches exakt in den Transwelleinsatz hineinpasst, wurde die perforierte Membran mitsamt Zellen ausgestanzt. Nachdem ein weiterer kleiner Tropfen auf die Oberseite der Membran pipettiert wurde, wurde luftblasenfrei und behutsam ein Deckglas auf die Membran gelegt und vorsichtig angeedrückt, so dass sich das Mowiol 4-88 über das ganze Präparat verteilen konnte. Die Aushärtung des Präparats erfolgte im Dunkeln über Nacht.

3.8. Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die Dauerpräparate wurden zur morphologischen Analyse mit einem konfokalen Laser-Scannmikroskop (LSM 510 Meta, Carl-Zeiss, Jena) ausgewertet. Jedes Präparat wurde Ebene für Ebene gescannt, so dass eine spätere räumliche Rekonstruktion möglich war (s. Abb. 10). Die Laser emittierten Licht der Wellenlängen 488 nm und 540 nm, um die beiden Farbstoffe während des Scans anzuregen. Die emittierten Lichtwellen wurden mittels geeigneter Filtereinstellungen voneinander getrennt, durch Photosensoren aufgefangen und digital verarbeitet, so dass ein Abbild der jeweiligen Raumebene erstellt werden konnte.

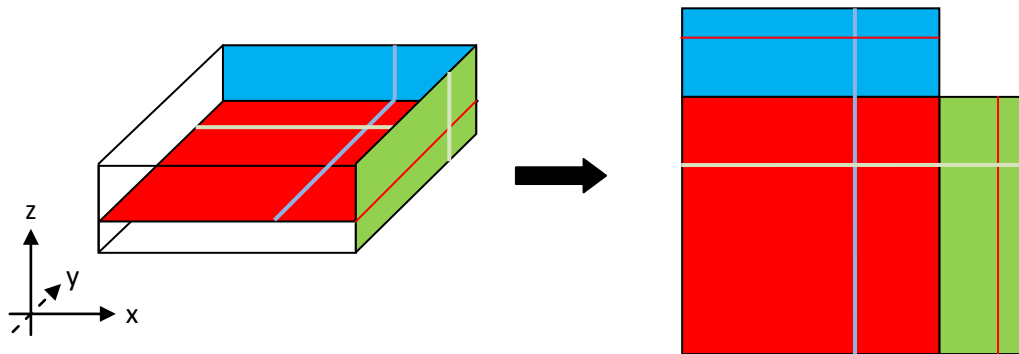


Abb. 10: Räumliche Erfassung der Präparate.

Um die Präparate räumlich zu erfassen, wurde derjenige Abschnitt, in dem sich die Kokultur befand, in mehrere x-y-Ebenen aufgeteilt und anschließend übereinandergelegt, so dass sich ein Z-Stapel von x-y-Ebenen ergab (x: Breite; y: Tiefe; z: Höhe). Um das so erfasste dreidimensionale Modell der Kokultur zweidimensional darzustellen, wurde es in den zweidimensionalen Raum des Monitors projiziert: Die rote Fläche stellt die x-y-Ebene dar (Sicht von oben), die grüne Ebene stellt die y-z-Ebene dar (Sicht von rechts) und die blaue Ebene stellt die x-z-Ebene (Sicht von vorne, bzw. hinten) dar. Mittels des in jeder Ebene dargestellten Fadekreuzes kann jeder anvisierte Punkt im dreidimensionalen Modell zweidimensional in allen Ebenen dargestellt werden.

3.9. Hitzeinaktivierung von Bakterien

Um hitzeinaktivierte Bakterien zu erhalten, wurden sie in LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler in einer Vorkultur mit 100 ml Volumen herangezüchtet. Am nächsten Tag wurde ein Tropfen dieser Vorkultur in einer neuen Kultur mit einem Volumen von 20 ml bis zu einer Bakteriendichte von 0,3 (Extinktionskoeffizient photometrisch gemessen bei 600 nm Wellenlänge; $OD_{600} = 0,3$) herangezüchtet und anschließend abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in PBS gewaschen und erneut in PBS aufgenommen. Um die Bakterien abzutöten, wurden sie anschließend 30 min lang bei 95°C inkubiert. Um die Kokulturen zu stimulieren, wurden sie mit den abgetöteten Bakterien im Verhältnis 1:100 (abgetötete Bakterien in PBS:Zellkulturmedium) über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.10. FACS-basierte Analyse des Migrationsverhaltens Dendritischer Zellen

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von DZ durch eine Epithelzellschicht wurden beide Zelltypen zunächst wie unter „Kokultur von primären Bronchialepithelzellen mit Dendritischen Zellen“ geschildert, kultiviert und mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie unter „Vitalfärbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen“ beschrieben, angefärbt. Anschließend wurde die Epithelzellschicht zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-(*fluorescence activated cell sorter*)-Analyse („FACSort“ BD Cellquest Pro, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien) auf ihren Gehalt von DZ hin überprüft. Dazu wurden die Zellen oberhalb der ALI-Membran mittels Trypsin/EDTA-Lösung von der ALI-Membran abgelöst und anschließend im FACS-Gerät analysiert. Die Rohdaten wurden mit einem Computerprogramm (WinMDI, 2.8 Software [Joseph Trotter; <http://facs.scripps.edu/software.html>]) ausgewertet.

3.11. Kokultivierung und Stimulierung von DZ mit naiven T-Zellen und Messung am FACS-Gerät

Um *in vitro* den Einfluss von pHBEZ auf DZ zu untersuchen, wurden zunächst Kokulturen von pHBEZ mit DZ angelegt und anschließend apikal mit 0,5 µg/ml LPS (*E. coli*, Serotyp 0111:B4 ultrarein, Invitrogen, Cayla-Toulouse, Frankreich) stimuliert. Anschließend erfolgte die Isolation der DZ und deren Kokultivierung mit humanen naiven T-Zellen inklusive Stimulation und nachfolgender Analyse durch das Institut für Mikrobiologie an der Philipps-Universität Marburg.

Die Prozedur zur Gewinnung humaner naiver CD4⁺-Zellen aus Spenderblut bestand aus zwei Schritten: Im ersten Schritt wurden Lymphozyten über eine Dichtegradientenzentrifugation angereichert, und im zweiten Schritt wurden die im Lymphozytengemisch enthaltenen CD4⁺-Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle von den übrigen Lymphozyten getrennt. Zum Schluss wurden die isolierten Zellen per FACS-Analyse auf ihre Reinheit hin überprüft.

Das Spenderblut wurde zunächst um den Faktor 1:3 mit PBS (Biochrom AG, Berlin) verdünnt. Um die Lymphozyten von den übrigen im Blut enthaltenen Zellen zu trennen, wurde das Blut-PBS-Gemisch vorsichtig in ein mit 15 ml Ficoll (Biochrom AG, Berlin) befülltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, so dass sich zwei Schichten bilden konnten. Anschließend erfolgte ein 20-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1600 U_{min} ohne Bremse. Dadurch bildete sich ein weißer Lymphozytenring, der vorsichtig in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit reichlich PBS vermischt wurde, so dass sich ein Endvolumen von 50 ml ergab. Diesem Schritt folgte ein weiterer zehnminütiger

Zentrifugationsschritt mit aktivierter Bremse bei 1800 U_{\min} . Danach wurde der Überstand verworfen, und die Zellen wurden für die nachfolgende magnetsäulenchromatographische Aufreinigung vorbereitet.

Nach erfolgter Zentrifugation in PBS wurde das über dem Pellet befindliche PBS dekantiert. Das Pellet wurde in 50 ml MACS-Puffer (500 ml PBS+0,2% hitzeinaktiviertes AB-Serum (Sigma Aldrich, Taufkirchen) + 2 ml EDTA (Roth GmbH, Karlsruhe)) resuspendiert und anschließend 10 min lang bei 1300 U_{\min} zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal in MACS-Puffer gewaschen und jeweils nachfolgend bei 1100 U_{\min} zentrifugiert. Um die Zellen für die nachfolgende Separierung per Magnetsäulenchromatographie vorzubereiten, wurde das Pellet in 20 ml MACS-Puffer aufgenommen, mit Trypanblau (Gibco, Karlsruhe) gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Jeweils 10^7 Zellen wurden in 40 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 10 μ l biotinyliertem Antikörpercocktail (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) versetzt, gut gemischt und 20 min lang auf Eis inkubiert. Um die zu isolierenden Zellen mit Magnetkügelchen zu versehen, wurden nach Ablauf der zwanzigminütigen Inkubationszeit 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l Anti-Biotin-Kügelchen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pro 10^7 Zellen hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit bis 2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen und anschließend 5 min lang bei 1500 U_{\min} zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in einem Volumen von 500 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und anschließend auf eine mit 3 ml MACS-Puffer vorinkubierte LS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gegeben. Um die Säule zu spülen, wurde zunächst dreimal 1 ml MACS-Puffer und anschließend zweimal 3 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Um die Zellen zu eluieren, wurde die Magnetsäule von dem Magneten entfernt. Anschließend wurden 5 ml MACS-Puffer mittels einer Spritze durch die Säule hindurchgedrückt und das Eluat aufgefangen.

300 μ l des Eluats wurden zur Überprüfung des Reinheitsgrades mit PE-gekoppeltem anti-CD4 (eBioscience/Nature GmbH, Frankfurt a.M.) für bis 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von FITC-gekoppeltem anti-CD45RA (eBioscience/Nature GmbH, Frankfurt a.M.) und eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde per FACS-Analyse die Reinheit der isolierten CD4⁺-Zellpopulation ermittelt. Die isolierten Zellen wurden dann in RPMI-Medium kultiviert.

Die Kokultur von DZ mit naiven T-Zellen wurde in eigens dafür vorbereiteten 24-Lochplatten (Greiner-Bio-one, Solingen-Wald) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die 24-Lochplatten für mindestens 1 h mit 2 μ g/ml α -CD3 (Institut für Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg) im Brutschrank inkubiert und anschließend mit BSA gewaschen, um sie mit α -CD3 vorzubeschichten. Danach wurden die Zellen hinzugefügt: Pro Loch wurden 70.000 DZ mit 1 Mio. T-Zellen in RPMI 1640-Medium (500 ml RPMI + 2% AB-Serum

(Sigma Aldrich, Taufkirchen) + 500 µl Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) + 500 µl Penicillin (Biochrom AG, Berlin)) inkubiert. Zur Kontrolle wurden außerdem T-Zellen in Medium kultiviert, welches aus dem Überstand von Kokulturen aus DZ mit pHBEZ stammt. Um die Zellen zusätzlich zu stimulieren, wurde dem Medium der Kokultur aus DZ mit naiven T-Zellen eine Kombination aus rekombinantem humanen IL-2 ($20^{\text{Einheiten/ml}}$) mit α h-CD28 (15 µg/ml, (Sigma Aldrich, Taufkirchen)) zugesetzt. Nach Abschluss einer 6-tägigen Inkubation in diesem stimulationsfördernden Milieu erfolgte eine Restimulation der Zellen. Dazu wurden die Zellen zunächst geerntet und in PBS gewaschen. Um die Zellen zu restimulieren, wurden sie 5 h lang im Brutschrank in RPMI-Medium, welches zusätzlich einen Mix aus 50 ng/ml PMA (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 750 ng/ml Ionomycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma Aldrich, Taufkirchen) enthielt, kultiviert.

Um die T-Zellen, respektive das Ergebnis der Stimulation der Kokultur aus DZ, welche zuvor in Kokultur mit pHBEZ kultiviert wurden, mit naiven T-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach Ablauf der fünfständigen Restimulationszeit zunächst in Saponinpuffer (0,3% Saponin (Roth, Karlsruhe) + 2% FCS (Gibco, Karlsruhe) in PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit diversen Farbstoffen (Farbstoff A und Farbstoff B, s. Tab. 2) für 30-40 min im Dunkeln auf Eis, so dass eine T-Zellantwort als Reaktion auf die Bedingungen der Kokultivierung naiver T-Zellen mit DZ inklusive der Stimulation wie oben beschrieben, bestimmt werden konnte.

Tab. 2: Verwendete Farbstoffe zur Bestimmung der T-Zellantwort.

Um den Einfluss von DZ, die in Kokultur mit pHBEZ kultiviert wurden, auf die T-Zellantwort zu bestimmen, wurden die stimulierten T-Zellen für die FACS-Analyse mit diversen unten aufgeführten Farbstoffen gefärbt (¹BD Pharmingen, Heidelberg, ²eBioscience/Nature GmbH, Frankfurt a.M.).

T-Zellantwort	Farbstoff A	Farbstoff B
T _{H17}	α h-CD4-FITC ¹	α h-IL-17A-PE ²
T _{reg}	α h-CD4-PE ²	α h-FOXP3-FITC ²
T _{H1}	α h-CD4-PE ²	α h-IFN γ -FITC ²
T _{H2}	α h-CD4-FITC ¹	α h-IL-4-PE ²

Danach wurden die Zellen einmal in Saponinpuffer und einmal in PBS/1% FCS gewaschen. Um die T-Zellantwort der gefärbten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen in 200-300 µl PBS/1% FCS aufgenommen bevor sie am FACS-Gerät („FACSort“ BD Cellquest Pro, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien) analysiert wurden.

3.12. Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Zur Bestimmung des Zytokingehaltes von proteinhaltigen Proben wurde die ELISA- (*enzyme linked sorbent immuno assay*) Technik angewendet. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) gemäß Standardprotokoll verwendet. Generell wurden alle Standards und Proben doppelt aufgetragen, um Fehler zu minimieren. Des Weiteren wurden zur Bestimmung des Signalrauschens zwei Leerwerte bestimmt, die dann später bei der Auswertung von den Rohdaten abgezogen wurden. Generell wurde, grob beschrieben, wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde der Primärantikörper, gelöst in Beschichtungspuffer (2,1 g NaHCO₃, Merck, Darmstadt in 500 ml H₂O dest. pH = 9,6; eingestellt mit Na₂CO₃, Merck, Darmstadt) in die Lochplatte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Blocklösung (Roche Diagnostics, Mannheim) für 2 h bei Raumtemperatur nachbeschichtet. Danach wurden die Standards in einer sieben teiligen Standardreihe in jeweils von Standard zu Standard halbierten Konzentrationen sowie die Proben aufgetragen. In zwei Löcher wurde, um den durchschnittlichen Leerwert zu bestimmen, lediglich Diluent (0,1% BSA in PBS) pipettiert. Die Lochplatte wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der 2 h wurde Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim) in die Löcher pipettiert und nochmals für 30 min inkubiert. Anschließend wurde TMB-Lösung (Calbiochem über Merck, Darmstadt) in die Löcher pipettiert und so lange inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung zu sehen war. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde Stop-Lösung (9,1 % H₂SO₄ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in H₂O) hinzugegeben, so dass ein Farbumschlag von blau nach gelb eintrat. Der nun fertige ELISA wurde dann in einem Lesegerät (Modell „Ultra 384“, Tecan, Crailsheim) bei 450 nm entwickelt.

Zur Verdünnung von Standards, Proben, biotinyliertem Sekundärantikörper und Streptavidin-POD-Konjugat wurde Diluent eingesetzt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimal mit Waschpuffer (PBS plus 0,1% Tween 20, Roth, Karlsruhe) gewaschen. Das jeweilige Auftragevolumen betrug 100 µl.

3.13. Haltung und Genotypisierung von Mäusen

Sämtliche Mäuse wurden im Tierstall des B MFZ vom Tierpflegepersonal unter SPF- („*specific pathogen free*“)-Bedingungen gehalten. Zur Genotypisierung wurde eine Schwanzbiopsie vorgenommen und daraus der Genotyp per PCR-Methode und anschließender Agarosegelelektrophorese (s.u.) unter Verwendung eines Gewebeaufbereitungskits („RED Extract N-Amp Tissue PCR Kit“ für 1000 Reaktionen; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ermittelt. Sämtliche Primer für die Genotypisierung wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, bezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit verschiedenen transgenen Mäusen gearbeitet. Diese trugen, je nach Maus, künstlich gesetzte Gendefekte (Knockouts) der antimikrobiellen Peptide m-BD-1 oder CRAMP bzw. Knockouts von Komponenten der NF κ B-Signalkaskade in sich. Der Knockout der NF κ B-spezifischen Proteine p65 und I κ B α war nur in myeloischen Zellen präsent.


Die PCR-Methode (engl. *polymerase chain reaction*; PCR-Gerät Modell „MyCycler“ von Bio-Rad Laboratories GmbH, München) dient dem Nachweis einzelner Genabschnitte. Prinzipiell erfolgt dies durch kleine als Primer bezeichnete Oligonukleotide, die komplementär zu dem nachzuweisenden Genabschnitt in Richtung 3' (Vorwärtsrichtung) bzw. 5' (Rückwärtsrichtung) sind. Durch mehrmalige Zyklen von Schmelzen (Trennung der DNS-Doppelstränge), einer daran anschließenden Bindephase der Primer (engl.: „*annealing*“), an die sich eine Synthesephase anschließt, wird der betreffende Genabschnitt so oft amplifiziert, dass er mittels DNS-Gelelektrophorese nachweisbar ist. Die Synthesephase wird von sogenannten Taq-Polymerasen, das sind spezielle kommerziell erhältliche DNS-Polymerasen, durch Verknüpfung von Desoxyribonukleotiden bewerkstelligt, so dass nach Ablauf eines Synthesesyklus eine exakte Kopie des durch die Primer spezifizierten DNS-Abschnitts vorliegt [Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988].

Bei der DNS-Gelelektrophorese werden DNS-Fragmente aufgrund unterschiedlicher Größe in einer Agarosegelmatrix (Gelkammer Modell „Midikammer HU13“ von Biostep GmbH, Jahnsdorf), durch Anlegen eines elektrischen Feldes Stromversorgung für Gelkammer (Modell „Mini Electrophoresis Power Supply E 143“ von Consort nv, Turnhout, Belgien) getrennt: Große Fragmente durchqueren die Matrix entlang des elektrischen Feldes langsamer als kleine, so dass sich Fragmente gleicher Größe in einer Bande im Gel ansammeln. Die Banden werden durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe), das sich in die DNS einlagert und unter UV-Licht leuchtet, visuell nachgewiesen. Zur Ermittlung der Bandenlängen diente ein Längenstandard („ORangeRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use“ von Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

3.14. CRAMP Knockout

Um den Einfluss von CRAMP auf Asthma und COPD zu untersuchen, wurden genetisch veränderte Mäuse des Stammes SVJ/129 (Dr. R. Gallo, Universität San Diego, USA) eingesetzt. Bei diesen Mäusen wurden zwei von vier Exons durch eine Neomycinresistenz ersetzt, so dass kein funktionales CRAMP mehr synthetisiert werden kann [Nizet et al., 2001]. Zur Bestimmung des Genotyps wurde mittels zweier Primerpaare eine PCR mit anschließender DNS-Fragmentgrößenbestimmung wie folgt durchgeführt: Dem Nachweis der WT-Form von CRAMP diente das Primerpaar 5'-TGT TTT CTC AGA TCC TTG GGA GC-3' und 5'-AAT TTT CTT GAA CCG AAA GGG C-3' und für den Nachweis der unfunktionalen (Knockout-) Form von CRAMP wurde das Primerpaar 5'-CCA GGG ACT TCC ATC CAG TAG AC-3 und 5'-AGA CTG CCT TGG GAA AAG CG-3' verwendet. Anschließend wurde eine PCR gemäß dem in Tabelle 3 aufgeführten Programm durchgeführt und die somit vervielfältigten DNS-Abschnitte mittels Gelelektrophorese analysiert.

Tab. 3: PCR-Programm für CRAMP knockout Mäuse.

	Temperatur [°C]	Zyklusdauer [min:sec]	Wiederholungen
	94	3:00	1
	94	0:20	
	60	0:30	40
	72	0:30	
	72	10:00	1
	4	∞	1

3.15. NF-κB Knockout

Das Prinzip des CRE-loxP-Systems ist, dass ein bestimmter Gensequenzabschnitt („geloxter“ Genabschnitt), der von Konsensussequenzen der CRE-Rekombinase (loxP-Konsensussequenzen) flankiert wird, durch die CRE-Rekombinase entfernt wird. Resultat dessen ist ein Verlust der betreffenden Gensequenz und infolgedessen die Zerstörung des betreffenden Gens [Kühn & Schwenk, 1997].

3.15.1. LysM::Cre transgene Mäuse

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die NF-κB-Signalkaskade myeloischer Zellen auf Asthma und COPD hat, wurden Mäuse, deren myeloische Zellen die CRE-Rekombinase exprimieren [Clausen, 1999], mit Mäusen gekreuzt, die entweder ein mit loxP-Sequenzen

flankiertes Gen kodierend für p65 oder ein mit loxP-Sequenzen flankiertes Gen kodierend für IκBα haben. Auf diese Weise war es möglich, die für p65 oder IκBα kodierenden Gene gezielt in myeloischen Zellen unfunktional zu machen. Der Nachweis des Vorhandenseins des LysM::Cre-Genkonstruktes erfolgte durch die PCR-Methode mittels des folgenden Primerpaares: 5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3' und 5'-GTG AAA CAG CAT TG C TG T C AC TT -3 unter Verwendung des in Tabelle 4 aufgeführten PCR-Programmes.

Tab. 4: PCR-Programm für LysM::Cre transgene Mäuse.

Temperatur [°C]	Zyklusdauer [min:sec]	Wiederholungen
94	3:00	1
94	0:30	
60	1:00	35
72	1:00	
72	2:00	1
4	∞	1

3.15.2. p65^{lox/lox} transgene Mäuse

Bei diesen Mäusen wurden loxP-Konsensussequenzen über mehrere Zwischenschritte zwischen Exon 6 und Exon 7 sowie zwischen Exon 10 und Exon 11 eingefügt [Algül et al., 2007]. Im Falle der Präsenz aktivierter Cre-Rekombinase wird aus dem für p65 kodierenden Gen das Stück zwischen Exon 7 und Exon 10 herausgeschnitten, so dass ein unfunktionales Allel von p65 zurückbleibt. Der Nachweis des Vorhandenseins dieses Konstruktes erfolgte mittels der PCR-Methode unter Verwendung der Primer 5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3' und 5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3', gemäß dem in Tabelle 5 aufgeführtem PCR-Programm.

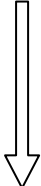
Tab. 5: PCR-Programm für p65^{lox/lox} transgene Mäuse.

Temperatur [°C]	Zyklusdauer [min:sec]	Wiederholungen
94	4:00	1
94	0:30	
60	0:30	40
72	1:30	
72	10:00	1
4	∞	1

3.15.3. $\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ transgene Mäuse

Diese Mäuse tragen zwei loxP-Konsensussequenzen in ihrem für IkBa kodierenden Gen. Sie befinden sich vor der Promotorregion und zwischen Exon 2 und Exon 3. Im Falle der Präsenz aktivierter Cre-Rekombinase wird aus dem für IkBa kodierenden Gen das Stück vor der Promotorregion und vor Exon 3 herausgeschnitten, so dass ein unfunktionales Allel von IkBa zurückbleibt. Für die Überprüfung des Vorhandenseins der loxP-Konsensussequenzen wurde eine PCR mit dem in Tabelle 6 beschriebenen Programm unter Verwendung der folgenden Primer genutzt: 5'-GTG GAG TCA GAT GTA GCA CG-3' und 5'-AGA AAG GGA TAA GCC ATG GAG-3' [Rupek et al., 2005].

Tab. 6: PCR-Programm für $\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ transgene Mäuse.

	Temperatur [°C]	Zyklusdauer [min:sec]	Wiederholungen
	94	2:00	1
	94	0:30	30
	60	0:40	
	72	0:40	1
	72	10:00	
	4	∞	1

3.15.4. $\text{p65}^{\text{lox/lox}}$ $\text{LysM}::\text{Cre}$ transgene Mäuse

Um den Einfluss einer dauerhaften Inaktivierung von p65 in myeloischen Zellen im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurden $\text{LysM}::\text{Cre}$ transgene Mäuse mit p65^{lox} transgenen Mäusen gekreuzt. Die Versuchstiere waren homozygot bezüglich p65^{lox} ($\text{p65}^{\text{lox/lox}}$ $\text{LysM}::\text{Cre}$). Die Kontrolltiere waren homozygot für das WT-Allel von p65 ($\text{p65}^{\text{wt/wt}}$ $\text{LysM}::\text{Cre}$). Die Überprüfung der entsprechenden Genotypi erfolgte per PCR wie in den entsprechenden Mäusen beschrieben.

3.15.5. $\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ $\text{LysM}::\text{Cre}$ transgene Mäuse

Um zu klären, inwieweit myeloisches NF- κ B bei Asthma und COPD eine Rolle spielt, wurden transgene Mäuse, die homozygot bezüglich einem Knockout von myeloischem IkBa waren, verwendet. Diese gingen durch Kreuzung aus $\text{LysM}::\text{Cre}$ transgenen Mäusen mit $\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ transgenen Mäusen hervor. Die Versuchstiere hatten den Genotyp $\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ $\text{LysM}::\text{Cre}$.

LysM::Cre, und der Genotyp der Kontrolltiere war LysM::Cre. Die Überprüfung der entsprechenden Genotypi fand via PCR statt.

3.16. Experimentell induziertes *Asthma* nach dem Ovalbumin-Modell

Um bei Mäusen nach Ovalbuminaerosolexposition eine Eosinophile Atemwegsentszündung hervorzurufen, wurden sie zuerst gegen Ovalbumin sensibilisiert. Dazu wurde den Mäusen an den Versuchstagen 1, 14 und 21 200 µl Ovalbuminlösung (10 µg Ovalbumin; Reinheitsgrad VI von Sigma Aldrich, Taufkirchen; und 1,5 mg Al(OH)₃; Imject® Alum von Pierce, Rockford; gelöst in PBS) intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte an den Versuchstagen 26 und 27 die Ovalbuminaerosolexposition, mit Ovalbumin Reinheitsgrad V, in einer eigens dafür vorgesehenen Expositionskammer (Vernebler Modell „LL Vernebler“, Kompressor Modell „Master Kompressor“ und Luftleitungsschläuche von Pari, Starnberg). Im Falle des akuten Asthmodells erfolgte anschließend am Tag 28 die Präparation der Mäuse. Im Falle des chronischen Asthmodells erfolgte wöchentlich eine zweimalige Ovalbuminaerosolexposition über 4 Monate. Sämtliche Ovalbuminaerosolexpositionen fanden unter einer Sterilbank (Modell „LaminAir HLB 2448“ von Heraeus, Langenselbold) mit eingeschaltetem Abzug statt.

3.17. Experimentell induzierte COPD

Zur Auslösung einer experimentellen COPD bzw. zur akuten Exposition von Zigarettenrauch bei Mäusen wurde eine Rauchexpositions-kammer verwendet. Diese bestand aus einem Käfig mit Deckel, in den ein Gemisch von Luft und Zigarettenrauch in frei einstellbaren Anteilen eingeleitet werden konnte. Als Zigarettenrauchquelle dienten Zigaretten der Firma *Philip Morris* (Bezeichnung: *Marlboro 100*; 11 mg Teer, 0,9 mg Nikotin). Sämtliche Rauchexpositionen fanden unter einer Sterilbank mit eingeschaltetem Abzug statt. Die Raumluft bzw. der Zigarettenrauch wurde in diesem Versuchsaufbau mittels eines jeweils separaten Beatmungsgerätes (Ventilationssystem von Ugo Basile, Comerio, Italien) angesaugt, die korrespondierenden Luftströme über ein T-Stück zusammengeführt und in die Rauchexpositions-kammer geleitet.

Um eine experimentelle COPD auszulösen, wurden maximal 20 Versuchstiere gleichzeitig beraucht. Dies geschah 3 Monate lang jeweils fünfmal pro Woche mit drei Zigaretten pro Tag. Die volumenströmfördernden Beatmungsgeräte wurden so eingestellt, dass sich ein Zigarettenrauchvolumenstrom von 33 ml/min ergab. Der Raumluftvolumenstrom wurde auf 260 ml/min eingestellt. Bei diesen Einstellungen brannte eine Zigarette in 10 min ab. Nach

jeder abgebrannten Zigarette wurde eine 20-minütige Rauchexpositionsphase eingelegt, so dass die tägliche Expositionsdauer inklusive Pausen jeweils 90 min betrug.

3.18. Sektion von Mäusen und Analyse

Bevor die Mäuse präpariert wurden, wurden sie zunächst mit 200 µl einer Mischung aus Rompun (0,18 mg Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und Ketanest (2,5 mg Ketaminhydrochlorid, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg) betäubt, die intraperitoneal injiziert wurde. Nachdem die Betäubung eingesetzt hatte, wurde die Maus mit dem Rücken auf den Präpariertisch gelegt und mit Nadeln fixiert. Mittels einer Spritze („Plastikpak“ und Kanüle „Microlance3“ 26G ½” 0,45 x 13 mm, beides von Becton Dickinson, Heidelberg) wurde zuerst Blut direkt aus dem noch schlagenden Herzen entnommen. Anschließend wurden der Brustkorb und der Hals geöffnet sowie die Trachea freipräpariert. Zur Durchführung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde in die nun freiliegende Trachea eine Braunüle (Vasofix Kanüle 20G 1¼” 1,1 x 33 mm, Braun, Melsungen) eingeführt. Durch diese wurden dann vorsichtig dreimal nacheinander jeweils 1 ml PBS gedrückt, und die austretende Flüssigkeit wurde aufgefangen und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Präparation der Lunge vorbereitet. Um den linken Lungenflügel zu homogenisieren, wurde er zuerst abgebunden, abgetrennt und anschließend mittels eines Homogenisators (Modell „Ultra Turrax® IKA T 18 Basic, IKA works Inc., Wilmington, USA) zerkleinert. Aus dem Lungenhomogenisat wurden später mittels ELISA Zytokine bestimmt. Die restliche Lunge wurde entnommen und mit Fixierlösung (37% Formaldehyd, Merck; Darmstadt; gelöst 1:10 in PBS) aufgepumpt und abgebunden, um die Lungenstruktur zu konservieren, und anschließend in ein Gefäß mit Fixierlösung überführt.

3.18.1. Bestimmung der Gesamt- und Differenzialzellzahl der bronchoalveolären Lavage

Zur Ermittlung der Gesamt- und Differenzialzellzahl in der BAL wurde die während der Präparation gewonnene Flüssigkeit zuerst in ihrem Volumen durch Wiegen bestimmt. Anschließend wurde nach nochmaligem leichtem Schütteln 200 µl der BAL-Flüssigkeit entnommen, um deren Gesamtzellzahl zu bestimmen. Dies wurde mittels eines Zählgerätes durchgeführt. Die restliche BAL-Flüssigkeit wurde 10 min lang bei 900 U_{min} und 4°C zentrifugiert, um die enthaltenden Zellen zu pelletieren. Aus dem Überstand wurden mittels ELISA Zytokine bestimmt. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen, wovon ca. 200 µl 10 min lang bei 500 U_{min} in einer Zytozentrifuge (Modell „Cytospin 2“, Shandon/Thermo Scientific, Langenselbold) auf einem Objektträger zentrifugiert wurden. Anschließend wurde

mikroskopisch bestimmt, ob genügend Zellen zur Differenzialzellzählung auf dem Objektträger vorhanden waren. War dies nicht der Fall, so wurde erneut die angepasste Menge des in 1 ml aufgenommenen Zellpellets in der Zytocentrifuge zentrifugiert. Die Präparate wurden anschließend über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag durch eine paoptische Zellfärbung (kombinierte May-Grünwald-Giemsä-Färbung) angefärbt: Zuerst wurden die Präparate 5 min lang mit May-Grünwald-Färbelösung (Merck, Darmstadt) inkubiert und anschließend zweimal mit Leitungswasser gewaschen. Diesem Schritt folgte eine Inkubation für 20 min mit Giemsa-Gebrauchslösung (Roth, Karlsruhe) und anschließendes zweimaliges Waschen mit Leitungswasser. Die so gefärbten Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend mit Corbit (Hecht, Kiel-Hassee) unter einem Deckglas versiegelt. Die Bestimmung der unterschiedlichen Zelltypi erfolgte morphologisch unter dem Mikroskop (Modell „DM RB“, Leica, Wetzlar); ihr je weiliger Anteil an der Gesamtzellzahl wurde prozentual angegeben. Mittels einer Kamera (Modell „Evolution LC“, MediaCybernetics, Bethesda, MD USA) wurden Übersichtsbilder erstellt, welche anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS2 nachbearbeitet wurden.

3.18.2. Nachweis von ovalbuminspezifischen Immunglobulinen im Serum mittels ELISA

Nachdem den betäubten Mäusen Blut direkt aus dem Herzen abgenommen wurde, wurde dieses zunächst 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, so dass es gerann. Anschließend wurden die Blutproben 10 min bei $8000 \text{ U}/\text{min}$ bei 4°C in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und nochmals kurz 1 min lang bei $13000 \text{ U}/\text{min}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, um möglichst sauberes debrisfreies Serum aus der Blutprobe zu gewinnen. Das Serum diente als Quelle für Zytokine oder ovalbuminspezifische Antikörper. Um ovalbuminspezifische Antikörper im Serum nachzuweisen, wurde ähnlich dem ELISA für Zytokine vorgegangen (nicht gekennzeichnete Herstellerangaben entsprechen den obigen). Zur Vorbeschichtung wurde ein ovalbuminhaltiger Beschichtungspuffer (Stammlösung 20 mg/ml Ovalbumin VI, Sigma, Steinheim 1:1000 (IgE, IgG_{2A}); bzw. 1:50000 (IgG₁); 4,2 g NaHCO₃ in 500 ml H₂O; pH = 8,3, eingestellt mit Na₂CO₃) verwendet. Anschließend erfolgte ein dreistündiges Blocken mit Diluent auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Die Standards (IgE-, IgG₁- bzw. IgG_{2A}-ELISA; höchster Standard 200 ng/ml IgE, 50 ng/ml IgG₁ bzw. 10 ng/ml IgG_{2A}; Probenverdünnung 1:10, 1:10⁶ bzw. 1:10⁴; von der Philipps-Universität Marburg, Abteilung für Klinische Chemie, AG Renz zur Verfügung gestellt) wurden in einer zehnteiligen Standardreihe in jeweils von Standard zu Standard halbierten Konzentrationen eingesetzt. Sowohl die Standards als auch die Proben wurden zur Steigerung der Messgenauigkeit doppelt aufgetragen. In vier Löcher

wurde, um den durchschnittlichen Leerwert zu bestimmen, lediglich Waschpuffer pipettiert. Der durchschnittliche Leerwert wurde bei der Auswertung von den Rohdaten abgezogen. Standards und Proben wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (α IgE: 1:2000, α IgG₁: 1:200 bzw. α IgG_{2A}: 1:1000; AG Renz siehe oben) erfolgte 2 h lang bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der 2 h wurde Streptavidin-POD-Konjugat in die Löcher pipettiert und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde TMB-Lösung in die Löcher pipettiert und so lange inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung zu sehen war. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde Stop-Lösung hinzugegeben, so dass eine Farbumschlag von blau nach gelb eintrat. Der nun fertige ELISA wurde dann in einem Lesegerät bei 450 nm entwickelt.

Zur Verdünnung von Standards, Proben, biotinylierten Sekundärantikörpern und Streptavidin-POD-Konjugat wurde Waschpuffer eingesetzt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils viermal mit Waschpuffer gewaschen. Das jeweilige Auftragsvolumen betrug 50 μ l.

3.18.3. Aufbereitung von fixiertem Lungengewebe

Um histologische Untersuchungen durchzuführen, wurden die Lungen zunächst paraffiniert, geschnitten und anschließend wieder entparaffiniert und rehydratisiert: Die frisch explantierte und mit Fixierlösung (37% Formaldehyd, Merck; Darmstadt; gelöst 1:10 in PBS) gefüllte Lunge wurde vollständig in die Fixierlösung eingetaucht und so über Nacht bei Raumtemperatur fixiert. Diesem Schritt folgten drei Entwässerungsschritte in 96% igem Ethanol_{aq}, gefolgt von vier Entwässerungsschritten in absolutem Ethanol (Roth, Karlsruhe) und danach wurden die Lungen zweimal in Xylol (Merck, Darmstadt) geklärt. Alle Entwässerungsschritte wurden 1 h lang bei 40°C durchgeführt. Bevor die Lungen in Paraffinblöcke eingebettet wurden, wurden sie zunächst 45 min lang und anschließend dreimal jeweils 1 h lang bei 60°C in Paraffin (Vogel, Gießen), in einem kleinen Plastikschälchen mit Metalldeckel, eingelegt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur gelagert, um eine völlige Aushärtung zu gewährleisten. Von der paraffinierten Lunge wurden am Mikrotom (Modell „SM2000R“ von Leica, Wetzlar) 2 μ m dicke Schnitte hergestellt, die auf SuperFrost-plus-Objektträgern (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen wurden. Um die geschnittenen Lungen wieder zu entparaffinieren, wurde wie folgt vorgegangen: Zuerst wurden die Lungenschnitte zweimal 5 min lang in Xylol entfettet. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Dies geschah durch jeweils zweimaliges zwanzigfach wiederholtes Eintauchen in absolutem Ethanol gefolgt von 96% igem Ethanol_{aq}. Anschließend wurden die Präparate jeweils zwanzigmal in 80% iges und anschließend in

70%iges Ethanol_{aq} getaucht. Um die Präparate schließlich zu rehydratisieren wurden sie zwanzigmal in destilliertes Wasser getaucht. Die nun rehydratisierten Präparate wurden dann histologisch gefärbt.

3.18.4. Färbung von rehydratisierten Lungenschnitten nach der HE-Methode

Mittels der HE-Färbemethode (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) lassen sich zelluläre Strukturen im Gewebeschnitt in einer Übersicht sehr gut darstellen. Dies wird durch die Kombination zweier Farbstoffe namens Hämatoxylin und Eosin erreicht. Hämatoxylin wird während der Färbeprozedur zu Hämalaun aufbereitet („Bläuen“) und färbt basophile Strukturen wie beispielsweise Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum blau. Eosin färbt hingegen alle acidophilen Strukturen wie beispielsweise Zellplasmaproteine rot. Die Durchführung dieser Färbemethode gestaltete sich wie folgt: Die rehydratisierten Gewebeschnitte wurden zunächst 1 min lang mit Hämatoxylinlösung (Hämatoxylin Gill 2 nach Mayer; Shandon/Thermoelectron, Frankfurt a.M.) inkubiert, gefolgt von Bläuen unter fließendem warmen Leitungswasser für 1 min. Anschließend wurden die Präparate in destilliertem Wasser gewaschen und mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe bis zum 96%igem Ethanol_{aq} entwässert. Nach einer 30 sec langen Inkubation in Eosin_{EIOH} (Eosin-Färbelösung; Shandon, Frankfurt a.M.) wurde die aufsteigende Ethanolreihe zu Ende geführt, die Präparate mit Xylol geklärt und anschließend mit einem Deckglas und Corbit versiegelt.

3.18.5. Färbung von rehydratisierten Lungenschnitten nach der PAS-Methode

Die PAS-Färbetechnik (engl. *Periodic acid-Schiff's stain*, bzw. Periodid-Leukofuchsin-Färbung) dient dem Nachweis von Glycogen, Cellulose, neutralen Mucopolysacchariden, Muko- und Glycoproteiden sowie Glycolipiden, welche allesamt rot-violett erscheinen. Im Rahmen von Versuchen mit experimentellem Asthma diente die PAS-Färbetechnik dem Nachweis von Mucopolysacchariden, welche Bestandteil des bronchialen Schleims sind. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden kurz in destilliertem Wasser gespült, 5 min lang mit Perjodidsäure (Sigma, Steinheim) inkubiert und anschließend 3 min lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Diesem Schritt folgten eine 15-minütige Inkubation mit Schiff'schem Reagenz (Merck, Darmstadt) und ein daran anschließender dreiminütiger Spülschritt unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurde nochmals in destilliertem Wasser gespült, und das Präparat wurde dann 2 min lang mit Hämatoxylinlösung (Shandon/Thermoelectron, Frankfurt a.M.) inkubiert. An diesen Schritt schloss sich das dreiminütige Bläuen unter fließendem Leitungswasser an. Das Präpa-

rat wurde dann in einer analog zu der in „Färbung von rehydratisierten Lungenschnitten nach der HE-Methode“ beschriebenen aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol geklärt und mit Corbit und einem Deckglas versiegelt.

3.18.6. Nachweis von Kollagen in rehydratisierten Lungenschnitten

Zum Nachweis von Fibrose wurden die zuvor rehydratisierten Lungenschnitte 110 min lang mit 0,1% Sirius-Rot (Chroma, Stuttgart) in gesättigter wässriger Pikrinsäure (Chroma, Stuttgart) bei einem pH-Wert von 2,0 inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal jeweils 1 min lang mit 0,01 N HCL (Roth GmbH, Karlsruhe) gewaschen und danach 45 sec lang in 70%iges Ethanol_{aq} getaucht. Im darauffolgenden Schritt wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Das Klären der Präparate erfolgte in Xylol. Zum Schluss wurden die Präparate mit Corbit versiegelt.

3.19. Statistik

Sämtliche Rohdaten wurden mit Microsoft Excel grafisch veranschaulicht. Die Statistische Auswertung der Daten einschließlich der Fehlerbalken (sämtliche Fehlerbalken repräsentieren den aus der Streuung der Rohdaten resultierenden Standardfehler) wurde mit dem Statistikprogramm SPSS vorgenommen. Vorhandene Signifikanzen wurden gekennzeichnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

4. Ergebnisse

4.1. Dendritische Zellen migrieren durch das Lungenepithel

Dendritische Zellen (DZ) sind Schlüsselzellen des Immunsystems und fungieren als Mittler zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. In einer früheren Arbeit [Rescigno et al., 2001] konnte gezeigt werden, dass DZ ihre Dendriten durch das Darmepithel hindurch wachsen lassen und auf diese Weise Bakterien durch das Epithel hindurchschleusen können.

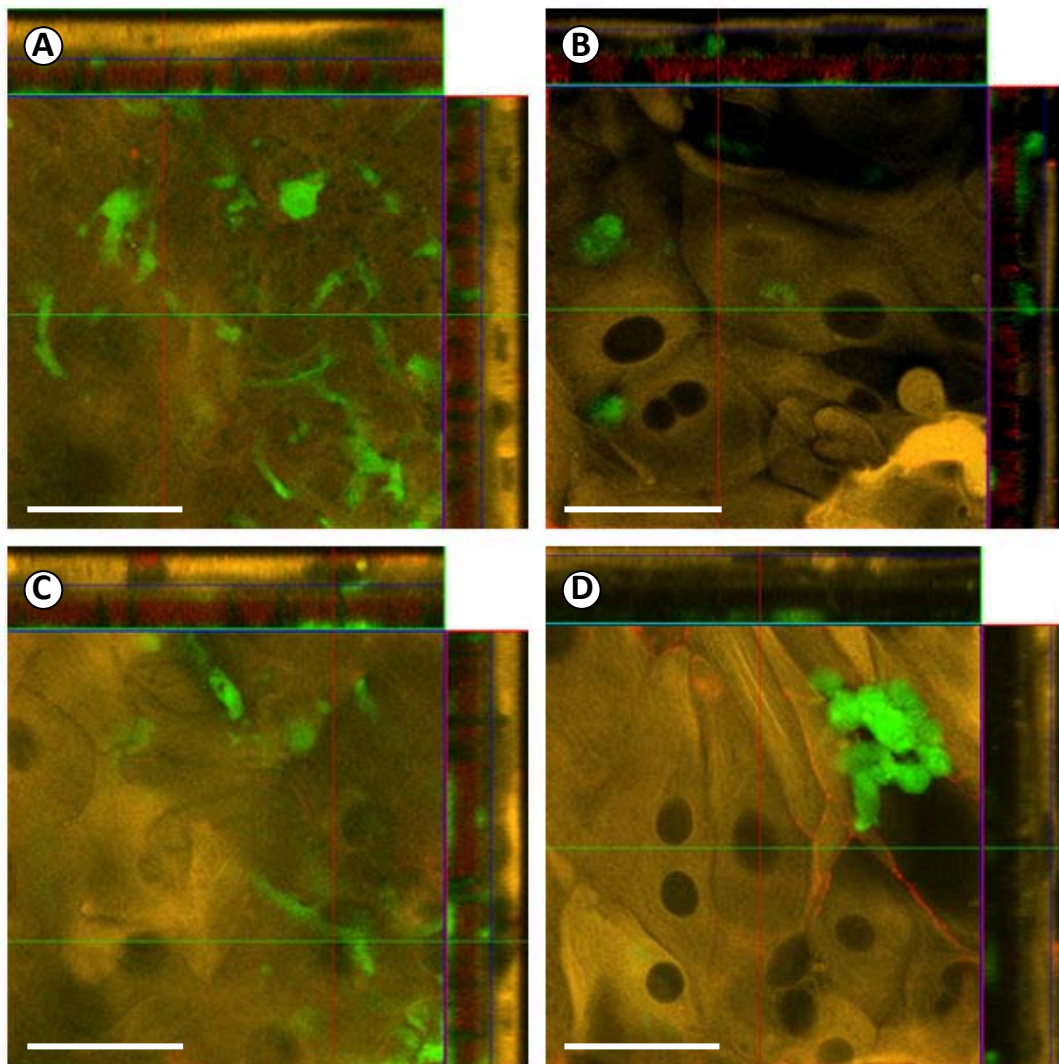


Abb. 11: In-vitro Migration von DZ durch eine Epithelzellschicht.

Mehrere Kokulturen von DZ mit pHBEZ wurden nach dem physikalischen Interaktionsmodell herangezüchtet. DZ wurden mit einem grünen und pHBEZ mit einem gelben Lebendfarbstoff inkubiert; die *zona occludens* wurde durch indirekte Immunfluoreszenz (rot) visualisiert. Pro Zeitpunkt (A: 1 h; B: 2 h; C: 3 h; D: 4 h) wurden jeweils mehrere Kokulturen fixiert und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert. In der Abbildung ist jeweils ein Zeitpunkt exemplarisch dargestellt. Innerhalb von 3 h bahnten sich die DZ ihren Weg durch die pHBEZ-Schicht, und nach 4 h haben die DZ die *zona occludens* der Epithelzellschicht durchdrungen (Maßstabsbalken = 50 μm).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob dies im Atemwegsepithel ebenfalls der Fall ist. Dazu wurden pHBEZ aus Patientenexplantaten in ALI-Kultur herangezüchtet und mit dem Vitalfarbstoff *Cell Tracker Orange* gefärbt (s. Abb. 11). Parallel dazu wurden DZ aus Monozyten, welche aus Buffycoat gewonnen wurden, durch Transdifferenzierung generiert. Anschließend wurden sie mit dem Vitalfarbstoff *Cell Tracker Green* gefärbt. Um Aussagen über das Migrationsverhalten treffen zu können, wurden pro Experiment mehrere Kokulturen angelegt, welche dann zu unterschiedlichen Zeiten fixiert und zu Dauerpräparaten aufbereitet wurden. Die *zona occludens* des Epithels wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen ZO-1 nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass DZ als ganze Zellen und nicht nur mittels ihrer Dendriten durch das Lungenepithel hindurch wandern können. Dies geschah unabhängig davon, ob das Epithel durch Pathogene stimuliert wurde oder nicht.

Um die Morphologie des Migrationsverhaltens DZ durch eine Zellschicht aus 16HBE14- σ -Zellen in ALI-Kultur im elektronenmikroskopischen Bild zu dokumentieren, wurden Dauerpräparate von ALI-Kulturen für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, schoben sich die im Zuge ihrer Migration durch die Epithelzellschicht bewegenden DZ zwischen die Epithelzellen.

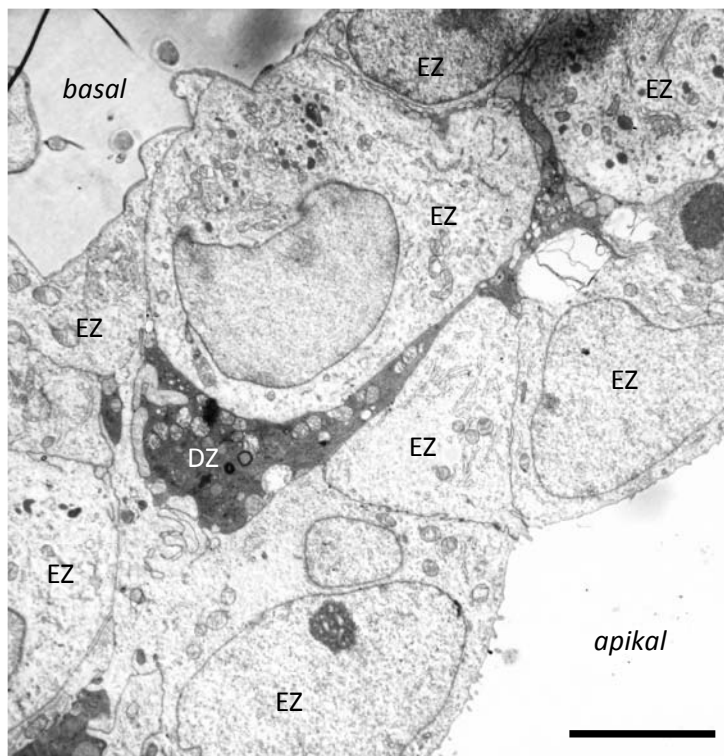


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer DZ während ihrer Migration durch die Epithelzellschicht der ALI-Kultur.

Um DZ im Verlauf ihrer Migration im Elektronenmikroskop darzustellen, wurden ALI-Kulturen von DZ mit Epithelzellen der pulmonalen Epithelzelllinie 16HBE14- σ angelegt. Nach 1-2 h wurden die Zellen fixiert und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Wie in der Abbildung zu sehen ist, integrierten sich die DZ (dunkel kontrastierte Zellen) nahtlos in die Epithelzellschicht. Links oben ist die ALI-Membran zu sehen; rechts unten ist die Oberfläche der Epithelzellschicht zu erkennen (DZ: dendritische Zelle; EZ: Epithelzelle; Maßstab = 0,5 μ m).

4.2. Die Migration Dendritischer Zellen durch das Lungenepithel ist zeitabhängig

Um die beobachtete Migration zu quantifizieren, wurden Kokulturen aus DZ mit der Bronchialepithelzelllinie 16HBE14- σ angelegt und wie oben beschrieben gefärbt. Danach wurde der Zellrasen einer Kokultur zu bestimmten Zeiten durch Inkubation mit Trypsin abgelöst, per FACS analysiert und basierend auf diesen Daten eine Kurve erstellt, die die Migrationskinetik der DZ beschreibt. Es konnte gezeigt werden (s. Abb. 13), dass die Epithelzellschicht nach 5 h ca. 1,4% DZ enthielt.

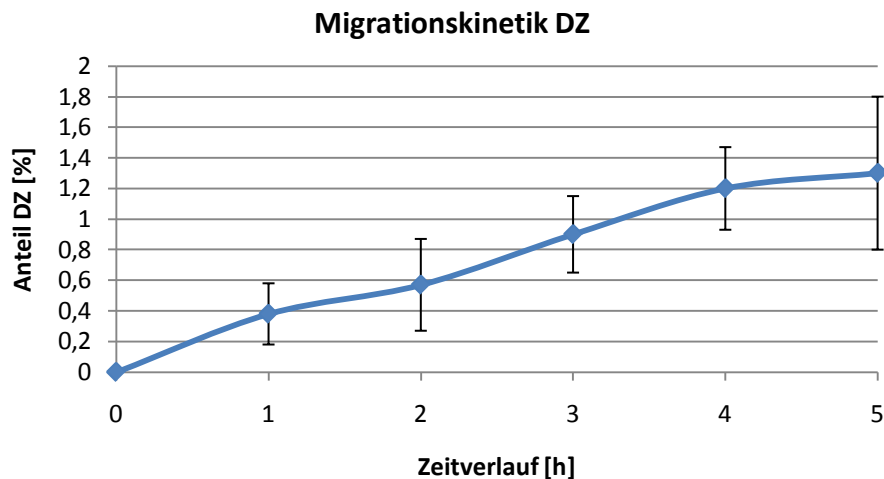


Abb. 13: Migrationskinetik.

Zur quantitativen Ermittlung der Migrationskinetik von DZ wurden mehrere Kokulturen aus DZ mit pHBEZ nach dem physikalischen Interaktionsmodell generiert und angefärbt. Nach Ablauf von 1 h wurde eine Kokultur trypsinisiert, die erhaltenen Zellen fixiert und per FACS der Anteil an grünen DZ an dem Zellrasen bestimmt. Nach 5 h wurde ein Maximalwert am Anteil von grünen DZ am gelben Zellrasen aus pHBEZ erreicht. (N=6)

4.3. Hitzeinaktivierte Bakterien beeinflussen nicht das Migrationsverhalten Dendritischer Zellen

Um zu ermitteln, ob die Präsenz von Bakterien für die Migration von DZ durch die Epithelzellschicht von Bedeutung ist, wurden verschiedene hitzeinaktivierte Bakterienstämme (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*) mit Kokulturen aus der humanen Bronchialepithelzelllinie 16HBE14- σ mit DZ nach dem physikalischen Interaktionsmodell auf apikaler Seite in Kontakt gebracht (s. Abb. 14). Anschließend wurde das Migrationsverhalten der DZ durch die Epithelschicht hindurch verfolgt. Wie in Abb. 14 ersichtlich, hatte die Präsenz hitzeinaktivierter Bakterien keinerlei Einfluss auf die Migration DZ durch die Epithelzellschicht: Bei der nicht stimulierten Kokultur konnten nach 5 h zahlreiche DZ in der Epithelzellschicht lokalisiert werden. Die DZ hatten außerdem die Epithel-

zellschicht komplett durchdrungen. Ebenso verhielt es sich mit den Kokulturen, die mit hitzeinaktivierten *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert wurden.

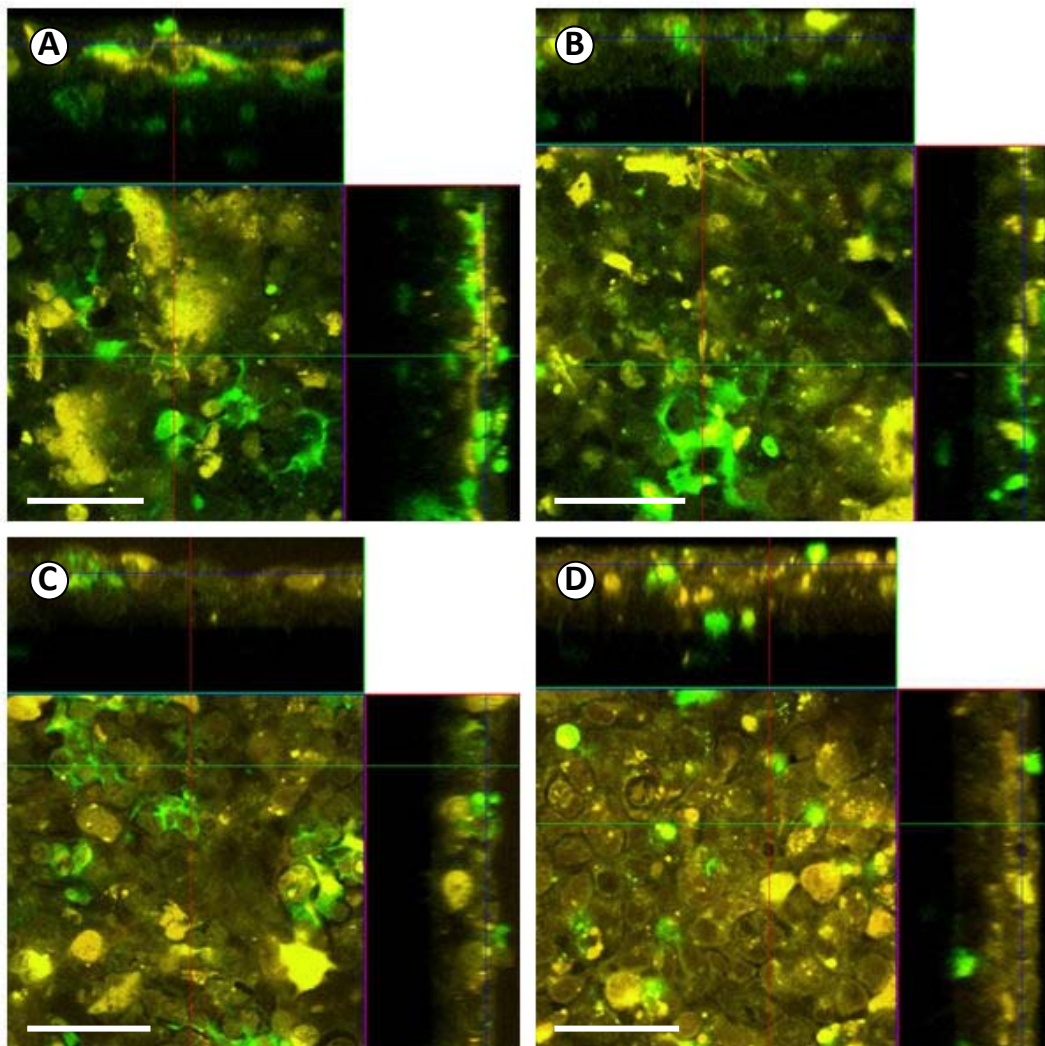


Abb. 14: Migrationsverhalten von DZ nach Stimulation mit Bakterien.

Um zu ermitteln, ob die Präsenz von Bakterien einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von DZ hat, wurde die Kokultur an der den DZ entgegengesetzten Seite mit hitzeinaktivierten Bakterien versehen. Alle drei Bakterienarten zeigten diesbezüglich keinerlei Effekt, verglichen mit der unstimulierten Kokultur (**A** unstimulierte Kokultur, **B** *Escherichia coli*, **C** *Staphylococcus aureus*, **D** *Pseudomonas aeruginosa*). Maßstabsbalken = 50 µm

4.4. Dendritische Zellen stehen in Wechselwirkung mit Atemwegsepithelzellen

Es gibt Hinweise darauf, dass DZ mit den Zellen des Darmepithels in Wechselwirkung stehen [Rimoldi et al., 2005]. Um dies zu untersuchen, wurden pHBEZ mit DZ nach dem löslichen Interaktionsmodell in Kokultur kultiviert. Nach 24 h wurde diese Kokultur apikal mit 0,5 µg/ml LPS (*E. coli*, Serotyp 0111:B4) für weitere 24 h inkubiert, um die Zellen zu akti-

vieren. Am nächsten Tag wurden die DZ aus der Kokultur isoliert und 6 Tage lang mit naiven T-Zellen koinkubiert. Um die naiven T-Zellen währenddessen zu aktivieren, wurden ihre beiden Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 aktiviert. Dazu besaß die Zellkulturschale eine Vorbeschichtung mit einem Antikörper, der gegen das Oberflächenmolekül CD3 gerichtet ist (α CD3). Als zweiter zusätzlicher aktivierender Stimulus enthielt das Medium einen gegen das Oberflächenmolekül CD28 gerichteten Antikörper (α CD28) sowie IL-2. Nach Ablauf der 6 Tage wurde erneut mit einem Mix aus 50 ng/ml PMA, 750 ng/ml Ionomycin und 10 μ g/ml Brefeldin A, welches sich im Medium befand, nachstimuliert. Anschließend wurde die Zytokinzusammensetzung der Kokultur aus DZ mit T-Zellen per FACS analysiert. Wie in Abb. 15 ersichtlich, konnte gezeigt werden, dass isolierte DZ, die zuvor in Kokultur mit pHBEZ kultiviert und mit LPS stimuliert wurden, die Produktion des T_H1 -Zytokins IFN γ durch T-Zellen bewirkten.

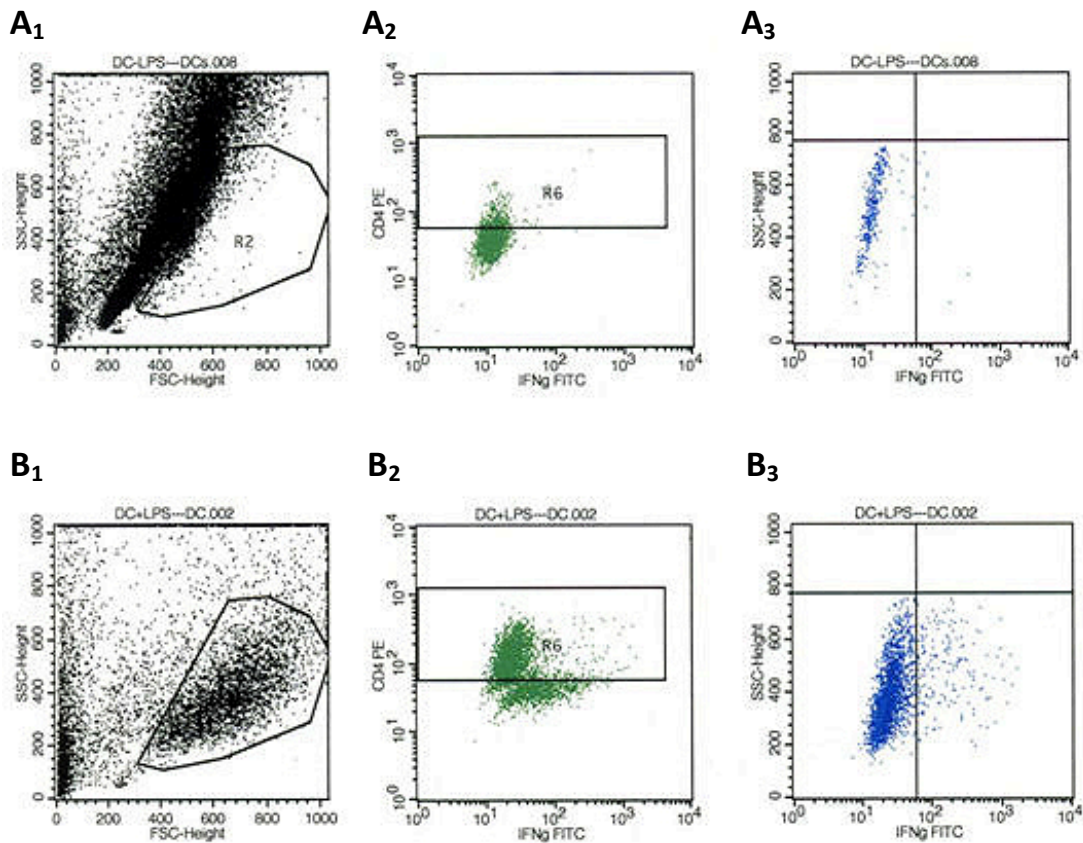


Abb. 15: FACS-Analyse stimulierter CD4⁺-Zellen.

Um den Einfluss von Atemwegsepithelzellen auf DZ *in vitro* zu untersuchen, wurden Kokulturen aus DZ mit pHBEZ gemäß dem löslichen Interaktionsmodell 24 h lang apikal mit LPS stimuliert. Anschließend wurden die DZ entnommen und zusammen mit naiven T-Zellen 6 Tage lang in einem aktivierenden Milieu koinkubiert. Danach wurden die T-Zellen im FACS analysiert. Naive T-Zellen, die mit DZ aus Kokulturen, welche zusätzlich mit LPS stimuliert wurden, koinkubiert wurden (B₃), produzierten eine höhere Menge des T_H1 -Zytokins IFN γ , verglichen mit naiven T-Zellen, die mit DZ aus Kokulturen, die nicht mit LPS stimuliert wurden, koinkubiert wurden (A₃) (A: unstimuliert; B: stimuliert mit 0,5 μ g/ml LPS; 1: SSC-FSC; 2: CD4-IFN γ ; 3: SSC-IFN γ).

4.5. Die Rolle des murinen Cathelizidins CRAMP bei experimenteller COPD

In dieser Arbeit konnte in vivo gezeigt werden, dass DZ mit Epithelzellen in engem Kontakt stehen und durch eine intakte Epithelzellschicht hindurch migrieren können. Des Weiteren gab diese Arbeit Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Atemwegsepithelzellen mit DZ, dessen Resultat eine Prägung naiver T-Zellen in Richtung T_{H1} durch DZ ist. Im nächsten Schritt dieser Arbeit ging es darum, zu zeigen, dass das Atemwegsepithel nicht nur in vitro, sondern auch im Tiermodell immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Das Cathelizidin LL37, bzw. sein murines Analogon CRAMP, wirkt nicht nur antimikrobiell, sondern auch immunmodulatorisch und wird von Atemwegsepithelzellen sezerniert. Um dessen Rolle bei experimenteller COPD im Tiermodell zu untersuchen, wurden Mäuse des Stammes SVJ129, die einen Knockout des murinen Cathelizidins CRAMP haben, mit Zigarettenrauch exponiert. Charakteristisch für eine Exposition mit Zigarettenrauch ist eine erhöhte Anzahl an Makrophagen in der BAL sowie erhöhte Mengen an T_{H1} -Zytokinen. Zur Kontrolle, ob die Reaktionen des Immunsystems auf eine T_{H1} -Antwort beschränkt bleiben, wurde die Konzentration des T_{H2} -Zytokins IL-6 ebenfalls gemessen. Ein weiteres Charakteristikum bei kurzzeitiger Rauchexposition können Lungeninfiltrate von Makrophagen sein, die mehr oder weniger stark ausgeprägt sind. Bei COPD treten zusätzlich dazu Veränderungen der Lunge auf. Diese äußern sich hauptsächlich in der Bildung eines Lungenemphysems und in fibrotischen Veränderungen der Atemwege, die in dieser Arbeit histologisch untersucht wurden.

4.5.1. Cathelizidin wirkt entzündungshemmend bei akuter Rauchexposition

Um zu untersuchen, welche Rolle das murine Cathelizidin CRAMP bei kurzzeitiger Rauchexposition spielt, wurden sowohl CRAMP-knockout-Mäuse ($CRAMP^{-/-}$) als auch WT-Mäuse kurzzeitigem Zigarettenrauch (5 Zigaretten in 20 min) exponiert. Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der Mäuse: Die Lunge wurde zunächst lavagiert und anschließend entnommen. Die Analyse der Zusammensetzung der BAL ergab, dass die BAL der $CRAMP^{-/-}$ -Mäuse nur halb so viele Zellen enthielt wie die der WT-Mäuse (s. Abb. 16).

Die Zellen, die die BAL enthielt, waren ausschließlich Makrophagen. Wie in Abb. 16 ersichtlich, ergab die Analyse der Zytokinzusammensetzung der BAL, dass die BAL der $CRAMP^{-/-}$ -Mäuse ca. das 5-fache an IL-6 wie die BAL der Kontrolltiere enthielt. Des Weiteren waren die in der BAL beider Gruppen gemessenen Zytokinkonzentrationen sehr niedrig, so dass ein weiterer Vergleich zwischen beiden Gruppen unmöglich war. Da die in der BAL gemessenen Zytokinkonzentrationen generell sehr niedrig waren, wurde in den nachfolgen-

den Experimenten dazu übergegangen, die Zytokinkonzentrationen aus Lungenhomogenisaten zu bestimmen. Die Lungen der Tiere wiesen keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Ausbildung von Infiltraten auf (s. Abb. 17).

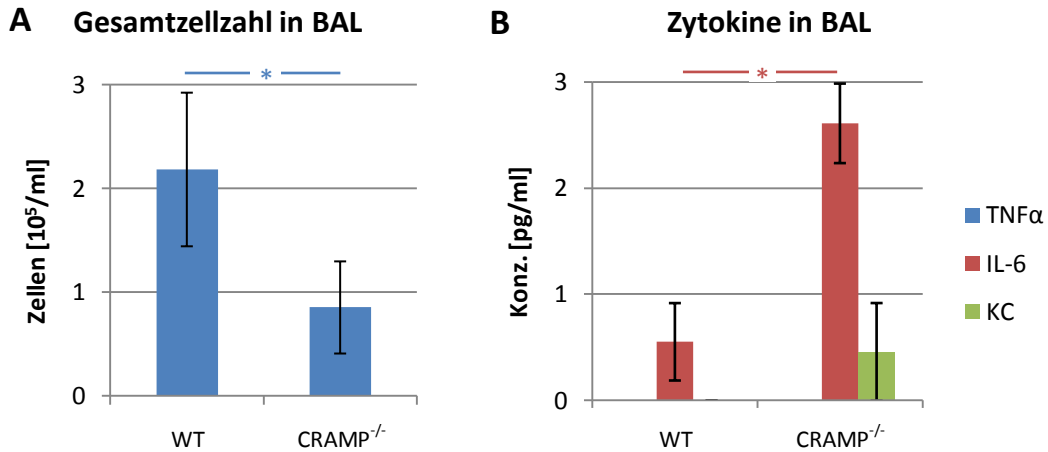


Abb. 16: Zell- und Zytokinzusammensetzung nach akuter Rauchexposition.

Sowohl CRAMP^{-/-} als auch WT-Mäuse wurden 20 min lang mit Zigarettenrauch exponiert. Am nächsten Tag wurde die BAL der Mäuse analysiert. Die CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielten nur halb so viel Zellen. Die BAL der CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielt ca. 5x so viel IL-6 wie die Kontrolltiere. Allerdings konnten bei den Kontrolltieren weder TNF α noch KC nachgewiesen werden, so dass die Konzentrationen dieser Zytokine nicht verglichen werden konnten. Es ist anzumerken, dass die in der BAL gemessenen Werte generell sehr niedrig waren und deshalb in allen folgenden Versuchen die Zytokinkonzentrationen aus Lungenhomogenisaten bestimmt wurden (WT: N=4; CRAMP^{-/-}: N=4).

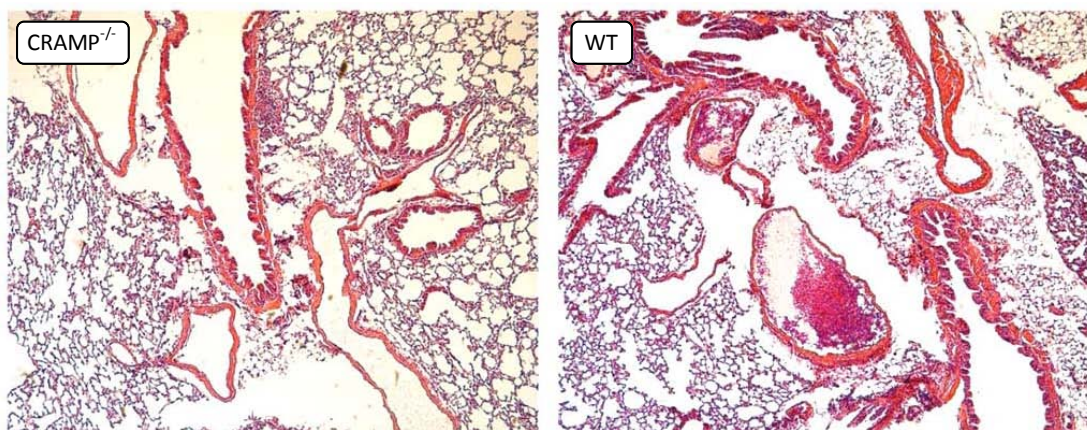


Abb. 17: Histologie nach kurzzeitiger intensiver Zigarettenrauchexposition.

Sowohl CRAMP^{-/-} als auch WT-Mäuse des Stammes SVJ129 wurden 20 min lang mit Zigarettenrauch exponiert. Am nächsten Tag wurden die Mäuse getötet, und die Lungen herauspräpariert. Die herauspräparierten Lungen wurden fixiert und gemäß der HE-Färbemethode gefärbt. Weder die CRAMP^{-/-} als auch die WT-Tiere zeigten kein Vorhandensein sowie keine Unterschiede in der Bildung von Infiltraten auf (HE-Färbung, 50x).

4.5.2. Cathelizidin wirkt entzündungshemmend bei experimentell induzierter COPD

Als nächstes wurde untersucht, inwiefern das antimikrobielle Peptid CRAMP bei experimenteller COPD eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurden die eingangs beschriebenen Mäuse 3 Monate lang täglich mit Zigarettenrauch exponiert. Am nächsten Tag wurde bei den Tieren eine BAL durchgeführt, und ihnen wurden die Lungen entnommen. Die BAL der CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielt ca. ¼ mehr Zellen als die BAL der Mäuse in der Kontrollgruppe. Die BAL aller Mäuse enthielt ausschließlich Makrophagen. Die Zytokinkonzentrationen der Lungenhomogenisate der CRAMP^{-/-}-Mäuse waren ca. um ¼ höher als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 18). Um zu überprüfen, ob und wie stark sich Infiltrate in den Lungen der Mäuse gebildet hatten, wurden die entnommenen Lungen fixiert und gemäß der HE-Färbemethode angefärbt. Wie in Abb. 19 ersichtlich, hatten sich sowohl bei den CRAMP^{-/-}- als auch bei den WT-Mäusen pulmonale Infiltrate gebildet, deren Unterschiede bezüglich ihrer Größe und Intensität hingegen nicht sehr groß waren. Um zu überprüfen, ob und inwiefern sich fibrotische Veränderungen bei den Tieren gebildet hatten, wurden die fixierten Lungen gegen Kollagen angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass die CRAMP^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren stärkere fibrotische Veränderungen in ihren Atemwegen entwickelten. Dies war im histologischen Bild dadurch ersichtlich, dass in der Basalmembran unter dem Atemwegsepithel erhöhte Mengen an Kollagen mittels Immunohistochemie (rote Bereiche innerhalb der Basalmembran, s. Abb. 20) nachgewiesen werden konnten.

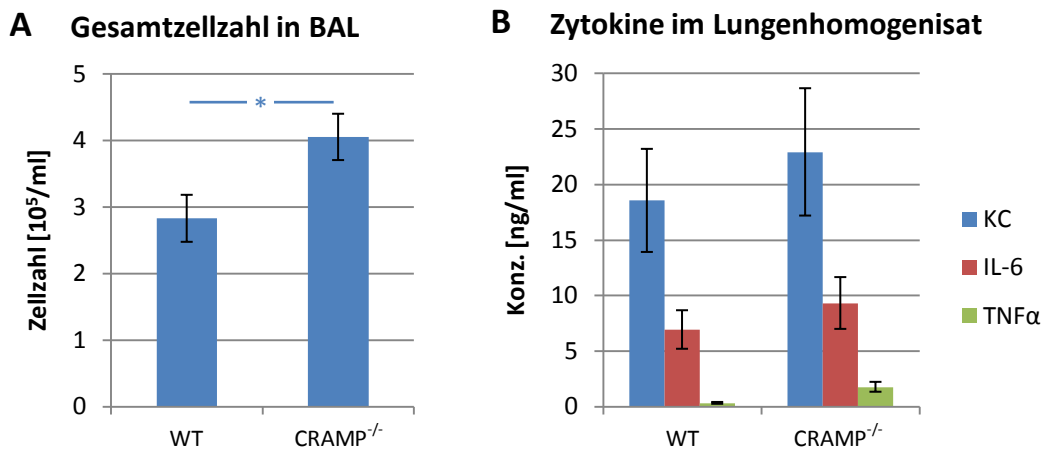


Abb. 18: Zell- und Zytokinzusammensetzung bei experimenteller COPD.

Sowohl CRAMP^{-/-}- als auch WT-Mäuse wurden 3 Monate lang mit Zigarettenrauch exponiert, um eine experimentelle COPD hervorzurufen. Nach Ablauf der drei Monate wurden die BAL der Mäuse bezüglich ihrer Zellzusammensetzung hin untersucht. Die BAL aller untersuchten Mäuse enthielt ausschließlich Makrophagen. Die CRAMP^{-/-}-Mäuse hatten eine um ca. ¼ höhere Zellzahl in ihrer BAL als die Kontrolltiere (A), und ihre Lunge wies ebenfalls eine um ca. ¼ erhöhte Konzentration an Zytokinen auf (B) (WT: N=10; CRAMP^{-/-}: N=12).

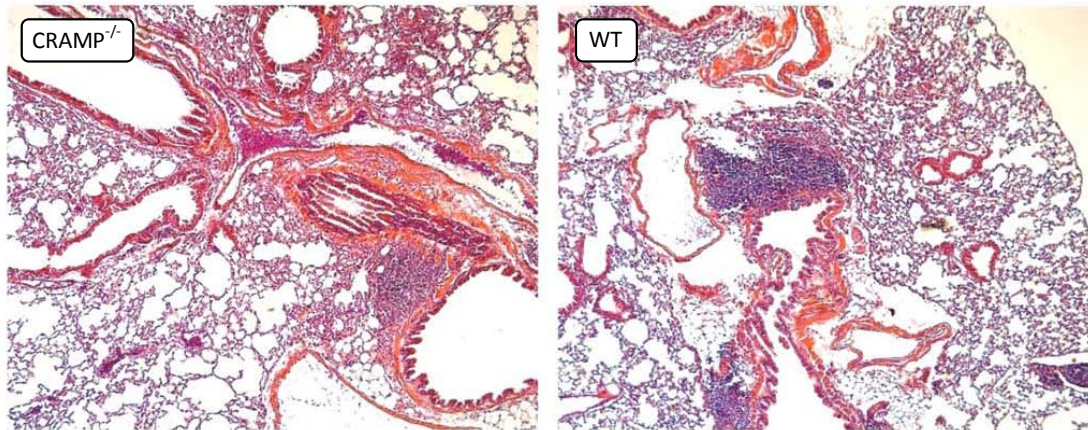


Abb. 19: Histologie nach experimenteller COPD: Infiltratbildung und Emphysem.

Um zu ermitteln, ob es Unterschiede in der Ausbildung von Infiltraten und dem Schweregrad eines Lungenemphysems zwischen CRAMP^{-/-} und WT-Mäusen bei experimenteller COPD gab, wurde den Mäusen die Lungen nach dreimonatiger Zigarettenrauchexposition entnommen, fixiert und nach der HE-Färbemethode gefärbt. Es konnten z.T. erheblich große Entzündungsherde in dem die Atemwege umgebenden Lungenparenchyms festgestellt werden. Sowohl die Lungen der CRAMP^{-/-} als auch die Lungen der WT-Mäusen wiesen emphysematische Bereiche auf (HE-Färbung, 50x).

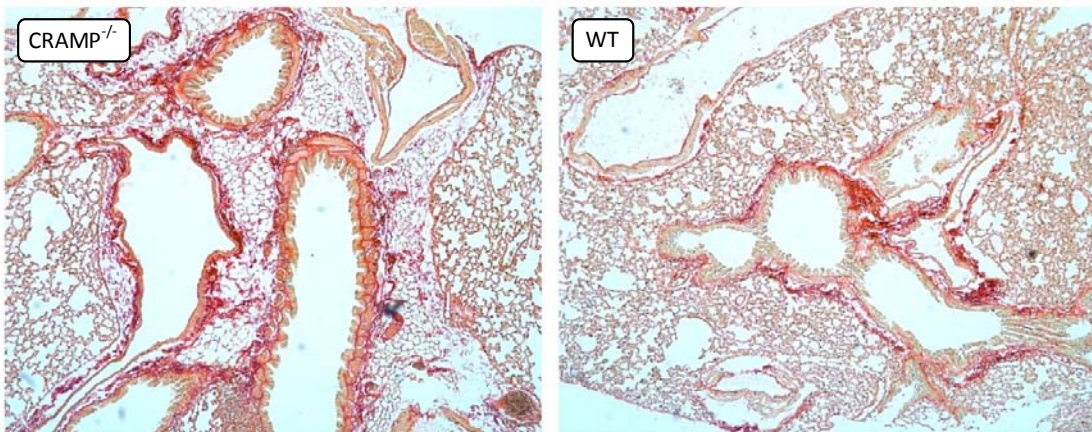


Abb. 20: Histologie nach experimenteller COPD: Fibrotische Veränderungen der Atemwege.

Die Verdickung der Basalmembran ist ein Charakteristikum für COPD. Um die Rolle von CRAMP diesbezüglich herauszufinden, wurden bei CRAMP^{-/-} und WT-Mäusen akutes Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Anschließend wurden die Lungen der Tiere extrahiert. Die Lungen wurden histologisch aufbereitet und mittels eines gegen Kollagen gerichteten Antikörpers wurden kollagenhaltige Strukturen nachgewiesen. Die Kollagenfärbung fixierter Lungenschnitte zeigt deutliche fibrotische Veränderungen bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen verglichen mit den Kontrolltieren (zu sehen an den rötlichen fibrillären Strukturen unter dem Atemwegsepithel; 50x).

4.6. Die Rolle von Cathelizidin bei Asthma

Da CRAMP neben seiner antimikrobiellen auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzt, wurde im Rahmen dieser Arbeit dessen Einfluss auf Asthma hin untersucht. Sowohl bei CRAMP^{-/-} - als auch bei den zur Kontrolle dienenden WT-Mäusen wurde experimentelles Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Dabei kamen zwei Modelle zum Einsatz: Bei dem kurzzeitigen (Akut-) Modell wurden die Tiere nach der Sensibilisierungsphase lediglich dreimal in Folge einem ovalbuminhaltigen Aerosol ausgesetzt; bei dem Langzeitmodell hingegen fand die Exposition der Tiere mit einem ovalbuminhaltigen Aerosol für 3 Monate lang dreimal pro Woche statt. Anschließend erfolgte die Präparation der Tiere und die Analyse der Daten.

4.6.1. Cathelizidin spielt keine Rolle bei induziertem akuten experimentellen Asthma

Um herauszufinden, ob das murine Cathelizidin CRAMP bei akutem Asthma eine Rolle spielt, wurde bei CRAMP^{-/-} und WT-Mäusen akutes Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Anschließend erfolgten die Lavagierung und die anschließende Entnahme ihrer Lungen. Außerdem wurde ihnen Blut am schlagenden Herzen entnommen. Die Analyse der BAL der Tiere ergab keine nennenswerten Unterschiede sowohl in der Gesamtzellzahl als auch im Differenzialzellbild (s. Abb. 21). Tendenziell gesehen enthielten allerdings die CRAMP^{-/-}-Mäuse geringfügig weniger Zellen in ihrer BAL als die WT-Mäuse, und im Differenzialzellbild waren bei den CRAMP^{-/-}-Tieren absolut keine Lymphozyten enthalten. Bei den WT-Mäusen hingegen wurde ein sehr geringer Lymphozytenanteil in der BAL nachgewiesen. Wie in Abb. 22 ersichtlich, enthielten die Lungenhomogenisate sowohl der Kontrolltiere als auch der CRAMP^{-/-}-Mäuse tendenziell etwas größere Mengen der T_{H2}-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, und der Spiegel an ovalbumin-spezifischem IgE im Serum war bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell leicht erniedrigt. Das histologische Bild (s. Abb. 23) zeigt vergleichbare Ausprägungsgrade an Schleimbildung und eine vergleichbare Präsenz von Entzündungsherden bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren.

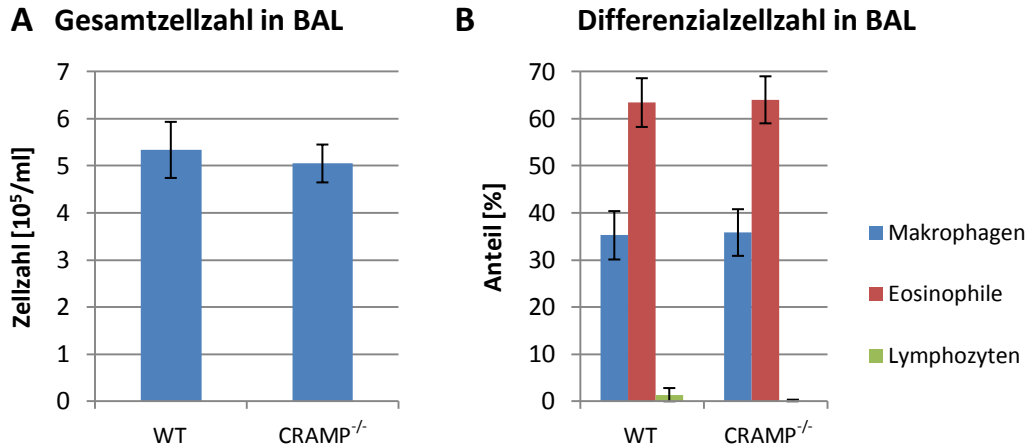


Abb. 21: Vergleich der BAL von CRAMP^{-/-}- und WT-Mäusen nach akutem experimentellen Asthma. Um zu untersuchen, ob das AMP CRAMP bei akutem Asthma eine Rolle spielt, wurden sowohl bei CRAMP^{-/-}- als auch WT-Mäusen experimentelles Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Anschließend wurden die Tiere betäubt, und es wurde eine Lavage der Lunge vorgenommen. Sowohl hinsichtlich der Gesamtzellzahl (A) als auch hinsichtlich des Differenzialzellbildes (B) ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: Beide Tiergruppen enthielten ca. 0,5 Mio. Zellen/ml, mit einem Anteil Eosinophiler von ca. 63% (WT: N=10; CRAMP^{-/-}: N=10).

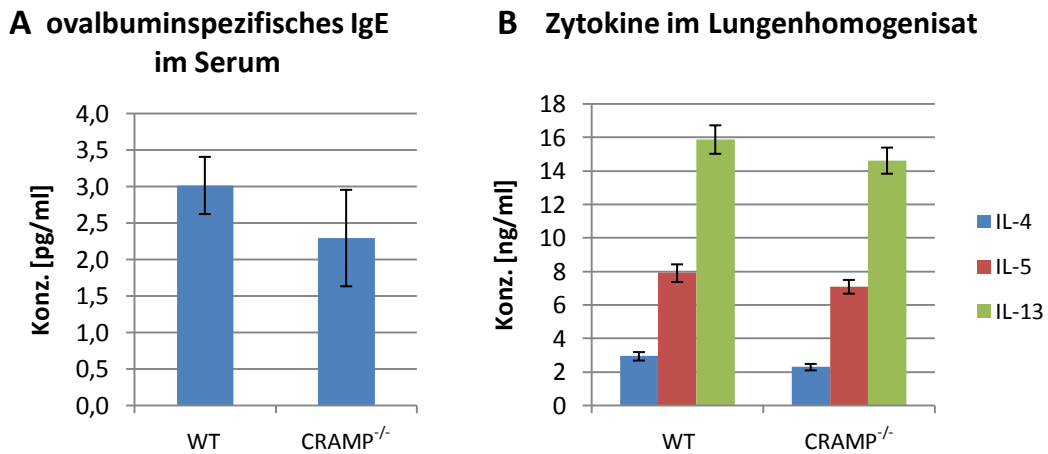


Abb. 22: T_{H2}-Zytokine im Lungenhomogenisat und ovalbuminspezifisches IgE bei akutem Asthma. Die T_{H2}-Zytokine IL4, IL-5 und IL-13 spielen eine wichtige Rolle bei Asthma. Um zu ermitteln, in wieweit das murine Cathelizidin CRAMP deren Ausschüttung moduliert, wurden Mäuse dem OVA-Modell zur Induktion von Asthma unterzogen. Anschließend wurde die Lunge entnommen. Die jeweils linken Lungenflügel wurden homogenisiert, und ihre Zytokinkonzentrationen wurden mittels ELISA analysiert. Die Lungenhomogenisate beider Vergleichsgruppen (CRAMP^{-/-}, bzw. WT) zeigten bei den CRAMP^{-/-}-Tieren geringfügig erniedrigte Konzentrationen an T_{H2}-Zytokinen auf (B). Dasselbe gilt für den Serumgehalt an ovalbuminspezifischem IgE beider Gruppen (A). Tendenziell waren die Zytokinkonzentrationen als auch die Konzentrationen an ovalbuminspezifischem IgE bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen geringer als bei den Kontrollmäusen (WT) (WT: N=10; CRAMP^{-/-}: N=10); allerdings war dies nicht signifikant.

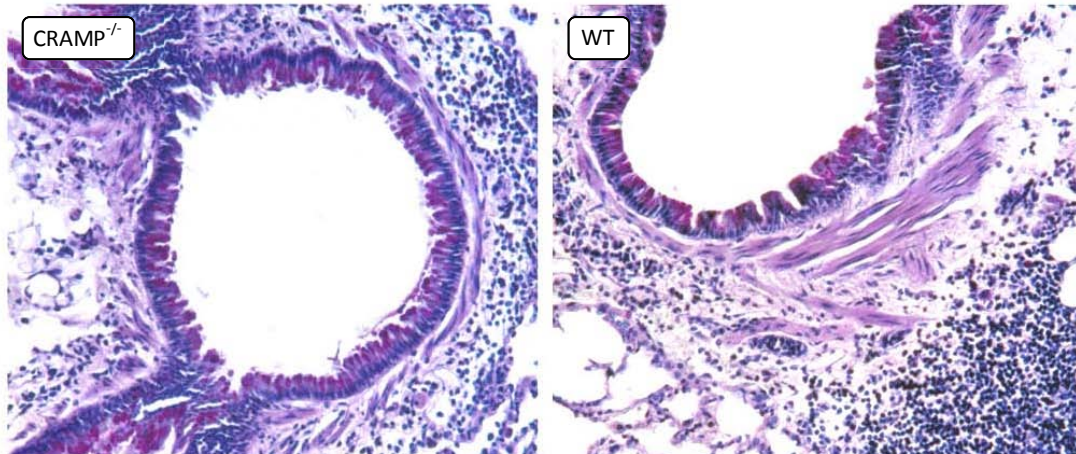


Abb. 23: Histologie nach experimentell induziertem akutem Asthma.

Um den Einfluss des murinen Cathelizidins CRAMP bei Asthma bezüglich Mukusbildung und der Präsenz von Lungeninfiltraten zu untersuchen, wurden sowohl CRAMP^{-/-} als auch WT-Mäuse dem experimentellen Akutasthmodell unterzogen. Ihre entnommenen Lungen wurden fixiert und gemäß der PAS-Färbemethode histologisch aufbereitet. Beide Gruppen wiesen eine asthmatypische Verschleimung der Atemwege (rote Bereiche innerhalb der Innenseite des Lumens der Atemwege) mit einer damit einhergehenden Infiltration von Immunzellen ins Lungengewebe auf. Unterschiede zwischen CRAMP^{-/-} und WT-Mäusen waren nicht feststellbar (PAS-Färbung, 200x).

4.6.2. Cathelizidin wirkt ambivalent bei induziertem chronischen experimentellen Asthma

Da das murine Cathelizidin CRAMP immunmodulatorische Wirkung hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden werden, inwieweit es einen Einfluss auf chronisches Asthma hat. Zu diesem Zweck wurde bei CRAMP^{-/-}- und WT-Mäusen des Stammes SVJ129 experimentelles chronisches Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Anschließend wurde den Tieren in b etäubtem Zustand Blut aus dem schlagenden Herzen abgenommen, die Lunge lavagiert und anschließend herauspräpariert. Die Analyse der BAL der Tiere ergab einen leichten Unterschied in der Gesamtzellzahl in der BAL: CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielten ca. 0,2 Mio. Zellen/ml mehr als die vergleichbare Kontrollgruppe (s. Abb. 24). Das Differenzialzellbild beider Tiergruppen enthielt Makrophagen und Eosinophile, wobei sich das Verhältnis von Makrophagen zu Eosinophilen bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen umkehrte: Der Anteil an Eosinophilen war bei CRAMP^{-/-}-Mäusen um ca. $\frac{1}{4}$ höher und der Anteil an Makrophagen um ca. $\frac{1}{3}$ niedriger als bei WT-Mäusen. Die Lungenhomogenisate der CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielten deutlich weniger T_{H2}-Zytokine als die Lungenhomogenisate der Kontrollmäuse (s. Abb. 25). Im histologischen Bild konnte, wie in Abb. 26 ersichtlich, eine vermehrte Mukusbildung bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden, was an den rot-violetten Farbbereichen auf der Atemwegsepitheloberfläche zu sehen war.

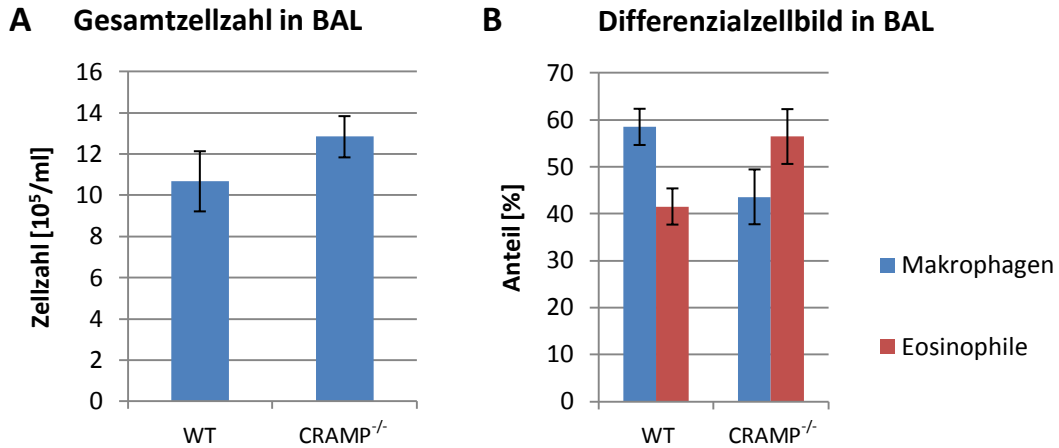


Abb. 24: BAL nach chronischem experimentellen Asthma.

Um zu sehen, wie sich ein Knockout von CRAMP bei chronischem experimentellen Asthma auswirkt, wurden CRAMP^{-/-}- und Kontrollmäuse (WT) zunächst gegen Ovalbumin sensibilisiert und anschließend drei Monate lang mit Ovalbuminaerosol exponiert. Danach wurden die Tiere getötet, und ihre Lungen wurden lavagiert. Die BAL von CRAMP^{-/-}-Mäusen enthielt bei chronisch experimentellem Asthma eine leicht erhöhte Gesamtzellkonzentration verglichen mit WT-Mäusen (A). Der Anteil an Eosinophilen an der Gesamtzellzahl war bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen erhöht. Bei dem Anteil an Makrophagen verhielt es sich entgegengesetzt: Hier war der Anteil bei den WT-Mäusen gegenüber den CRAMP^{-/-}-Mäusen erhöht (B) (WT: N=6; CRAMP^{-/-}: N=6).

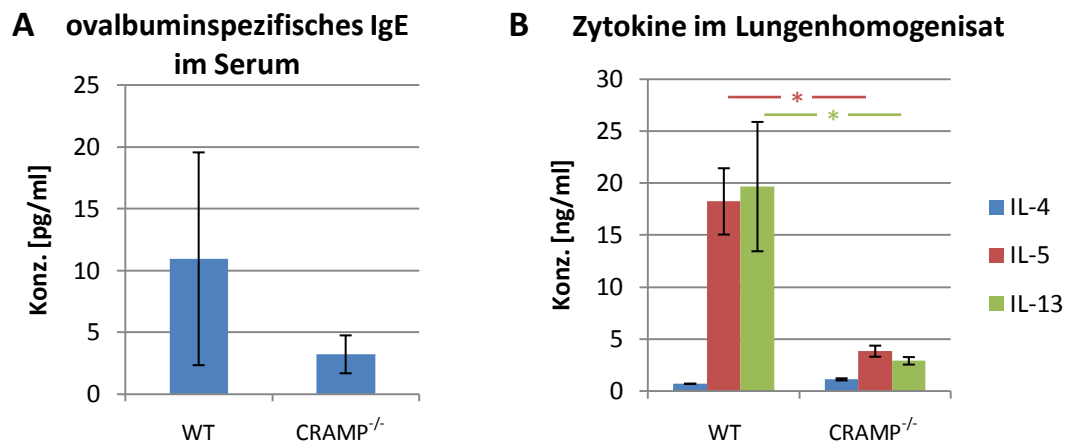


Abb. 25: Zytokine im Lungenhomogenisat und ovalbuminspezifisches Serum-IgE.

Um den Einfluss des murinen Cathelidins CRAMP auf die Produktion von T_{H2}-Zytokinen bei chronischem Asthma zu untersuchen, wurde bei CRAMP^{-/-}- und WT-Mäusen experimentelles Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Anschließend wurden die Mäuse für 3 Monate lang täglich einem ovalbuminhaltigen Aerosol ausgesetzt. Danach wurden die Mäuse betäubt und am schlagenden Herzen Blut abgenommen. Ihre Lungen wurden entfernt, und der linke Lungenflügel wurde homogenisiert. Die Konzentrationen der im Homogenisat befindlichen Zytokine wurden mittels ELISA bestimmt. CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielten in ihren Lungenhomogenisaten weniger T_{H2}-Zytokine als die Kontrolltiere (B). Das Blutserum der CRAMP^{-/-}-Mäuse enthielt nur ungefähr halb so viel ovalbuminspezifisches IgE wie die Blutseren der Kontrolltiere (A) (WT: N=6; CRAMP^{-/-}: N=6).

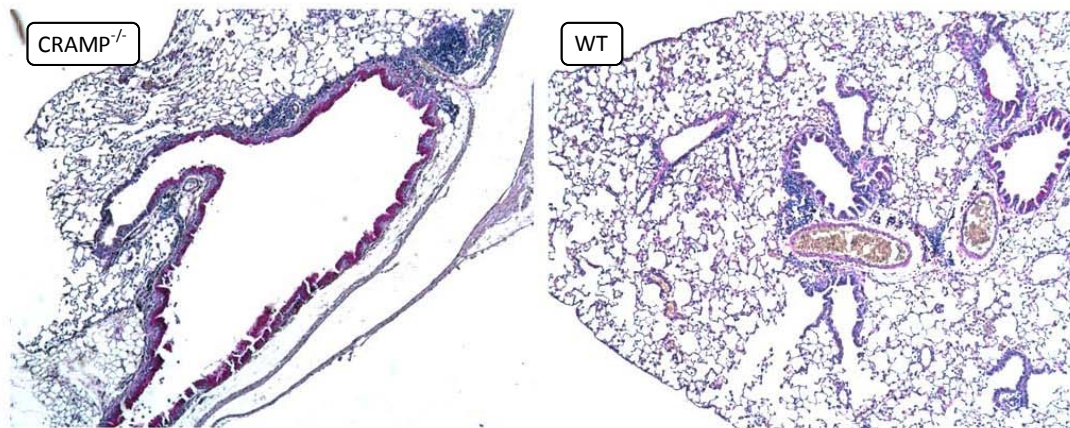


Abb. 26: Histologie (50x, PAS-Färbung) nach experimentell induziertem chronischen Asthma.

Um zu sehen, inwiefern die in Knockout von C RAMP sich auf die mit Asthma einhergehende vermehrte Mukusproduktion in den Atemwegen auswirkt, wurde bei CRAMP^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen experimentelles chronisches Asthma nach dem OVA-Modell induziert. Anschließend wurden die Lungen der Tiere entnommen, fixiert und mittels der PAS-Färbemethode histologisch aufbereitet. Das histologische Bild zeigte bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen eine vermehrte Mukusbildung (rosa-violett dargestellt) in den Atemwegen verglichen mit den Kontrolltieren. Außerdem konnten vereinzelt größere Mengen an Infiltraten von Zellen in das Lungenparenchym beobachtet werden.

4.7. Die Rolle von NF- κ B bei COPD

In vitro konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem und das Atemwegsepithel in Wechselwirkung zueinander stehen. Außerdem konnte in vivo im Tiermodell gezeigt werden, dass das murine C athelizidin C RAMP bei experimentell induzierter COPD, welches eine immunlastige Erkrankung darstellt, eine Rolle spielt. Bei COPD sind myeloide Immunzellen von großer Bedeutung, denn es findet eine starke Infiltration von Makrophagen in die Lunge statt. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Immunsystems darstellt, war es Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, inwiefern der Aktivierungsstatus myeloischen NF- κ B eine Rolle bei experimentell induzierter COPD spielt. Um herauszufinden, welchen Einfluss NF- κ B bei COPD hat, wurden Mäuse, deren p65-Gen in myeloischen Zellen und somit auch in Makrophagen außer Funktion ist (p65^{lox/lox} LysM::Cre-Mäuse), bezüglich dieser Fragestellung hin untersucht. Mit einer erhöhten Schadstoffpartikelbelastung einher geht eine Erhöhung der Anzahl an Makrophagen in der BAL sowie eine Erhöhung der Menge an T_{H1}-Zytokinen. Um zu kontrollieren, inwieweit auch T_{H2}-Zytokine davon betroffen sind, wurde das T_{H2}-Zytokin IL-6 ebenfalls gemessen. Ebenfalls charakteristisch für eine erhöhte Schadstoffbelastung, wie sie bei Zigarettenrauchexposition auftritt, ist die Bildung lokaler Entzündungsherde in der Lunge. Bei COPD treten zusätzlich dazu irreversible Modellierungen des Lungengewebes auf. Dazu zählen die Bildung eines Lungenemphysems und fibrotische Veränderungen der Atemwege.

4.7.1. Myeloisches NF- κ B spielt keine Rolle bei kurzzeitiger Rauchexposition

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Präsenz von funktionalem myeloischem NF- κ B bei kurzzeitiger Rauchexposition auf die pathophysiologischen Reaktionen der Tiere auswirkt, wurden sowohl Mäuse des Genotyps $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre als auch die korrespondierenden Kontrollmäuse des Genotyps LysM::Cre 20 min lang dem Zigarettenrauch von insgesamt 5 Zigaretten ausgesetzt. Am nächsten Tag wurde bei ihnen eine BAL durchgeführt, und es wurden ihnen die Lungen explantiert. In der BAL aller untersuchten Mäuse befanden sich ausschließlich Makrophagen. Die Mäuse, deren $p65$ -Gen in myeloischen Zellen deletiert war, wiesen eine sehr geringfügige Tendenz zu einer erhöhten Gesamtzellzahl in ihrer BAL auf (0,44 Mio. Zellen/ml vs. 0,41 Mio. Zellen/ml (Kontrollen); s. Abb. 27). Die Lungenhomogenisate aller Tiere wiesen außerdem einen nur sehr gering erhöhten TNF- α -Wert auf (s. Abb. 27), so dass hinsichtlich der untersuchten Parameter die Präsenz von $p65$ in myeloischen Zellen höchstens einen geringfügigen tendenziellen Einfluss bezüglich der Auswirkungen einer kurzzeitigen intensiven Zigarettenrauchexposition hat.

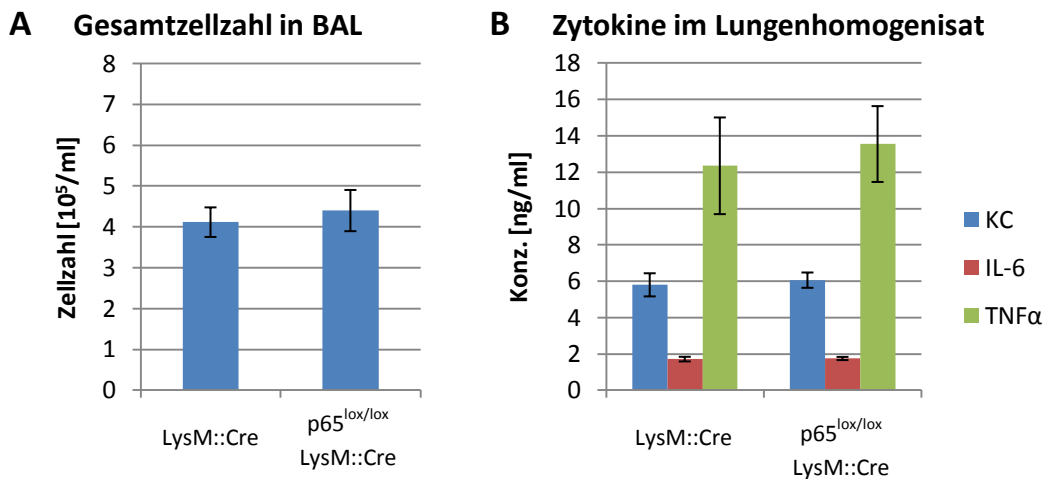


Abb. 27: Zellzahlen in BAL und Zytokinspiegel im Lungenhomogenisat nach akuter Rauchexposition.

Sowohl $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre- als auch LysM::Cre-Mäuse (Kontrolltiere) wurden 20 min lang mit Zigarettenrauch exponiert. Am nächsten Tag wurden die BAL der Mäuse und deren Lungenhomogenisate analysiert. Die $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre-Mäuse enthielten tendenziell geringfügig mehr Zellen in ihrer BAL ($p65^{lox/lox}$ LysM::Cre: 0,44 Mio. Zellen/ml; LysM::Cre: 0,41 Mio. Zellen/ml) und einen geringfügig höheren TNF- α -Wert in ihren Lungenhomogenisaten als die Kontrolltiere (LysM::Cre: N=8; $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre: N=10).

4.7.2. myeloisches NF- κ B wirkt entzündungshemmend bei experimentell induzierter COPD

Um die Rolle der Präsenz von p65 in myeloischen Zellen bei experimenteller COPD zu untersuchen, wurden Mäuse des Genotyps $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre und Mäuse, bei denen lediglich die CRE-Rekombinase aktiv war (Kontrollmäuse des Genotyps LysM::Cre), 3 Monate lang täglich mit Zigarettenrauch exponiert. Nach Abschluss dieser 3 Monate wurden sie lavagiert, und ihre Lungen wurden explantiert. Die BAL der $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre-Mäuse enthielt ca. doppelt so viel Zellen wie die der Kontrolltiere (LysM::Cre). Die Konzentrationen der T_{H1} -Zytokine KC, und $TNF\alpha$ im Lungenhomogenisat waren bei den $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre-Mäusen gegenüber den Kontrolltieren um den Faktor 3,8 (KC), bzw. 84 ($TNF\alpha$) erhöht, und die Konzentration des T_{H2} -Zytokins IL-6 war um den Faktor 2,5 erhöht (s. Abb. 28). Die Konzentration des murinen T_{H1} -Zytokins KC im Serum war ebenfalls um den Faktor 2 gegenüber den Kontrolltieren erhöht (s. Abb. 29). Bezüglich der Präsenz von Entzündungsherden in der Lunge und emphysematischen Veränderungen des Lungenparenchyms ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (s. Abb. 30).

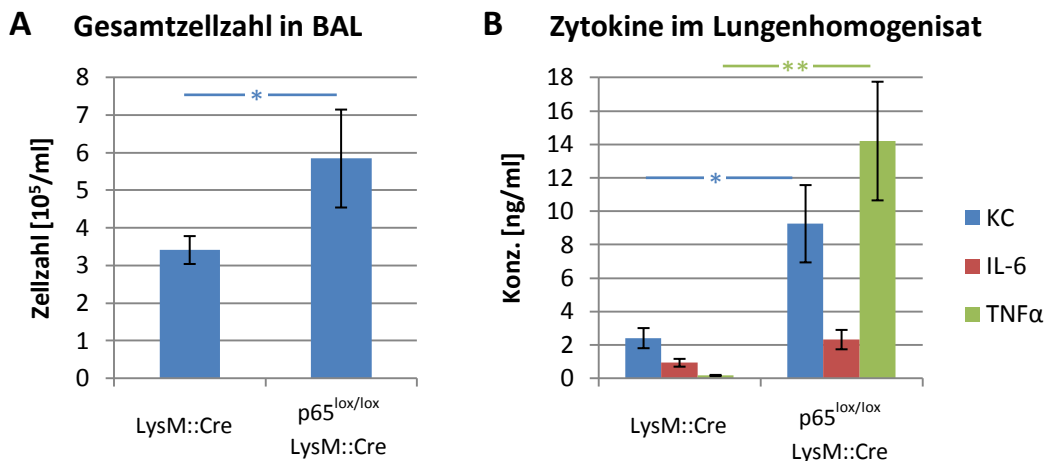


Abb. 28: Gesamtzellzahlen der BAL und Zytokinkonzentrationen im Lungenhomogenisat.

Um den Einfluss von myeloischem NF- κ B bezüglich einer experimentell durch eine dreimonatige Zigarettenrauchexposition ausgelösten COPD zu untersuchen, wurden Mäuse des Genotyps $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre und Kontrollmäuse des Genotyps LysM::Cre drei Monate lang mit Zigarettenrauch exponiert, um eine experimentelle COPD hervorzurufen. Anschließend wurde ihre Lunge lavagiert, und der rechte Lungenflügel wurde homogenisiert, um Zytokinkonzentrationen zu bestimmen. Die BAL der Tiere, deren myeloisches p65 unfunktional war ($p65^{lox/lox}$ LysM::Cre), enthielt ca. doppelt so viele Zellen (Makrophagen) wie die BAL der Kontrolltiere (LysM::Cre). Die Analyse der Lungenhomogenisate mittels ELISA ergab, dass ein myeloischer Knockout von p65 ($p65^{lox/lox}$ LysM::Cre) zu einem sehr starken Anstieg sowohl von T_{H1} -Zytokinen (KC und $TNF\alpha$) als auch von IL-6 führt (LysM::Cre: N=9; $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre: N=6).

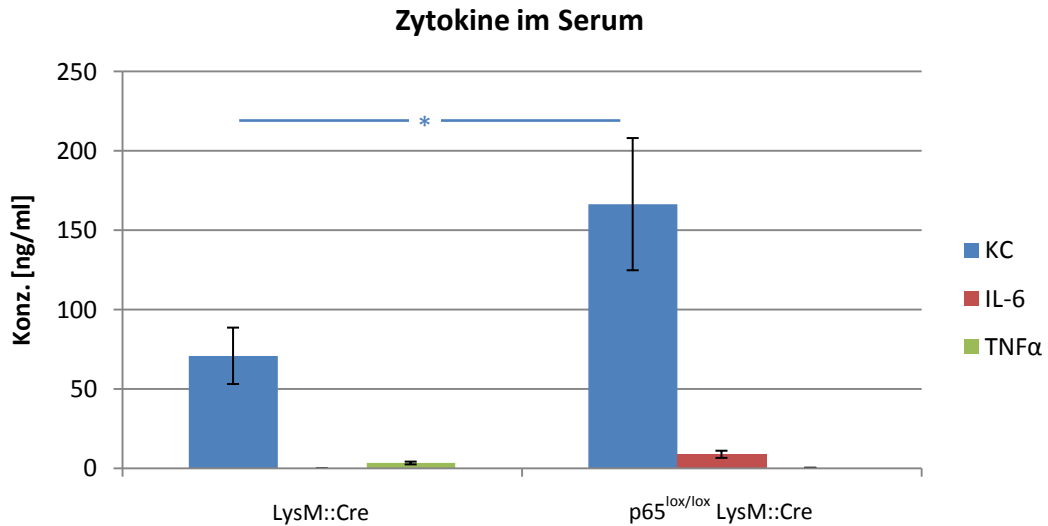


Abb. 29: Zytokine im Serum bei experimenteller COPD.

Um zu ermitteln, inwieweit ein Knockout von myeloischem NF- κ B sich auf systemische Zytokinkonzentrationen im Serum auswirkt, wurde sowohl die Versuchsmäusen ($p65^{lox/lox}$ LysM::Cre) als auch die Kontrollmäusen (LysM::Cre) nach Abschluss der dreimonatigen Rauchexposition Blut am schlagenden Herzen entnommen. Das darin enthaltene Serum wurde aufbereitet und mittels ELISA auf seine Zytokinkonzentrationen hin untersucht. Das T_{H2} -Zytokin KC war deutlich messbar und bei einem Knockout von myeloischem p65 ($p65^{lox/lox}$ LysM::Cre) um das 2,3-fache gegenüber den Kontrolltieren (LysM::Cre) erhöht (LysM::Cre: N=9; $p65^{lox/lox}$ LysM::Cre: N=6).

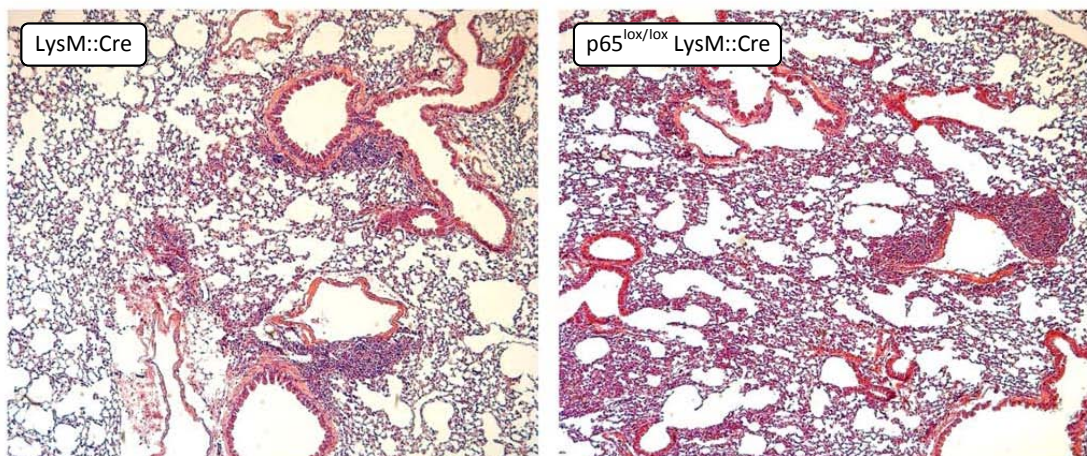


Abb. 30: Histologie der Lunge bei experimenteller COPD.

Um die Auswirkungen eines myeloischen Knockouts von p65 zu ergründen, wurde sowohl bei Mäusen, deren myeloisches p65 deletiert war ($p65^{lox/lox}$ LysM::Cre) als auch bei den korrespondierenden Kontrolltieren (LysM::Cre) mittels dreimonatiger Exposition mit Zigarettenrauch eine chronische COPD induziert. Anschließend wurden die Lungen der Tiere entnommen, fixiert und gemäß der HE-Färbemethode aufbereitet. Das histologische Bild zeigt annähernd gleich viele Entzündungsherde in den Lungen beider Gruppen. Dies betrifft ebenso den Schweregrad eines Lungenemphysems (HE-Färbung, 50x).

4.8. Die ambivalente Rolle von myeloischem NF- κ B bei experimentellem akuten Asthma

Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B an zahlreichen Immunreaktionen beteiligt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit dessen Einfluss auf Asthma untersucht. Zu diesem Zweck wurde bei Mäusen akutes experimentelles Asthma nach dem OVA-Modell induziert. In diesem Versuch kamen sowohl Mäuse zum Einsatz, deren NF- κ B-Signalkaskade durch Deletion des I κ B α -Proteins in myeloischen Zellen dauerhaft aktiv (I κ B α ^{lox/lox} LysM::Cre) war, als auch Mäuse, bei denen in myeloischen Zellen das für p65 kodierende Gen deletiert war und somit kein p65 enthaltendes NF- κ B gebildet werden konnte (p65^{lox/lox} LysM::Cre). Als Kontrollmäuse dienten Mäuse, die zwar die CRE-Rekombinase exprimierten, aber deren NF- κ B-Gene nicht durch lox-Sequenzen flankiert waren (LysM::Cre), so dass sie ein intaktes NF- κ B-Signaltransduktionssystem besaßen. Somit war es möglich, den unmittelbaren Einfluss zwischen aktiviertem NF- κ B und deaktiviertem NF- κ B in myeloischen Zellen auf Asthma zu ergründen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Deletion von I κ B α und somit eine dauerhafte Aktivierung von NF- κ B in diesem Zusammenhang zu einem verminderten Einstrom von Immunzellen in die Lunge gegenüber den Kontrolltieren (LysM::Cre) führten. War p65 hingegen ausgeknockt, so dass kein funktionales p65 enthaltendes NF- κ B in myeloischen Zellen gebildet werden konnte, so war der Einstrom von Immunzellen in die Lunge ca. doppelt so groß wie bei den Kontrolltieren (s. Abb. 31). Das Differenzialzellbild der BAL (s. Abb. 32) zeigt, dass der Anteil an Eosinophilen bei dauerhaft aktiviertem myeloischen NF- κ B im Vergleich zu den Kontrolltieren geringer war als bei einem p65-Knockout. Dieses Verhältnis kehrte sich beim Anteil an Neutrophilen genau um: Hier war deren Anteil bei dauerhaft aktiviertem myeloischen NF- κ B, bezogen auf die Kontrolltiere, höher als bei einer Deletion von myeloischem p65. Wie Abbildung 33 zu entnehmen ist, hatte der Aktivierungsstatus von myeloischem NF- κ B keinerlei Einfluss auf die T_{H2}-Zytokinspiegelkonzentrationen im Lungenhomogenisat: Die Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 waren bei allen Gruppen nahezu identisch. Die Serumkonzentrationen an ovalbuminspezifischem IgE waren bei dauerhaft aktiviertem myeloischen NF- κ B im Vergleich zu den Kontrolltieren höher als bei deletiertem myeloischen p65 (s. Abb. 34). Wie Abbildung 35 zu entnehmen ist, waren im histologischen Bild der Lunge (PAS-Färbung) bei den Tieren, deren myeloisches NF- κ B dauerhaft aktiv war, deutliche und große Entzündungsherde im Lungenparenchym zu erkennen, die bei den anderen Versuchsgruppen nicht vorhanden waren. Der Grad an Mukusbildung war bei allen Vergleichsgruppen identisch.

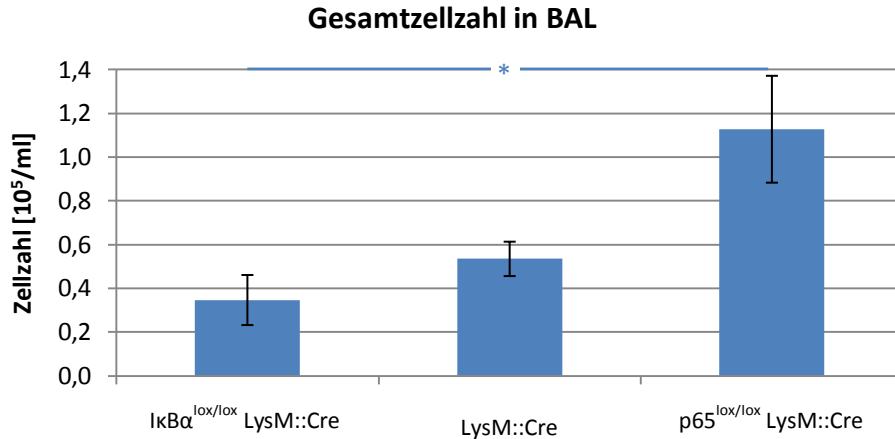


Abb. 31: Gesamtzellzahlen in der BAL bei unterschiedlichem NF- κ B-Aktivierungsstatus.

Nach Induktion experimentellen akuten Asthmas wurden die Mäuse präpariert und deren BAL auf ihren Gesamtzellgehalt hin untersucht. Diejenigen Mäuse ($\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre), deren myeloisches NF- κ B ständig aktiviert war, hatten bedeutend weniger Zellen in ihrer BAL als diejenigen Mäuse, deren myeloisches p65 deletiert war ($\text{p65}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre). Die Gesamtzellkonzentrationen der Kontrolltiere (LysM::Cre) lagen dazwischen ($\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=11; LysM::Cre: N=24; $\text{p65}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=6).

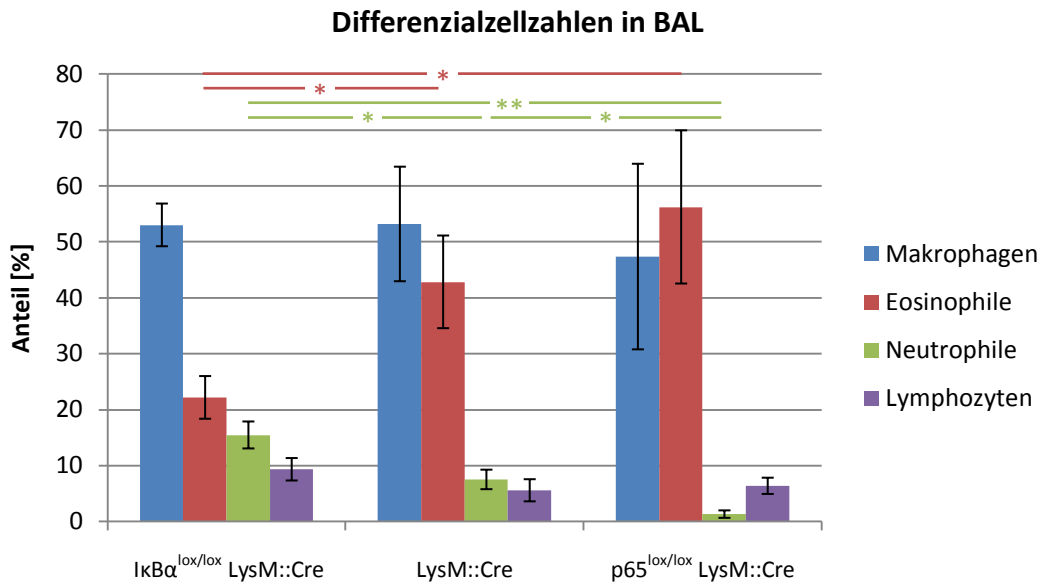


Abb. 32: Differenzialzellbild in der BAL bei unterschiedlichem NF- κ B-Aktivierungsstatus.

Nach Induktion experimentellem akuten Asthma wurden die Mäuse präpariert und deren BAL auf ihre Zellzusammensetzung hin untersucht. Diejenigen Mäuse ($\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre), deren myeloisches NF- κ B ständig aktiviert war, hatten bedeutend weniger Eosinophile in ihrer BAL als diejenigen Mäuse, deren myeloisches p65 deletiert war ($\text{p65}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre). Bei den Neutrophilen verhielt es sich gerade entgegengesetzt: Diejenigen Mäuse ($\text{IkBa}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre), deren myeloisches NF- κ B ständig aktiviert war, hatten bedeutend mehr Neutrophile in ihrer BAL als diejenigen Mäuse, deren myeloisches p65 deletiert war ($\text{p65}^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre). Die Anteile an Eosinophilen und Neutrophilen der Kontrolltiere (LysM::Cre) lagen genau dazwischen. Die Anteile an

Makrophagen und Lymphozyten waren in allen Gruppen nach induktion experimentellem akuten Asthma untersucht ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N =11; LysM::Cre: N=24; $\text{p}65^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=6).

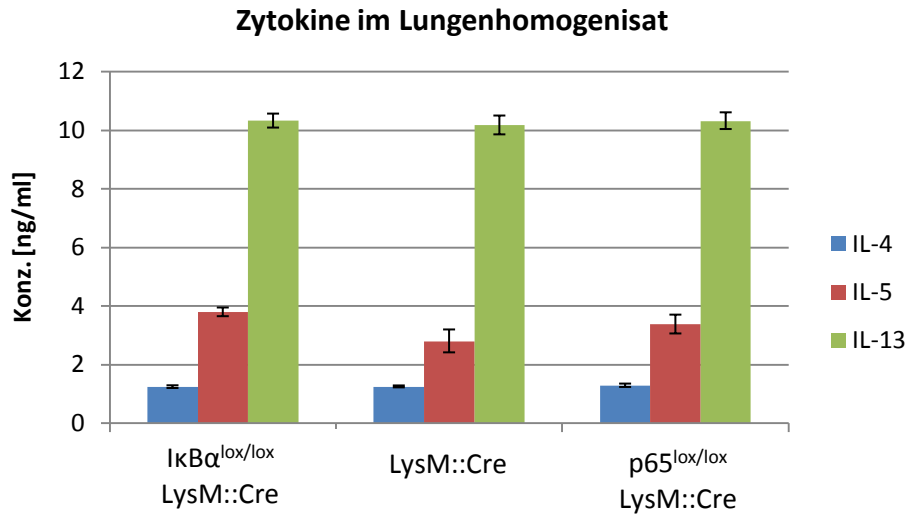


Abb. 33: Zytokinzusammensetzung im Lungenhomogenisat bei unterschiedlichem NF- κ B-Aktivierungsstatus. Nach Induktion experimentellem akuten Asthma wurden die Mäuse präpariert und deren BAL auf ihre Zytokinkonzentrationen hin untersucht. Es konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede in den Konzentrationen der $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 ermittelt werden ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=11; LysM::Cre: N=24; $\text{p}65^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=6).

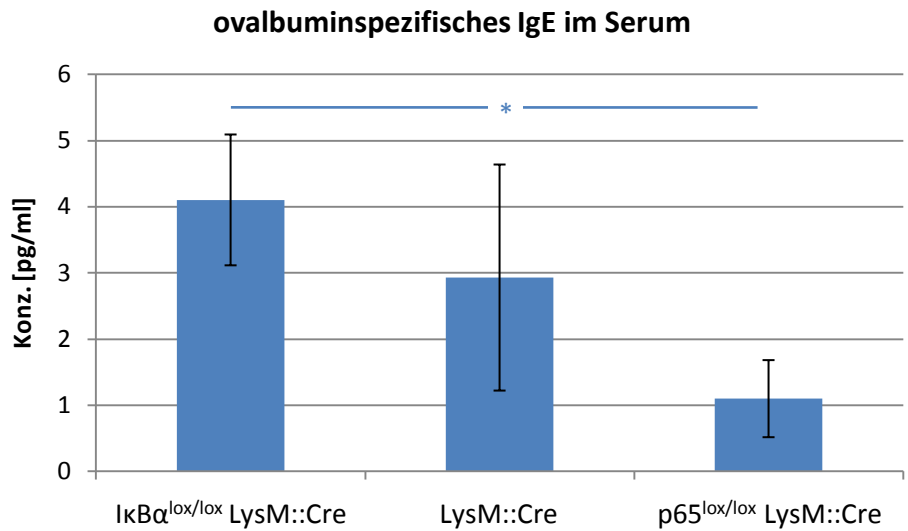


Abb. 34: Serumkonzentrationen von ovalbuminspezifischem IgE bei unterschiedlichem NF- κ B-Aktivierungsstatus. Nach Induktion experimentellem akuten Asthma wurde den Mäusen Blut abgenommen und auf ihre Konzentration an ovalbuminspezifischem IgE hin untersucht. Diejenigen Mäuse ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre), deren myeloisches NF- κ B ständig aktiviert war, hatten höhere Konzentrationen an ovalbuminspezifischem IgE im Serum als diejenigen Mäuse, deren myeloisches $\text{p}65$ deletiert war ($\text{p}65^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre). Bei den Kontrolltieren (LysM::Cre) lag die Konzentration an ovalbuminspezifischem IgE zwischen den beiden anderen Gruppen ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=11; LysM::Cre: N=24; $\text{p}65^{\text{lox/lox}}$ LysM::Cre: N=6).

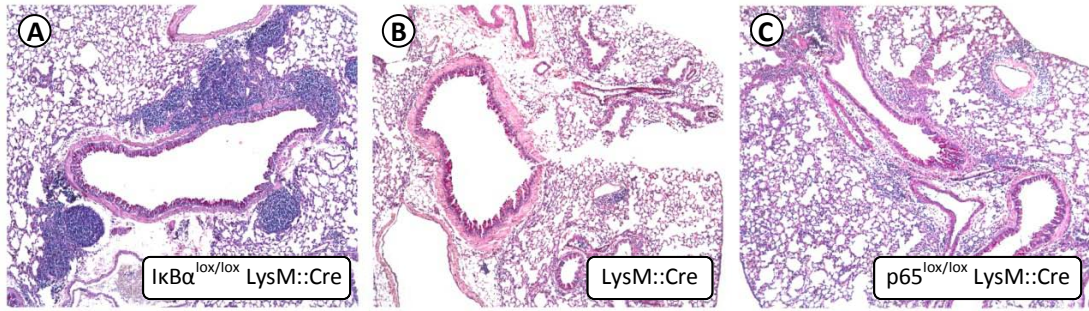


Abb. 35: Histologisches Bild nach akutem experimentellen Asthma.

Nach Induktion e xperimentellen Asthmas wurden die Lungen der Mäuse entnommen und mittels der PAS-Methode gefärbt. Die Mukusbildung in den Atemwegen ist bei allen Gruppen nahezu identisch. Allerdings waren bei denjenigen Mäusen, deren myeloischer NF- κ B-Signalweg ständig aktiv war (A), eine Vielzahl von Entzündungsherden im Lungenparenchym zu erkennen. Dies war weder bei den Kontrolltieren (B) noch bei den Mäusen, deren myeloisches p65 ausgeknockt war (C), festzustellen (PAS-Färbung, 50x).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde in vivo gezeigt, dass DZ mit Epithelzellen in engem Kontakt stehen und durch eine intakte Epithelzellschicht hindurch migrieren. Des Weiteren gab diese Arbeit Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Atemwegsepithelzellen mit DZ, dessen Resultat eine Prägung naiver T-Zellen in Richtung T_{H1} durch DZ ist. Des Weiteren sollten in dieser Arbeit in vi vo im Mausmodell die Wechselwirkungen des Atemwegsepithels mit dem Immunsystem aufgezeigt werden. Atemwegsepithelzellen sezernieren das Cathelizidin LL-37, welches immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. In dieser Arbeit wurde im Mausmodell untersucht, inwiefern sich ein Knockout des murinen Cathelizidins CRAMP auf experimentell induzierte COPD und auf experimentell induziertes Asthma auswirkt. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Rolle im Immunsystem spielt, war es ebenfalls Ziel dieser Arbeit, dessen Rolle bei experimentell induzierter COPD und experimentell induziertem Asthma in Mausmodell herauszufinden.

5.1 Atemwegsepithelzellen und Dendritische Zellen stehen in Wechselwirkung zueinander

DZ sind wichtige Vermittler zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Im Zuge ihrer Funktion als professionelle antigenpräsentierende Zellen phagozytieren sie eine Vielzahl von Partikeln und präsentieren diese anschließend auf ihrer Oberfläche in Form von MHC-Komplexen. Reife DZ wandern in die Lymphknoten ein, wo sie ihre an MHC-Komplexe gebundenen Partikelfragmente in den Keimzentren präsentieren, um so beispielsweise die Reifung naiver T-Zellen voranzutreiben. Dies ist der Grund, warum DZ eine sehr wichtige Funktion bei der Sensibilisierung gegenüber potentiellen Allergenen innehaben. In einer anderen Arbeit [Rescigno et al., 2001] konnte gezeigt werden, dass DZ im Darm feine Fortsätze (Dendriten) durch die Epithelzellschicht treiben können und somit fähig zur Partikelaufnahme durch das Darmepithel hindurch sind. Somit konnte erklärt werden, wie durch eine an sich dichte Zellschicht Partikel hindurchgeschleust werden und dem Immunsystem zugänglich gemacht werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DZ nicht nur fähig sind, einzelne Dendriten durch einen konfluenten Zellrasen aus Bronchialepithelzellen zu treiben, sondern dass DZ als Ganzes durch eine konfluente Bronchialepithelzellschicht hindurchwandern können. Epithelzellen stehen mit DZ in Wechselwirkung und können immunmodulatorische Funktionen wahrnehmen. Dies ist äußerst wichtig, wenn beispielsweise Bakterien die Epithelien des Körpers befallen. Um die Auswirkungen eines Bakterienbefalls auf das Migrationsverhalten DZ durch eine konfluente Bronchialepithelzellschicht zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Kulturen aus pHBEZ und DZ mit hitzeinaktivierten Bakterien inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass das globale Mig-

rationsverhalten DZ unabhängig von einer Bakterienexposition der Epithelzellschicht ist; allerdings ist anzumerken, dass es eventuell Unterschiede in der Kinetik der Migration geben könnte. Die Präsenz von hitzeinaktivierten Bakterien auf der Epithelzellschicht der Kokultur aktiviert mit einer Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit mustererkennende Rezeptoren (z.B. Toll-Like-Rezeptoren), die zur Expression von Entzündungsmediatoren und Chemokinen führen. Dies könnte zu einer vermehrten Rekrutierung von DZ auf die apikale Seite der Epithelzellen und somit zu einer verstärkten Migration der DZ durch die Epithelzellschicht hindurch führen. In einer weiteren Arbeit [Rimoldi et al., 2005] wurde eine immunmodulatorische Wechselwirkung von Epithelzellen des Darms auf DZ dokumentiert. Diese bestand darin, dass Epithelzellen des Darms DZ da hingehend beeinflussen, dass sie die Entwicklung von T_{H2} -Zellen aus naiven T-Zellen fördern. In dieser Arbeit war dem nicht so: Hier konnte gezeigt werden, dass DZ, die aus Kokulturen mit pHBEZ, welche mit LPS stimuliert wurden, die Entwicklung von T_{H1} -Zellen aus naiven T-Zellen fördern. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich bronchiale Epithelzellen von den Epithelzellen des Darms bezüglich ihres Potentials zur Beeinflussung DZ unterscheiden. Dies wäre aus biologischer Sicht gesehen nicht verwunderlich, da sich das Milieu des Darms von demjenigen der Lunge unterscheidet: Im Darm befinden sich diverse kommensale und symbiotische Bakterien, die an der Verdauung beteiligt sind; die Lunge hingegen ist – sofern gesund – bakterienfrei. Eine T_{H1} -Antwort im Darm auszulösen wäre demzufolge in den allermeisten Fällen mehr schädlich als nützlich, in der Lunge hingegen ist dies durchaus sinnvoll, da dort ein Befall mit Bakterien sehr rasch eine schädliche Infektion nach sich ziehen kann. Es ist allerdings anzumerken, dass LPS nur eines von vielen pathogenassoziierten molekularen Mustern gramnegativer Bakterien ist und somit eine mögliche Immunantwort gegen grampositive Bakterien in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde.

5.2. Die immunmodulatorische Wirkung des murinen Cathelizidins CRAMP im Mausmodell

Cathelizidine besitzen neben antimikrobiellen Wirkungen auch immunmodulatorische Eigenschaften. Da sowohl bei COPD als auch bei Asthma das Immunsystem eine wesentliche Rolle spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des antimikrobiellen Peptids des humanen L L37/hCAP18 homologen murinen antimikrobiellen Peptids CRAMP im Mausmodell diesbezüglich untersucht werden. NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für das Immunsystem. Seine Aktivität hat großen Einfluss auf eine Vielzahl von Immunreaktionen. Da sowohl COPD als auch Asthma eine gewichtige immunologische Komponente haben, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von NF- κ B auf diese beiden Erkrankungen untersucht werden.

COPD ist eine primär T_{H1} -lastige Erkrankung, weshalb die T_{H1} -Zytokine KC (entspricht dem menschlichen IL-8) und $TNF\alpha$ als Parameter herangezogen wurden. Das als T_{H2} -Zytokin beschriebene IL-6 diente ursprünglich der Kontrolle, inwieweit die Immunantwort bei COPD auf eine T_{H1} -Antwort beschränkt blieb. Deshalb war es zunächst verwunderlich, dass neben den klassischen T_{H1} -Zytokinen KC und $IFN\gamma$ auch das T_{H2} -Zytokin IL-6 in diesem Zusammenhang hochreguliert wurde. Da IL-6 also sowohl an den unmittelbaren Reaktionen des Immunsystems als auch an den mittelbaren Reaktionen des Immunsystems im Zuge einer Entzündung beteiligt ist, ist ein Einfluss dieses Zytokins bei COPD respektive dessen vermehrte Ausschüttung bei Zigarettenrauchexposition durchaus eine logische Konsequenz.

Im Gegensatz zu COPD ist Asthma eine hauptsächlich T_{H2} -lastige Erkrankung. Um den Schweregrad der asthmatischen Reaktion zu messen, wurden deswegen die Konzentrationen der T_{H2} -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in der Lunge herangezogen. Ein weiteres wesentliches Merkmal einer allergischen Reaktion sind allergenspezifische Antikörper der E-Klasse (IgE). Da im Rahmen dieser Arbeit experimentelles Asthma mittels des OVA-Modells induziert wurde, wurde demzufolge ovalbuminspezifisches IgE im Serum gemessen. Die Einwanderung Eosinophiler im Zuge einer asthmatischen Reaktion ist ein weiteres asthmatypisches Merkmal. Deswegen wurde – im Gegensatz zu COPD, wo nur Makrophagen nachgewiesen werden konnten – die bronchoalveoläre Lavage bei experimentellem Asthma auch qualitativ auf ihren Anteil an verschiedenen Zelltypen, insbesondere an Eosinophilen, untersucht. Da Asthma – genau wie COPD – eine entzündliche Erkrankung darstellt, wurde als Parameter für den Schweregrad der Erkrankung im Mausmodell die Bildung von Zellinfiltraten ins Lungparenchym herangezogen. Bei länger andauerndem Asthma treten zu den Veränderungen der Lunge in Form von Fibrosebildung und vermehrter Mukusbildung auf, so dass diese Merkmale als Untersuchungsparameter für den Schweregrad von chronischem experimentellen Asthma ebenfalls berücksichtigt wurden.

5.2.1. Das murine Cathelizidin CRAMP wirkt entzündungshemmend bei Rauchexposition

Bezüglich COPD konnte in dieser Arbeit im Mausmodell gezeigt werden, dass ein Knockout von CRAMP bei kurzzeitiger intensiver Rauchexposition zu einer Halbierung der Gesamtzellzahl in der BAL sowie zu einem starken Anstieg der Zytokinkonzentrationen in der BAL führte. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da die Halbierung der Gesamtzellzahl in der BAL eine entzündungshemmende, der starke Anstieg der Zytokinkonzentrationen (IL-6 und KC) in der BAL jedoch eine entzündungsfördernde Wirkung von CRAMP vermuten lässt und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass CRAMP nicht nur antimikrobielle sondern auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die

Tatsache sein, dass CRAMP zellrekrutierend wirkt [De et al., 2000]. Demzufolge könnten Mäuse, die kein CRAMP bilden können, im Vergleich zu WT-Mäusen weniger Zellen zu den potentiellen Entzündungsherden mittels CRAMP-Ausschüttung leiten. Dies könnte dazu führen, dass das umliegende Gewebe vermehrt Entzündungsmediatoren freisetzt, um das fehlende CRAMP zu kompensieren. Mögliche Kandidaten für eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 könnten beispielsweise Monozyten sein; für die vermehrte Produktion von KC könnten ebenfalls Monozyten sowie Neutrophile in Betracht gezogen werden. Da IL-6 die Bildung von Akute-Phase-Proteinen anregt [Zhang et al., 2004] sowie stimulierend auf Lymphozyten wirkt [Zhang et al., 2004], könnte dies ein Versuch des Immunsystems sein, die Entzündungsreaktion auf einem CRAMP-unabhängigen Weg voranzutreiben. Diese Vermutung könnte dadurch unterstützt werden, dass KC, das murine Homolog von IL-8, die Chemotaxis fördert [Taraseviciene-Stewart & Voelker, 2008] und aktivierend auf Neutrophile wirkt [Taraseviciene-Stewart & Voelker, 2008].

Im Gegensatz zur kurzzeitigen Rauchexposition, bei der eine Halbierung, gepaart mit einem starken Anstieg der Zytokinkonzentrationen, zu verzeichnen war, konnte bei experimenteller COPD (dreimonatige Rauchexposition) lediglich ein moderater Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL sowie ein geringfügiger Anstieg der Zytokinkonzentrationen im Lungenhomogenisat nachgewiesen werden. Dies erscheint zunächst – verglichen mit den Resultaten bei kurzzeitiger Rauchexposition – widersprüchlich, da zum einen die Gesamtzellzahl in der BAL leicht erhöht und nicht halbiert war. Zum anderen waren die gemessenen Zytokinkonzentrationen bei den CRAMP^{-/-}-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen nicht drastisch, sondern nur moderat erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die anfänglich stark erhöhten Zytokinmengen in der Lunge das fehlende CRAMP, über einen längeren Zeitraum hinweg gesehen, zu kompensieren vermochten, so dass im Laufe der Zeit immer weniger Zytokine zur Kompensation des CRAMP-Mangels bei CRAMP^{-/-}-Mäusen nötig waren. Möglicherweise könnte die anfänglich sehr starke Zytokinausschüttung zu einer Überkompensation des CRAMP-Mangels geführt haben, da die Gesamtzellzahl in der BAL der CRAMP^{-/-}-Mäuse nach dreimonatiger Rauchexposition gegenüber den Kontrolltieren leicht erhöht war. Des Weiteren zeigten die CRAMP^{-/-}-Mäuse ein stärkeres Maß an fibrotischen Atemwegsveränderungen gegenüber den WT-Mäusen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die BAL der CRAMP^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Gesamtzellzahl bzw. mehr Makrophagen als die Kontrolltiere enthielt. Damit einher könnte eine vermehrte Präsenz von matrixzersetzenden Proteasen einhergehen, die zur Zerstörung des Bindegewebes beitragen. Diese Zerstörung des Bindegewebes könnte dann dazu führen, dass der Organismus versucht, diese Zerstörung zu kompensieren, indem die umliegenden Fibroblasten verstärkt aktiviert werden und interstitielles Bindegewebe produzieren. Dies könnte außerdem zu einer Umwandlung von Epithelzellen in Myofibroblasten führen, welche ebenfalls mehr Matrix-

material produzieren als zur Kompensation der vermehrten matrixzersetzenden Proteasen nötig wäre.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der erzielten Ergebnisse die These aufstellen, dass CRAMP im untersuchten COPD-Mausmodell entzündungshemmend wirkt, da bei den Kontrolltieren sowohl nach kurzzeitiger als auch nach langzeitiger Rauchexposition geringere Zytokinspiegel gemessen wurden als bei den CRAMP^{-/-}-Tieren.

5.2.2. Die ambivalente Rolle des murinen Cathelizidins CRAMP bei Asthma

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nicht nur die immunmodulatorische Funktion von CRAMP bei experimenteller COPD, sondern auch bei experimentell induziertem Asthma auf. Es zeigte sich zwar kein Unterschied in der Gesamtzellzahl der BAL und in der Zellzusammensetzung der BAL sowie keine Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen der Lungenhomogenisate zwischen CRAMP^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen nach experimentell induziertem akuten Asthma auf; allerdings enthielt das Serum von CRAMP^{-/-}-Mäusen geringfügig weniger ovalbuminspezifisches IgE als das der WT-Mäuse. Im histologischen Bild ergaben sich zwischen den Vergleichsgruppen (CRAMP^{-/-}- und WT-Mäuse) keine Unterschiede. Eine mögliche Erklärung für den etwas geringeren Titer an ovalbuminspezifischem IgE bei den CRAMP^{-/-}-Tieren könnte sein, dass ihre Lungen generell tendenziell etwas geringere Spiegel an T_{H2}-Zytokinen nach experimentell induziertem akuten Asthma hatten. Des Weiteren waren in der BAL der CRAMP^{-/-}-Tiere absolut keine Lymphozyten nachweisbar, die BAL der Kontrolltiere enthielt hingegen einen sehr kleinen Anteil an Lymphozyten. T-Zellen und Mastzellen produzieren die T_{H2}-Zytokine IL4, IL-5 und IL-13. CRAMP wirkt chemotaktisch für T-Lymphozyten [De et al., 2000], zu denen auch T_{H2}-Zellen zählen. Da CRAMP^{-/-}-Mäuse kein CRAMP produzieren können, können auch weniger CD4⁺-Zellen in die Lunge geleitet werden, die dann folglich weniger T_{H2}-Zytokine produzieren können. Dies wiederum könnte der Grund für die etwas niedrigeren OVA-IgE-Titer im Serum der CRAMP^{-/-}-Mäuse sein.

Im Gegensatz zum akuten Asthmodell zeigten sich bei chronisch induziertem experimentellen Asthma deutlichere Unterschiede zwischen CRAMP^{-/-}- und WT-Mäusen auf. Diese Ergebnisse deuten zum einen Teil auf eine proasthmatische und zum anderen Teil auf eine antiasthmatische Wirkung von CRAMP hin. Diese an sich entgegengesetzten Rollen könnten allerdings mit der Hypothese, dass CRAMP ein proapoptotischer Faktor für Eosinophile sein könnte, in Einklang gebracht werden. Das Fehlen eines proapoptotischen Faktors (CRAMP) für Eosinophile könnte bei CRAMP^{-/-}-Tieren zu einer verlängerten Lebensdauer pulmonaler Eosinophiler, welche sich im Zuge einer asthmatischen Reaktion in der Lunge ansammeln,

führen. Eosinophile sezernieren unter anderem ein Protein namens PAF (Blutplättchenaktivierungsfaktor) [Thomas et al., 1996]. PAF führt einerseits zur Rekrutierung weiterer Eosinophiler; andererseits stimuliert PAF die Ausschüttung der Lipidmediatoren Leukotrien C4 und Leukotrien D4 [Thomas et al., 1996]. Diese Leukotriene fördern die Mukusbildung durch schleimproduzierende Zellen [Houdret et al., 1986]. Eine verlängerte Lebensdauer pulmonaler Eosinophiler führt also gemäß dieser Hypothese zu einer erhöhten Gesamtzellzahl in der BAL sowie zur vermehrten Schleimsekretion bei chronischem Asthma. Da CRAMP ein chemotaktischer Faktor für Makrophagen und T-Lymphozyten ist [De et al., 2000], kann ein Mangel an CRAMP sowohl zu einer Verminderung des Anteils an Makrophagen im Differenzialzellbild als auch zu einer Abschwächung der mit Asthma einhergehenden T_{H2} -Reaktionen führen. Dies könnte die Tatsache erklären, dass der Anteil an Makrophagen an der Gesamtzellzahl in der BAL als auch die Konzentrationen der asthmatypischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in den Lungenhomogenisaten der CRAMP^{-/-}-Mäuse, verglichen mit denen der als Kontrolle dienenden WT-Mäusen, sehr stark erniedrigt waren. Mit dieser Hypothese lässt sich auch der im Vergleich zu den WT-Mäusen stark erniedrigte Spiegel von allergenspezifischem IgE erklären, da geringe Mengen an T_{H2} -Zytokinen nur zu einer geringen Produktion von allergenspezifischem IgE führen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CRAMP, falls es definitiv ein proapoptotischer Faktor für Eosinophile sein sollte, sowohl proasthmatisch als auch antiasthmatisch in dem in dieser Arbeit zu Grunde liegenden Mausmodell wirkt.

5.3. Myeloisches NF- κ B wirkt entzündungshemmend bei Rauchexposition

Inhalation von Rauch führt zur Akkumulation zahlreicher schädlicher Stoffe und Partikel in der Lunge. Diese werden durch Zellen, die auf Phagozytose spezialisiert sind, neutralisiert. Zu diesen phagozytierenden Zellen gehören unter anderem Makrophagen. NF- κ B beeinflusst Gene, die bei Phagozytoseprozessen eine wichtige Rolle spielen wie beispielsweise CD14 [Cortez 2006]. Unter der Hypothese, dass bei p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren die Fähigkeit zur Phagozytose möglicherweise beeinträchtigt ist, könnte die Tatsache erklärt werden, dass sowohl die Anzahl an Makrophagen als auch die TNF α -Konzentration im Lungenhomogenisat der p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tiere bei kurzzeitiger Zigarettenrauchexposition verglichen mit den Kontrolltieren (LysM::Cre) erniedrigt ist. Normalerweise würde die Rekrutierung von Makrophagen zu einer raschen Beseitigung der Rauchpartikel führen. Makrophagen, deren Phagozytoseaktivität jedoch herabgesetzt ist, könnten dies allerdings schlechter als gewöhnlich bewerkstelligen, so dass dieser Prozess bei den Kontrolltieren etwas schneller erfolgen könnte als bei den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren. Dadurch, dass gemäß der oben formulierten Hypothese die Entsorgung der Rauchpartikel bei den p65^{lox/lox}

LysM::Cre-Tieren etwas länger dauert, steigt sowohl die Zahl der in den Atemwegen befindlichen Makrophagen als auch der Spiegel des im Lungenhomogenisats gemessenen Entzündungsmediators TNF α bei den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Mäusen, verglichen mit den Kontrollmäusen, geringfügig an. Die Tatsache, dass es nur marginale Unterschiede zwischen den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren und den Kontrolltieren nach akuter Rauchexposition gibt, könnte darin begründet sein, dass sich ein Unterschied in der Phagozytoseaktivität der Makrophagen bei einmaliger Zigarettenrauchexposition nur geringfügig auswirkt.

Bei längerer Zigarettenrauchexposition (experimentelles COPD-Modell) konnte eine starke Erhöhung sowohl der Gesamtzellzahl (Makrophagen) als auch der im Lungenhomogenisat gemessenen Zytokine IL-6, KC und TNF α bei den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren gegenüber den Kontrolltieren aufgezeigt werden. Der Serumspiegel des Zytokins KC war bei den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren ebenfalls – verglichen mit den Kontrolltieren – sehr stark erhöht. Diese Ergebnisse stützen die anfangs formulierte Vermutung: Eine kontinuierliche Präsenz von schädlichen Rauchpartikeln gepaart mit einer möglicherweise verminderten Phagozytoseaktivität der in die Lunge rekrutierten Makrophagen führt gemäß dieser Hypothese zu einer verstärkten Belastung des pulmonalen Gewebes. Dieser vermehrte Zellstress führt zur verstärkten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und somit zur Rekrutierung weiterer Makrophagen. Eine länger andauernde Zigarettenrauchexposition führt somit bei einem Knockout von myeloischem p65 (p65^{lox/lox} LysM::Cre-Mäuse) sowohl zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BAL als auch zu einer vermehrten Präsenz von Entzündungsmediatoren in der Lunge und im Blut. Im histologischen Bild konnte allerdings kein wesentlicher Unterschied zwischen den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren und den Kontrolltieren hinsichtlich Emphysembildung und Infiltratbildung im Lungenparenchym dokumentiert werden. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass ein Großteil der Makrophagen durch den Prozess der BAL-Entnahme aus der Lunge herausgespült wurde, so dass lediglich die im Lungenparenchym befindlichen Makrophagen histologisch nachgewiesen wurden und die vermehrte Anzahl an Makrophagen bei den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Mäusen nicht für eine gesteigerte Emphysembildung ausreichte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei akuter Zigarettenrauchexposition konnte hier ein deutlicher Unterschied zwischen den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren und den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Da bei experimentell induzierter COPD die Zigarettenrauchexposition der Tiere um ein Vielfaches länger war als bei akuter Zigarettenrauchexposition, würde sich eine Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivität myeloischer Zellen oder auch eine vermehrte Präsenz von Makrophagen im Lungenparenchym (z.B. ausgelöst durch partielle Apoptoseresistenz oder verändertem Migrationsverhalten der betrachteten Zellen s.u.) deutlich bemerkbar machen, was durch die Ergebnisse dokumentiert werden konnte.

Möglicherweise könnte aber auch der Übertritt der Makrophagen aus dem Lungenparenchym in die Atemwege bei einem Knockout von myeloischem p65, bzw. einem Fehlen des p65-abhängigen NF- κ B-Signalweges erleichtert sein. Gemäß dieser Hypothese könnten mehr Makrophagen als bei den Kontrolltieren das Atemwegsepithel durchqueren, was letztlich zu einer erhöhten Zellzahl in der BAL bei den p65^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren verglichen mit den Kontrolltieren führen würde. Da Makrophagen TNF α produzieren, würden mehr Makrophagen in den Atemwegen zu einem Anstieg der TNF α -Konzentration in der Lunge führen. Gemäß dieser Hypothese müsste die dauerhafte Aktivierung des myeloischen NF- κ B-Signalweges zu einer Retention von Makrophagen im Lungengewebe führen, was in ähnlicher Weise bei experimentell induziertem Asthma (s. u.) gezeigt werden konnte. Damit verbunden wären als Konsequenz die Erhöhung des TNF α -Spiegels im Lungengewebe sowie eine starke Infiltration des Lungengewebes mit Makrophagen und eine verstärkte Emphysembildung, verglichen mit Kontrolltieren.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich experimentell induzierter COPD sagen, dass sich – zumindest myeloisches – p65 und somit NF- κ B gemäß der vorher formulierten Hypothesen entzündungsmindernd im Mausmodell auswirkt, da die Kontrolltiere eine geringere Gesamtzellzahl in ihrer BAL und weniger Zytokine (IL-6, KC und TNF α) im Lungenhomogenisat sowie weniger KC im Serum als die Tiere mit myeloischem p65-Knockout (p65^{lox/lox} LysM::Cre) aufwiesen.

5.4. Myeloisches NF- κ B hat eine ambivalente Rolle bei akutem Asthma inne

NF- κ B als äußerst wichtiger immunmodulatorisch wirksamer Transkriptionsfaktor zeigte in dieser Arbeit nicht nur eine Rolle bei experimenteller COPD, sondern auch bei experimentell induziertem akutem Asthma auf. Dieses komplexe Phänomen könnte durch die Hypothese erklärt werden, dass NF- κ B möglicherweise einen hemmenden Einfluss auf die Fähigkeit der Diapedese bzw. die Fähigkeit zur Durchquerung von Epithelien myeloischer Zellen ausübt [Bonizzi & Karin, 2004]. Gemäß dieser Hypothese könnte erklärt werden, warum die konstitutive Aktivierung des myeloischen NF- κ B-Weges bei experimentell induziertem Asthma sowohl zu einer Retention von Zellen im Lungenparenchym als auch zu einer Verminderung der Gesamtzellzahl in der BAL führt. Eine Störung der Fähigkeit, Epithelien zu durchqueren würde gemäß dieser Hypothese zu einer Retention von Zellen im Lungenparenchym führen, da sie – obwohl in die Atemwege rekrutiert – nicht in der Lage sind, das Atemwegsepithel zu durchdringen. Folglich steigt die Anzahl an Immunzellen myeloischen Ursprungs (z.B. Eosinophile) im Lungenparenchym an, und die Gesamtzellzahl in der BAL sinkt, verglichen mit den Kontrolltieren, ab. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der Anteil an Eosinophilen

bei konstitutiv aktiviertem myeloischen NF- κ B, verglichen mit demjenigen der Kontrolltiere, erniedrigt ist. Neutrophile sind die ersten Zellen am Entzündungsherd. Da bei konstitutiver Aktivierung des myeloischen NF- κ B-Signalweges der Anteil an Neutrophilen in der BAL erhöht ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der Organismus versucht, den Mangel an Eosinophilen zumindest quantitativ zu kompensieren. Die bei konstitutiv aktiviertem myeloischen NF- κ B vorhandene Präsenz an ovalbuminspezifischem IgE könnte entweder in einer gesteigerten Produktion oder in einer geringeren Bindung an FC ϵ -Rezeptor-tragenden Zellen begründet sein. Da die Produktion von IgE nicht durch myeloide Zellen, sondern durch lymphoide Zelle bewerkstelligt wird, scheidet eine Beteiligung von myeloischen NF- κ B bei der Produktion von IgE aus. Zellen, deren Oberflächen mit FC ϵ -Rezeptoren bestückt sind, können eine Vielzahl an freiem IgE binden und somit aus dem Serum entfernen. Zu den FC ϵ -Rezeptor-tragenden Zellen zählen sowohl Mastzellen (im Gewebe vorkommend) als auch basophile Granulozyten (im Blut vorkommend). Die Tatsache, dass basophile Granulozyten zu Entzündungsherden im Gewebe rekrutiert werden können [Nouri-Aria et al., 2001], könnte dazu führen, dass im Blut befindliches IgE nicht durch Basophile gebunden werden kann und somit ansteigt. Dies könnte die Situation bei IkB α ^{lox/lox} LysM::Cre-Tieren widerspiegeln, da hier eine vermehrte Konzentration an ovalbuminspezifischem IgE im Serum, verglichen mit den Kontrolltieren, gemessen wurde.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich experimentell induziertem Asthma und myeloischem NF- κ B im Mausmodell postulieren, dass der myeloische NF- κ B-Signalweg sowohl antiasthmatisch als auch proasthmatisch wirkt. Der generelle Einstrom von Immunzellen und dessen Anteil an Eosinophilen wird durch konstitutiv aktives myeloisches p65-abhängiges NF- κ B im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert. Somit wirkt myeloisches p65-abhängiges NF- κ B im Mausmodell antiasthmatisch. Da jedoch der Serumspiegel an allergenspezifischem (ovalbuminspezifischem) IgE bei einem Knockout von myeloischem p65 ansteigt, wirkt myeloisches NF- κ B im Mausmodell auch teilweise proasthmatisch. Diese Tatsache wird durch den Befund unterstützt, dass es sich bei einem konstitutiven Knockout von myeloischem p65 gerade entgegengesetzt verhält.

6. Literaturverzeichnis

- Aarbiou, J., Ertmann, M., van Wetering, S., van Noort, P., Rook, D., Rabe, K. F., Litvinov, S. V., van Krieken, J. H., de Boer, W. I., Hiemstra, P. S. (2002). Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 167-174.
- Abbey, D.E., Burchette, R. J., Knutsen, S. F., McDonnell, W. F., Lebowitz, M. D., Enright, P. L. (1998). Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 289–298.
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jornvall, H., Wigzell, H., Gudmundsson G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**, 3086-3093.
- Agerberth, B., Grunewald, J., Castanos-Velez, E., Olsson, B., Jornvall, H., Wigzell, H., Eklund, A., Gudmundsson, G. H. (1999). Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 283-290.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 195-199.
- Agusti, A., MacNee, W., Donaldson, K., Cosio, M. (2003). Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax*. **58**, 832–834.
- Aikawa, T., Shimura, S., Sasaki, H., Ebina, M., Takishima, T. (1992). Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* **101**, 916–921.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* **2**, 675–680.
- Algül, H., Treiber, M., Lesina, M., Nakhai, H., Saur, D., Geisler, F., Pfeifer, A., Paxian, S., Schmid, R.M. (2007). Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of a murine model of inflammation-associated colitis following cerulean pancreatitis. *J. clin. Invest.* **117**, 1490-1500
- Aoshiba, K., Yokohori, N., Nagai, A. (2003). Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 555–562.
- Arendt, C. W., Albrecht, B., Soos, T. J. & Littman, D. R. (2002). Protein kinase C θ : signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 323–330.
- Aronica, M. A., Mora, A. L., Mitchell, D. B., Finn, P. W., Johnson, J. E., Sheller, J. R., Boothby, M. R. (1999). Preferential role for NF- κ B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T-cell-dependent immune response in vivo. *J. Immunol.* **163**, 5116–5124.
- Ashburner, B. P., Westerheide, S. D., Baldwin, A. S. Jr. (2001). The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7065–7077.
- Aune, T. M., Mora, A. L., Kim, S., Boothby, M. R., Lichtman, A. H. (1999). Costimulation reverses the defect in IL-2 but not effector cytokine production by T cells with impaired I κ B α degradation. *J. Immunol.* **162**, 5805–5812.
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., Wilson, J. M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 9541-9546.
- Bals, R., Weiner, d. J., Moscioni, A. D., Meegalla, R. L., Wilson, J. M. (1999). Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* **67**, 6084-6089.

- Barbera, J. A., Riverola, A., Roca, J., Ramirez, J., Wagner, P. D., Ros, D., Wiggs, B. R., Rodriguez-Roisin, R. (1994). Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationship in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**, 423–429.
- Barnes, P. J. (2004). Macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* **1**, 59–70.
- Barnes, P. J. (2004). Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharm. Rev.* **56**, 515–548.
- Barnes, P. J., Chung, K. F., Page, C. P. (1998). Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* **50**, 515–596.
- Beasley, R., Roche, W., Roberts, J. A., Holgate, S. T. (1989). Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 806–817.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T. & Baltimore, D. (1995). Constitutive NF- κ B activation, enhanced granulopoiesis and neonatal lethality in I κ B α -deficient mice. *Genes Dev.* **9**, 2736–2746.
- Ben-Neriah, Y. (2002). Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nature Immunol.* **3**, 20–26.
- Bentley, A. M., Meng, Q., Robinson, D. S., Hamid, Q., Kay, A. B., Durham, S. R. (1993). Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **8**, 35–42.
- Birbach, A., Gold, P., Binder, B. R., Hoder, E., de Martin, R., Schmid, J. A. (2002). Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **277**, 10842–10851.
- Bochner, B. S., Udem, B. J., Lichtenstein, L. M. (1994). Immunological aspects of allergic asthma. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 295–335.
- Bonizzi, G., Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280–8.
- Bosken, C. H., Wiggs, B. R., Pare, P. D., Hogg, J. C. (1990). Small airway dimensions in smokers with obstruction to airflow. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, 563–570.
- Bowdish, D. M., Davidson, D. J., Speert, D. P., Hancock, R. E. (2004). The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J. Immunol.* **172**, 3758–3765.
- Bradding, P., Roberts, J. A., Britten, K. M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C. H., Howarth, P. H., Holgate, S. T. (1994). Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 471–480.
- Brewster, C. E. P., Howarth, P. H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S. T., Roche, W. R. (1990). Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 507–511.
- Brightling, C. E., Bradding, P., Symon, F. A., Holgate, S. T., Wardlaw, A. J., Pavord, I. D. (2002). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1699–1705.
- Caamano, J., Hunter, C. A. (2002). NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 414–429.
- Calhoun, W. J., Jarjour, N. N., Gleich, G. J., Stevens, C. A., Busse, W. W. (1993). Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 1465–1471.
- Calhoun, W. J., Reed, h. E., Moest, D. R., Stevens, C. A. (1992). Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and airspace cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 317–325.

- Caramori, G., Romagnoli, M., Casolari, P., Bellettato, C., Casoni, G., Boschetto, B., Chung, K. F., Barnes, P. J., Adcock, I. M., Ciaccia, A., Fabbri, L. M., Papi, A. (2003). Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax* **58**, 348–351.
- Carroll, N. G., Cooke, C., James, A. L. (1997). Bronchial blood vessel dimensions in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 689–695.
- Carroll, N., Elliot, A., Morton, A., James, A. (1993). The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 405–410
- Celli, B.R. 2006. Chronic obstructive pulmonary disease: from unjustified nihilism to evidencebased optimism. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 58–65.
- Charan, N. B., Baile, E. M., Pare, P. D. (1997). Bronchial vascular congestion and angiogenesis. *Eur. Respir. J.* **10**, 1173–1180.
- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E., Greene, W. C. (2001). Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* **293**, 1653–1657.
- Cheng, J. D., Ryseck, R. P., Attar, R. M., Dambach, D., Bravo, R. (1998). Functional redundancy of the nuclear factor- κ B inhibitors I κ B α and I κ B β . *J. Exp. Med.* **188**, 1055–1062.
- Chrysofakis, G., Tzanakis, N., Kyriakoy, D., Tsoumakidou, M., Tsiligianni, I., Klimathianaki, M., Siafakas, N. M. (2004). Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* **125**, 71–76.
- Clausen, B. E. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research* **8**, 265-277
- Cockcroft, D. W., Murdock, K. Y. (1987). Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate, and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J. Allergy Clin. Immunol.* **79**, 734–740.
- Cortez, J., (2006). Monocytic cell responses to *Aspergillus fumigatus*: investigation of phagocytosis, gene expression and peptide presentation to *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **74**, 2353-2365.
- Cosio, M. G., Hale, K. A., Niewoehner, D. E. (1980). Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **122**, 265–271.
- Costa, C., Rufino, R., Traves, S. L., Lapa E Silva, J. R., Barnes, P.J., Donnelly, L. E. (2008). CXCR3 and CCR5 chemokines in the induced sputum from patients with COPD. *Chest* **133**, 26–33.
- Cote, C., Zilberberg, M.D., Mody, S.H., Dordelly, L.J., Celli, B. (2007). Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **29**, 923–929.
- Cowland, J. B., Johnsen, A. H., Borregaard, N. (1995). hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* **368**, 173-176.
- Davidson, D. J., Currie, a. J., Reid, g. S., Bowdish, D. M., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E., Speert, D. P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol.* **172**, 1146-1156.
- De Monchy, J. G., Kauffman, H. F., Venge, P., Koeter, g. H., Jansen h. M., Sluiter, H. J., De Vries, K. (1985). Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**, 373-376
- De, Y., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069-1074.

- Dechend, R., Hirano, F., Lehmann, K., Heissmeyer, V., Ansieau, S., Wulczyn, F. G., Scheidereit, C., Leutz, A. (1999) The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* **18**, 3316–3323.
- Demeo, D.L., Mariani, T. J., Lange, C., Srisuma, S., Litonjua, A. A., Celedon, J. C., Lake, S. L., Reilly, J. J., Chapman, H. A., Mecham, B. H., Haley, K. J., Sylvia, J. S., Sparrow, D., Spira, A. E., Beane, J., Pinto-Plata, V., Speizer, F. E., Shapiro, S. D., Weiss, S. T., Silverman, E. K. (2006). The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 253–264.
- Demoly, P., Simony-Lafontaine, J., Chanez, P., Pujol, J. L., Lequeux, N., Michel, F. B., Bousquet, J. (1994). Cell proliferation in the bronchial mucosa of asthmatics and chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 214–217.
- Denburg, J. A., Inman, M. D., Leber, B., Sehmi, R., O’Byrne, P. M. (1996). The role of the bone marrow in allergy and asthma. *Allergy* **51**, 141–148.
- Dunnill, M. S., Massarella, G. R., Anderson, J. A. (1969). A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* **24**, 176–179.
- Eberharter, A., Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin: second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**, 224–229.
- Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T., Motomiya, M. (1993). Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma — a 3-D morphometric study. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 720–726.
- Ebina, M., Yeagashi, H., Takahashi, T., Motomiya, M., Tanemura, M. (1990). Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, 1322–1326.
- Engelen, M.P., Schols, A.M., Lamers, R.J., Wouters, E.F. 1999. Different patterns of chronic tissue wasting among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Nutr.* **18**, 275–280.
- Eriksson, S. (1964). Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* **175**, 197–205.
- Evans, M. J., Van Winkle, L. S., Fanucchi, M. V., Plopper, C. G. (1999). The attenuated fibroblast sheath of the respiratory tract epithelial-mesenchymal trophic unit. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 655–657.
- Fabbri, L. M., Saetta, M., Picotti, G., Mapp, C. E. (1991). Late asthmatic reactions, airway inflammation and chronic asthma in toluenediisocyanate-sensitized subjects. *Respiration* **1**, 18–21.
- Ferrarotti, I., Zorzetto, M., Beccaria, M., Gilè, L. S., Porta, R., Ambrosino, N., Pignatti, P. F., Cerveri, I., Pozzi, E., Luisetti, M. (2003). Tumour necrosis factor family genes in a phenotype of COPD associated with emphysema. *Eur. Respir. J.* **21**, 444–449.
- Ferreira, V., Sidénus, N., Tarantino, N., Hubert, P., Chatenoud, L., Blasi, F., Körner, M. (1999). In vivo inhibition of NF- κ B in T-lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *J. Immunol.* **162**, 6442–6450.
- Filley, G.F. (1967). Emphysema and chronic bronchitis: clinical manifestations and their physiologic significance. *Med. Clin. North Am.* **51**, 283–292.
- Finkelstein, R., Mah, D., Ghezzi, H., Whittaker, K., Fraser, S., Cosio, M. G. (1995). Morphometry of small airways in smokers and its relationship to emphysema type and hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 267–276.
- Fletcher, C., Peto, R. (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *Br. Med. J.* **1**, 1645–1648.
- Flood-Page, P., Swenson, C., Faiferman, I., Matthews, J., Williams, M., Brannick, L., Robinson, D., Wenzel, S., Busse, W., Hansel, T. T., Barnes, N. C., International Mepolizumab Study Group. (2007). A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 1062–1071.

- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* **272**, 15258-15263.
- Frohm, N. M., Sandstedt, B., Sorensen, O., Weber, G., Borregaard, N., Stahle-Backdahl, M. (1999). The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect. Immun.* **67**, 2561-2566.
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliou, A. M., Williams, C. M., Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 749–786.
- Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., Merluzzi, L., Gennaro, R. (1997). Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J. Biol. Chem.* **272**, 13088-13093.
- Gennaro, R., Zanetti M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 31-49.
- Georas, S. N., Liu, M. C., Newman, W., Beall, L. D., Stealey, B. A., Bochner, B. S. (1992). Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 261–269.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Rourke, I., Grossmann, M. (1998). The regulation and roles of Rel/NF- κ B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 353–359.
- Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225–260.
- Gizycki, M. J., Adelroth, E., Rogers, A. V., O’Byrne, P. M., Jeffery, P. K. (1997). Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 664–673.
- Glynn, A. A., Michaels, L. (1960). Bronchial biopsy in chronic bronchitis and asthma. *Thorax* **15**, 142–153.
- Godard, P., J. Chaintreuil, M. Damon, M. Coupe, O. Flandre, A. Crastes-de-Paulet, and F. B. Michel. (1982). Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatics and normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **70**, 88–93.
- Greiff, L., Erjefalt, I., Svensson, C., Wollmer, P., Alkner, U., Andersson, M., Persson, C. G. (1993). Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa. *Clin. Physiol.* **13**, 219–233.
- Gross, P., Babayak, M. A., Tolker, E., Kaschak, M. (1964). Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *J. Occup. Med.* **6**, 481–484.
- Grumelli, S., Corry, D. B., Song, L. Z., Song, L., Green, L., Huh, J., Hacken, J., Espada, R., Bag, R., Lewis, D. E., Kheradmand, F. (2004). An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* **1**, e8.
- Grumelli, S., Corry, D. B., Song, L. Z., Song, L., Green, L., Huh, J., Hacken, J., Espada, R., Bag, R., Lewis, D. E., Kheradmand, F. (2004). An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* **1**, 75–83.
- Grumont, R. (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- κ B and I κ B function: transgenics and knockouts. *Oncogene* **18**, 6888–6895.
- Guo, C. B., Liu, M. C., Galli, S. J., Bochner, B. S., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M. (1994). Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 384–390.
- Hart, L. A., Krishnan, V. L., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Chung, K. F. (1998). Activation and localization of transcription factor, nuclear factor- κ B, in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 1585–1592.

- Hase, K., Eckmann, L., Leopard, J. D., Varki, N., Kagnoff, M. F. (2002). Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect. Immun.* **70**, 953-963.
- Hase, K., Murakami, M., Iimura, M., Cole, S. P., Horibe, Y., Ohtake, T., Obonyo, M., Gallo, R. L., Eckmann, L., Kagnoff, M. F. (2003). Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **125**, 1613-1625.
- Heard, B.E., Hossain, S. (1973). Hyperplasia of bronchial muscle in asthma. *J. Pathol.* **110**, 319-331.
- Heller, W. T., Waring, A. J., Lehrer, R. I., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Yang, L., Huang, H. W. (2000). Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. *Biochemistry* **39**, 139-145.
- Hettmann, T., DiDonato, J., Karin, M., Leiden, J. M. (1999). An essential role for nuclear factor- κ B in promoting doublepositive thymocyte apoptosis. *J. Exp. Med.* **189**, 145-158.
- Hirata, M., Shimomura, Y., Yoshida, M., Morgan, J. G., Palings, I., Wilson, D., Yen, M. H., Wright, S. C., Larrick, J. W. (1994). Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect. Immun.* **62**, 1421-1426.
- Hogg J., Austen, K. F., Lichtenstein, L., Kay, A. B., Holgate, S. T., editors. (1993). Asthma, Vol. IV: Physiology, immunopharmacology and treatment. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*. 17-25.
- Holgate, S. T. (1993). The 1992 Cournand Lecture. Asthma: past, present and future. *Eur. Respir. J.* **6**, 1507-1520.
- Holgate, S. T. (1997). Asthma genetics: waiting to exhale. *Nat. Genet.* **15**, 227-229.
- Hoshino, M., Nakamura, Y., Sim, J. J. (1998). Expression of growth factors and remodeling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax* **53**, 21-27.
- Houdret N, Perini JM, Galabert C, Scharfman, A., Humbert, P., Lamblin, G., Roussel, P. (1986). The high lipid content of respiratory mucins in cystic fibrosis is related to infection. *Biochem. Biophys. Acta* **880**, 54-61.
- Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M. & Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 1014-1019.
- Huang, T. T., Miyamoto, S. (2001). Postrepression activation of NF- κ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I κ B α . *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4737-4747.
- Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S. & Ghosh, G. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell* **95**, 759-770 (1998).
- Imler, J. L., Hoffmann, J. A. (2000). Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection. *Rev. Immunogenet.* **2**, 294-304.
- Ito, I., Nagai, S., Handa, T., Muro, S., Hirai, T., Tsukino, M., Mishima, M. (2005). Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1378-1382.
- Ito, K., Barnes, P. J., Adcock, I. M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6891-6903.
- Jarjour, N., Calhoun, W., Becky-Wells, E., Gleich, G., Schwartz, L., Busse, W. (1997). The immediate and late-phase allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 1515-1521.
- Jeffery, P. (1996). Bronchial biopsies and airway inflammation. *Eur. Respir. J.* **9**, 1583-1587.
- Jeffery, P. K. (1998). The development of large and small airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, S174-S180.

- Jeffery, P. K., Wardlaw, A., Nelson, F. C., Collins, J. V., Kay, A. B. (1989). Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural quantification study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 1745–1753.
- Jiménez, L.A., Thompson, J., Brown, D. A., Rahman, I., Antopnicelli, F., Duffin, R., Drost, E. M., Hay, R. T., Donaldson, K., MacNee, W. (2000). Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkkappaB degradation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **166**, 101–110.
- Johansson, J., Gudmundsson, G. H., Rottenberg, M. E., Berndt, K. D., Agerberth, B. (1998). Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* **273**, 3718–3724.
- Johnson, C., Van Antwerp, D. & Hope, T. J. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of Ikb α . *EMBO J.* **18**, 6682–6693.
- Joos, L., Pare, P.D., Sandford, A.J. 2002. Genetic risk factors. In Chronic obstructive lung diseases. N. Voelkel and W. MacNee, editors. *B.C. Decker. London, United Kingdom.* 56–64.
- Kaisho, T., Takeda, K., Tsujimura, t., Kawai, T., Nomura, f., Terada, N., Akira, S. (2001). Ikb kinase α is essential for mature B-cell development and function. *J. Exp. Med.* **193**, 417–426.
- Karakatsani, A., Andreadaki, S., Katsouyanni, K., Dimitroulis, I., Benetou, V., Trichopolou, A. (2003). Air pollution in relation to manifestations of chronic pulmonary disease: a nested case-control study in Athens, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* **18**, 45–53.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621–663.
- Kay, A. B. (1992). “Helper” (CD41) T cells and eosinophils in allergy and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, S22–S26.
- Kay, A. B. (2006). The role of T lymphocytes in asthma. *Chem. Immunol. Allergy.* **91**, 59–75.
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., Leder, P. (1998). The death-domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* **8**, 297–303.
- Kirikae, T., Hirata, M., Yamasu, H., Kirikae, F., Tamura, H., Kayama, F., Nakatsuka, K., Yokochi, T., Nakano, M., (1998). Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect. Immun.* **66**, 1861-1868.
- Koh, Y. Y., Dupuis, R., Pollice, M., Albertine, K. H., Fish, J. E., Peters, S. P. (1993). Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **8**, 493–499.
- Kojima, H., Aizawa, Y., Yanai, Y., Nagaoka, K., Takeuchi, M., Ohta, T., Ikegami, H., Ikeda, M., Kurimoto, M. (1999). An essential role for NF- κ B in IL-18-induced IFN- γ expression in KG-1 cells. *J. Immunol.* **162**, 5063–5069.
- Kurosaka, K., Chen, q., Yarovinsky, F., Oppenheim, J. J., Yang, D. (2005). Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J. Immunol.* **174**, 6257-6265.
- Kuwano, K., Bosken, C. H., Pare, P. D., Bai, T. R., Wiggs, B. R., Hogg, J. C. (1993). Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **148**, 1220–1223.
- Laitinen, L. A., Heino, M., Laitinen, A., Kava, T., Haahtela, T. (1985). Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**, 599–606.
- Lambert, R. K., Wiggs, B. R., Kuwano, K., Hogg, J. C., Pare, P. D. (1991). Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J. Appl. Physiol.* **74**, 2771–2781.
- Larrick, J. W., Hirata, M., Balint, r. F., Lee, J., Zhong, J., Wright, S. C. (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* **63**, 1291-1297.

- Lassalle, P., Gosset, P., Delneste, Y., Tscopoulos, A., Capron, A., Joseph, M., Tonnel, A. B. (1993). Modulation of ahesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 105–110.
- Lau, Y. E., Rozek, A., Scott, M. G., Goosney, d. L., Davidson, D. J., Hancock R. E. (2005). Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**, 583-591.
- Leckie, M. J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B. J., Walls, C. M., Mathur, A. K., Cowley, H. C., Chung, K. F., Djukanovic, R., Hansel, T. T., Holgate, S. T., Sterk, P. J., Barnes, P. J. (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response. *Lancet* **356**, 2144–2148.
- Lee, S. H., Hannink, M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of I κ B ϵ . *J. Biol. Chem.* **277**, 23358–23366.
- Lee, S. K., Kim, J. H., Lee, Y. C., Cheong, J. & Lee, J. W. (2000). Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor- κ B and serum response factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 12470–12474.
- Li, Q., Estepa, G., Memet, S., Israel, A. & Verma, I. M. (2000). Complete lack of NF- κ B activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* **14**, 1729-1733.
- Li, Q., Verma, I.M. (2002). NF- κ B Regulation In The Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:725-734.
- Liu, M. C., Hubbard, W. C., Proud, D., Stealey, B. A., Galli, S. J., Kagey-Sobotka, A., Bleecker, E. R., Lichtenstein, L. M. (1991). Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics: cellular, mediator, and permeability changes. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 51–58.
- Maestrelli, P., M. Sietta, A. Di-Stefano, P. G. Calcagni, G. Turato, M. P. Ruggieri, A. Roggeri, C. E. Mapp, and L. M. Fabbri (1995). Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 1926–1931.
- Magee, F., Wright, J. L., Wiggs, B. R., Pare, P. D., Hogg, J. C. (1988). Pulmonary vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **43**, 183–189.
- Majo, J., Ghezzi, H., Cosio, M. G. (2001). Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur. Respir. J.* **17**, 946–953.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., Ghosh, G. (2001). I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 45225–45235.
- Malm, J., Sorensen, O., Persson, T., Frohm-Nilsson, M., Johansson, B., Bjartell, A., Lilja, H., Stahle-Backdahl, M., Borregaard, N., Egesten, A. (2000). The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* **68**, 4297-4302.
- May, M. J., Ghosh, S. (1997). Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 63–73.
- McAllister-Lucas, L. M., Inohara, N., Lucas, P. C., Ruland, J., Benito, A., Li, Q., Chen, S., Chen, F. F., Yamaoka, S., Verma, I. M., Mak, T. W., Núñez, G. (2001). Bim1, a MAGUK family member linking protein kinase C activation to Bcl10-mediated NF- κ B induction. *J. Biol. Chem.* **276**, 30589–30597.
- Meyer, E. H., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. (2008). T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu. Rev. Med.* **59**, 281–292.
- Montefort, S., Gratziau, C., Goulding, D., Polosa, R., Haskard, D. O., Howarth, P. H., Holgate, S. T., Carroll, M. P. (1994). Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J. Clin. Invest.* **93**, 1411–1421.

- Mora, A. L., Youn, J., Keegan, A., Boothby, M. R. (2001). NF- κ B/Rel participation in the lymphokine-dependent proliferation of T lymphoid cells. *J. Immunol.* **166**, 2218–2227.
- Mosmann TR. (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Adv. Immunol* **56**, 1-26.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335–350.
- Murray, J. J., Tonnel, A. B., Brash, A. R., Roberts, L. D., Gosset, P., Workman, R. Capron, A., Oates, J. A. (1985). Prostaglandin D2 is released during a acute allergic bronchospasm in man. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **98**, 275–280.
- Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H., Heumann, D. (2001). Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J. Immunol.* **167**, 3329-3338.
- Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H., Tanaka, S., Heumann, D. (2002). Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 972-982.
- Nagaoka, I., Tamura, H., Hirata, M. (2006). An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J. Immunol.* **176**, 3044-3052.
- Nizet, V. Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K., Gallo, R.L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**, 22; 454-457
- Nouri-Aria, KT., Irani, AM., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Varga, E. M., Till, S. J., Durham, S. R., Schwartz, L. B. (2001). Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **108**, 205-11.
- O'Shaughnessy, T. C., Ansari, T. W., Barnes, N. C., Jeffery, P. K. (1996). Reticular basement membrane thickness in moderately severe asthma and smokers' chronic bronchitis with and without airflow obstruction [abstract]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, A879.
- Oren, Z., Lerman, J. Z., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Shai, Y. (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* **341** (Pt 3), 501-513.
- Pare, P. D., Wiggs, B. R., James, A., Hogg, J.C., Bosken, C. (1991). The comparative mechanics and morphology of airways in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **143**, 1189–1193.
- Payne, D., Rogers, A. V., Jaffe, A., Misra, D., McKenzie, S. A., Jeffery, P. K. (2000). Reticular basement membrane thickness in children with severe asthma [abstract]. *Arch. Dis. Child* **82**, A42.
- Peinado, V. I., Barbera, J. A., Ramirez, J., Gomez, F. P., Roca, J., Jover, L., Gimferrer, J. M., Rodriguez-Roisin, R. (1998). Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am. J. Physiol.* **274**, 908–913.
- Perkins, N. D. (2000). The Rel/NF- κ B family: friend and foe. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 434–440.
- Persson, C. G., Andersson, M., Greiff, L., Svensson, C., Erjefalt, J. S., Sundler, F., Wollmer, P., Alkner, U., Erjefalt, I., Gustafsson, B., Linden, M., Nilsson, M. (1995). Airway permeability. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 807–814.
- Platts-Mills, T., and L. Wheatley (1996). The role of allergy and atopy in asthma. *Curr. Opin. Pulmon. Med.* **2**, 29–34.
- Pohunek, P., Roche, W. R., Turzikova, J., Kudrman, J., Warner, J. O. (1997). Eosinophilic inflammation in the bronchial mucosa of children with bronchial asthma [abstract]. *Eur. Respir. J.* **11**, 160.

- R. Kühn, F. Schwenk, (1997). Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 183-188.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J., Ricciardi-Castagnoli, P., (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature* **4**, 361-367
- Rimoldi, M., Chieppa, M. Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, M., Viale, G., Allavena, P., Rescigno, M., (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immun.* **6**, 507-514.
- Risso, A., Zanetti, M., Gennaro, R. (1998). Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell Immunol.* **189**, 107-115.
- Robinson, D. S., Damia, R., Zeibecoglou, K., Molet, S., North, J., Yamada, T., Barry Kay, A., Hamid, Q. (1999). CD34(+)/interleukin-5 α messenger RNA⁺ cells in the bronchial mucosa in asthma: potential airway eosinophil progenitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 9–13.
- Robinson, D., Hamid, Q., Bentley, A., Ying, S., Kay, A. B., Durham, S. R. (1993). Activation of CD41 T cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 313–324.
- Rosenfeld, Y., Papo, N., Shai, Y. (2006). Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J.Biol.Chem.* **281**, 1636-1643.
- Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A, Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J., Mak, T. W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/IKK γ -deficient mice. *Genes Dev.* **14**, 854–862.
- Ruland, J., Duncan, G. S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D. G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P. S., Mak, T. W. (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigenreceptor-induced activation of NF- κ B and neural-tube closure. *Cell* **104**, 33–42.
- Rupek A.R., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., Flaig, M.J., Moosmann, S., Plewig, G., Dörken, B., Förster, I., Huss, R., Pfeffer, K. (2005). Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I κ B α . *Immunity* **4**, 479-491
- Sabit, R., Bolton, C. E., Edwards, P. H., Petit, R. J., Evans, W. D., McEniery, C. M., Wilkinson, I. B., Cockcroft, J. R., Shale, D. J. (2007). Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 1259–1265.
- Saetta, M. (1998). CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 822–826.
- Saetta, M., Mariani, M., Panina-Bordignon, P., Turato, G., Buonsanti, C., Baraldo, S., Bellettato, C. M., Papi, A., Corbetta, L., Zuin, R., Sinigaglia, F., Fabbri, L. M. (2002). Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 1404–1409.
- Saetta, M., Turato, G., Baraldo, S., Zanin, A., Braccioni, F., Mapp, C. E., Maestrelli, P., Cavallero, G., Papi, A., Fabbri, L. M. (2000). Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1016–1021
- Sahebjami, H. (1992). Emphysema-like changes in HIV. *Ann. Intern. Med.* **116**, 876.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., Toriumi, W. (1999). I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 30353–30356.

- Sandgren, s., Wittrup, A., Cheng, F., Jonsson, M., Eklund, E., Busch, S., Belting, M. (2004). The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 17951-17956.
- Scott, M. G., Davidson, D. J., Gold, M. R., Bowdish, D., Hancock, R. E. (2002). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* **169**, 3883-3891.
- Sehmi, R., Howie, K., Sutherland, D. R., Schragge, W., O'Byrne, P. M., Denburg, J. A. (1996). Increased levels of CD34⁺ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 645-655.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, C. C., Karin, M. (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499.
- Senftleben, U., Li, Z. W., Baud, V., Karin, M. (2001). IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity* **14**, 217-230.
- Shimura, S., Andoh, Y., Haraguchi, M., Shirato, K. (1996). Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* **9**, 1395-1401.
- Silverman, N., Maniatis, T. (2001). NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**, 2321-2342.
- Smith, H. R., Larsen, G. L., Cherniack, R. M., Wenzel, S. E., Voelkel, N. F., Westcott, J. Y., Bethel, R. A. (1992). Inflammatory cells and eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses and increases in airway responsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1076-1084.
- Snider, G.L., Kleinerman, J., Thurlbeck, W.M., Bengali, Z.H. (1985). The definition of emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 182-185.
- Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-3959.
- Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., Littman, D. R. (2000). PKC- θ is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* **404**, 402-407.
- Tam, W. F., Sen, R. (2001). I κ B family members function by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **276**, 7701-7704.
- Taraseviciene-Stewart, L., Voelker, N.F. (2008). Molecular pathogenesis of Emphysema. *J. clin. Invest.* **118**, 394-402
- Thomas, L.H., Warner, J.A. (1996). The eosinophil and its Role in Asthma. *Gen. Pharmac.* **27**, 593-597.
- Tiddens, H. A. W. M., Pare, P. D., Hogg, J. C., Hop, W. C. J., Lambert, R., De Jongste, J. C. (1995). Cartilaginous airway dimensions and airflow obstruction in human lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 260-266.
- Tonnel, A. B., Joseph, M., Gosset, P., Fournier, E., Capron, A. (1983). Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet* **1**; 1406-1408.
- Traves, S. L., Smith, S. J., Barnes, P. J., Donnelly, L. E. (2004). Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 441-450.
- Tuder, R.M., Voelkel, N.F. (2002). The pathobiology of chronic bronchitis and emphysema. In Chronic obstructive lung diseases. N.F. Voelkel and W. MacNee, editors. *B.C. Decker. London, United Kingdom.* 90-113.
- Van-Vyve, T., P. Chanez, A. Bernard, J. Bousquet, P. Godard, R. Lauwerijs, Sibille, Y. (1995). Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 60-68.

- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D. & Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* **9**, 2723–2735.
- Vrugt, B., Wilson, S., Bron, A., Holgate, S. T., Djukanovic, R., Aalbers, R. (2000). Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur. Respir. J.* **15**, 1014–1021.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. r., Inoue, J., Chen Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346–351.
- Wanner, A., M. Salathé, M., O’Riordan, T. G.. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 868–1902.
- Wenzel, S. E., Westcott, J. Y., Smith, H. R., Larsen, G. L. (1989). Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups: an alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 450–457.
- WHO/NHLBI Workshop Report. 1995. Global strategy for asthma management and prevention. *National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD.* **95-3659**
- Will-Karp, M., Santelitz, J., Karp, C. (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis, *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 69-75
- Wu, M., Maier, E. Benz, R., Hancock, R. E. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7235-7242.
- Xanthou, G., Duchesnes, C. E., Williams, T. J., Pease, J. E. (2003). CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2241–2250.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., Oppenheim, J. J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**, 291-296.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, z., Cheng, j., Huang, j., Deng, L., Liao, W., Lui, Z., Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nature Immunol.* **2**, 620–624.
- Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C. D., White, J. M., Goeddel, D. V., Schreiber, R. D. (2001). Defective lymphotoxin- β receptor-induced NF- κ B transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* **291**, 2162–2165.
- Yu, K., Park, K., Kang, S. W., Shin, S. Y., Hahm, K. S., Kim, Y. (2002). Solution structure of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP as determined by NMR spectroscopy. *J. Pept. Res.* **60**, 1-9.
- Zaiou, M., Nizet, V., Gallo, R. L. (2003). Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 810-816.
- Zangrilli, J. G., Shaver, J. R., Cirelli, R. A., Cho, S. K., Garlisi, C. G., Falcone, A., Cuss, F. M., Fish, J. E., Peters, S. P. (1995). sVCAM-1 levels after segmental antigen challenge correlate with eosinophil influx, IL-4 and IL-5 production, and the late-phase response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1346–1353.
- Zhang, X., Shan, P., Jiang, G., Cohn, L., Lee, P.J. (2006). Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J. Clin. Invest.* **116**, 3050–3059.
- Zhong, H., May, M. J., Jimi, E., Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.* **9**, 625–636.
- Zhong, H., Voll, R. E., Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* **1**, 661–671.