

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier)

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Inhibition der Mucindegradation als Ursache
für Mukusakkumulation im Verlauf einer
pulmonalen COPD-Exazerbation**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jenni Gwendolyn Preuss

aus Herne

Marburg 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
22.01.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: PD Dr. M. Henke

1. Korreferent: Prof. Dr. F. Czubayko

Meinen Eltern
und
meinem Verlobten

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 COPD.....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Pathophysiologie.....	2
1.1.3 Diagnostik.....	3
1.1.4 Therapie.....	4
1.2 Mukus.....	6
1.2.1 Allgemeines.....	6
1.2.2 Veränderungen von Mukus / Mucinen bei COPD.....	7
1.3 Proteasen- /Antiproteasen-Gleichgewicht in der Lunge.....	8
1.4 Fragestellung.....	10

2. Material/Methoden

2.1 Patientenkollektiv/Probenakquisition.....	12
2.2 Sputumproben.....	15
2.3 MUC5AC und MUC5B Antikörper.....	15
2.4 Western Blot.....	16
2.5 Interne Kontrolle.....	17
2.6 Herstellung von "cigarette smoke condensate" (CSC).....	18
2.7 Mucinabbau <i>in vitro</i> und Beeinflussung durch verschiedene Faktoren.....	18
2.8 ELISA.....	20
2.9 Statistische Auswertung.....	21

3. Ergebnisse

3.1 Mucinkonzentration bei exazerbierter und nicht-exazerbierter COPD.....	22
3.2 Abbau von Mucinen (<i>in vitro</i>).....	23
3.3 Beeinflussung des Mucinabbaus <i>in vitro</i> durch verschiedene Faktoren.....	25
3.3.1 Beeinflussung durch Proteaseinhibitoren.....	25
3.3.2 Beeinflussung durch synthetische Serinproteasen.....	26
3.3.3 Beeinflussung durch Zigarettenrauch.....	28
3.3.4 Beeinflussung durch den pH-Wert.....	30

4. Diskussion

4.1 Mucinkonzentration im Verlauf einer COPD-Exazerbation.....	31
4.2 Postsekretorische Einflüsse.....	32
4.2.1 Mucinabbau.....	32
4.2.2 Proteasen- /Antiproteasen-Gleichgewicht.....	33
4.2.3 Einfluss von Zigarettenrauch.....	35
4.3 Möglicher Ansatz für Therapieoptionen.....	37

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung.....	38
5.2 Englische Zusammenfassung.....	40

6. Literaturverzeichnis.....42

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	48
7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	50
7.3 Danksagung.....	51

1. Einleitung

1.1 COPD

1.1.1 Allgemeines

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) gehört weltweit zu den häufigsten Lungenerkrankungen (14) und steht laut Statistischem Bundesamt mit 3,2 % auf Platz 5 der Liste der häufigsten Todesursachen in Deutschland 2013 (60).

Im Rahmen der BOLD-Studie wurde die weltweite Prävalenz mit 10,1 % angegeben und es konnte gezeigt werden, dass aufgrund steigender Lebenserwartung und Änderungen im Zigaretten-Konsumverhalten mit einer weiteren deutlichen Zunahme der Erkrankungshäufigkeit zu rechnen ist (9).

Die "*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*" (*GOLD*) definiert die COPD als eine Erkrankung, die durch persistierend erhöhten Atemwegswiderstand und eine verstärkte chronische Entzündungsreaktion der Bronchien auf exogene Noxen charakterisiert ist, die letztlich zu einer strukturellen Schädigung der Luftwege führt (30,69).

Die wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten einer COPD sind regelmäßiger Zigarettenkonsum und das Alter; daneben sind auch Heizen mit Brennstoff aus Biomasse, (berufliche) Feinstaub-Exposition und Tuberkulose weitere Faktoren, die gerade in den Entwicklungsländern eine entscheidende Rolle spielen (9). Diskutiert wird derzeit, inwieweit genetische Faktoren eine ursächliche Rolle bei der Entstehung einer COPD spielen. Als gesichert gelten in dieser Beziehung ein α 1-Antitrypsin-Mangel und bestimmte Antikörpermangelsyndrome (43,68).

Klinisch unterscheidet man zwei Formen der Erkrankung: die stabile COPD (stable disease, nicht-exazerbierte COPD) und die exazerbierte COPD. Typischerweise kommt es im Erkrankungsverlauf immer wieder zu Exazerbationen, die definiert sind als eine akute Verschlechterung der Symptomatik über das übliche Maß der täglichen Schwankungen hinaus. Die Häufigkeit des Auftretens dieser Exazerbationen ist interindividuell sehr unterschiedlich und hängt unter anderem von der Schwere der Erkrankung, von Exposition gegenüber Noxen und vom Vorhandensein von Komorbiditäten ab (13). Klinische Leitsymptome einer Exazerbation sind eine Zunahme von Husten und Dyspnoe, eine Zunahme von Sputummenge und -viskosität und eine erhöhte Prurulenz des Sputums (Definition entsprechend der Anthonisen-Kriterien) (5). Ursächlich kommen bakterielle oder virale Infektionen infrage, wobei

auch Exazerbationen ohne das Vorhandensein entsprechender Erreger möglich sind (13,46).

1.1.2 Pathophysiologie

Ursachen für die Entstehung einer COPD sind exogene Noxen, die über einen langen Expositionszeitraum zu einer chronischen Entzündungsreaktion und letztlich zu einer dauerhaften strukturellen Schädigung des Lungengewebes führen, wobei die weitaus häufigste und am besten erforschte Noxe Zigarettenrauch darstellt (69).

In der Lunge stehen verschiedene Abwehrmechanismen zur Verfügung: Die mukoziliäre Clearance, die Barrierefunktion des Lungenepithels, weitere zelluläre Komponenten des unspezifischen Immunsystems (Granulozyten, Makrophagen) und die antikörpervermittelte spezifische Immunantwort. Durch chronische Noxen-Exposition, wie sie zum Beispiel bei Rauchern vorliegt, kommt es immer wieder zu Epithelschäden, die ihrerseits eine dauerhafte Aktivierung vor allem des zellulären Anteils der Immunmechanismen zur Folge haben. Man geht davon aus, dass dadurch - vermittelt über Cytokine (z.B. TGF- β) - Remodelling-Vorgänge in Gang gesetzt werden, die geschädigtes Gewebe reparieren sollen. Diese führen letztlich aber über die Stimulation der Zellproliferation zu einer erhöhten Wanddicke der Bronchien (vor allem über die Proliferation von Bindegewebe). In der Folge kommt es zu einer Lumeneinengung und somit zu einem erhöhten Widerstand in den Luftwegen, der charakteristisch für die COPD ist (34,35).

Hinzu kommt, dass Zigarettenrauch die mukoziliäre Clearance verringert und somit einen wichtigen Teil der unspezifischen Abwehrmechanismen hemmt, wodurch Noxen einfacher zum Epithel gelangen und dort Schäden verursachen können (78).

Die chronische Entzündungsreaktion führt außerdem - ebenfalls vermittelt über Cytokine - zu einer erhöhten Anzahl von Becherzellen und einer Vergrößerung der submukösen Drüsen, was dann zu einer gesteigerten Sekretion von Mukus führt und zusätzlich zur Lumeneinengung beiträgt (53,75).

Die durch erhöhte Wanddicke der Bronchien und Mukusakkumulation bedingte Lumeneinengung betrifft besonders die kleinen Luftwege (kleine Bronchien/Bronchiolen), da eine Verkleinerung des Radius einen exponentiellen Anstieg des Widerstandes in den Bronchien zur Folge hat und dort somit der größte Effekt erzielt wird (36).

Als weitere Ursache für den erhöhten Atemwegswiderstand gilt die durch den Verlust des alveolären Zusammenhaltes und Emphysembildung bedingte verminderte Elastizität der Lunge (7).

Die Tatsache, dass nicht bei allen Menschen eine chronische Exposition gegenüber den genannten Noxen auch zur Entstehung einer COPD führt, spricht dafür, dass noch andere und bisher unbekannte Faktoren das Auftreten der Erkrankung begünstigen. Hier kommen u.a. genetische Faktoren infrage, die zum Beispiel zu einer gegenüber der Normalbevölkerung verstärkten Entzündungsreaktion führen könnten (42,43,69).

1.1.3 Diagnostik

Das wichtigste Mittel zur Sicherung der Diagnose einer COPD bzw. zur Erfassung des klinischen Zustandes eines Patienten mit bekannter COPD ist neben Anamnese und der körperlichen Untersuchung eine Lungenfunktionsanalyse (i.d.R. eine Spirometrie), in der sich bei Vorliegen der Erkrankung eine Obstruktion der Atemwege zeigt (30).

Bei der Durchführung einer solchen Spirometrie finden jeweils zwei Messungen statt, eine vor und eine nach Gabe eines Bronchodilatators (β -2-Sympathomimetika, z.B. Salbutamol).

Als diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer obstruktiven Lungenerkrankung wird dabei der Quotient aus Einsekundenkapazität (FEV₁) und forcierter Vitalkapazität (FVC) verwendet. Er beschreibt den Anteil an der forcierten Vitalkapazität, den ein Mensch bei maximaler Inspiration innerhalb einer Sekunde ausatmen kann. Liegt nach Gabe eines Bronchodilatators ein Quotient $FEV_1/FVC < 0,7$ vor, zeigt dies eine nicht reversible Obstruktion und bestätigt die Diagnose COPD (17,69).

Anhand der Schwere der Obstruktion gemessen an der Einsekundenkapazität (FEV₁) lassen sich verschiedene Schweregrade (GOLD 1-4, siehe Tabelle 1) unterscheiden, die wiederum Vorhersagen bezüglich der Häufigkeit des Auftretens von Exazerbationen und dem Fortschreiten der Erkrankung ermöglichen (69). Lange Zeit erfolgte anhand der FEV₁ auch eine Einteilung in Krankheitsstadien (45), in den aktuellen GOLD-Richtlinien ist aber eine komplexere Einteilung etabliert, die zusätzliche Faktoren wie aktuelle Symptomatik und Exazerbationshäufigkeit mit einbezieht. Anhand dieser Faktoren erfolgt die Unterteilung in 4 Kategorien (A-D), die eine bessere Möglichkeit für Vorhersagen bezüglich der Exazerbationshäufigkeit, der Notwendigkeit einer Hospitalisierung und der Mortalität schaffen sollen (30,73).

Trotzdem bietet die Messung der FEV1 eine gute Möglichkeit, die Schwere der Beeinträchtigung zu objektivieren und wird daher auch in der vorliegenden Studie Verwendung finden.

Schweregrad	FEV1/FVC (in % des Sollwertes)	FEV1 (in % des Sollwertes)	Obstruktionsgrad
GOLD 1	< 70 %	> 79 %	mild
GOLD 2	< 70 %	50 - 79 %	moderat
GOLD 3	< 70 %	30 - 49 %	schwer
GOLD 4	< 70 %	< 30 %	sehr schwer

Tabelle 1: Schweregrade nach GOLD

In einigen älteren Studien wird zusätzlich ein Stadium GOLD 0 verwendet, mit dem Patienten erfasst werden sollen, bei denen Risikofaktoren bzw. Symptome einer chronischen Bronchitis vorliegen, bei denen aber noch kein erhöhter Atemwegswiderstand besteht. Diese Einteilung hat sich nicht allgemein etabliert, da sich gezeigt hat, dass damit keine suffiziente Erfassung einer Risikopopulation möglich ist (45,70).

Neben der nicht reversiblen Atemwegsobstruktion als notwendiges Kriterium orientiert sich die Diagnosestellung einer akuten COPD-Exazerbation entsprechend ihrer Definition (siehe 1.1.1) an der klinischen Symptomatik. Hier kommen unter anderem die Anthonisen-Kriterien (Zunahme von Husten und Dyspnoe, Zunahme von Sputummenge und -viskosität, erhöhte Prurulenz des Sputums) zur Anwendung, die als Kardinalsymptome einer akuten Exazerbation gelten (5). Daneben gibt es weitere typische Symptome wie eine Infektion der oberen Luftwege innerhalb der letzten 5 Tage, Fieber oder ein 20%iger Anstieg von Atem- oder Herzfrequenz gegenüber dem Normalwert, die bei Vorliegen von nur einem der Kardinalsymptome die Diagnose einer akuten Exazerbation unterstützen (57).

1.1.4 Therapie

Die Therapie von COPD-Patienten gründet sich auf 2 wichtige Säulen: Zum einen sollen akut Symptome wie Husten und Dyspnoe gelindert werden, zum anderen soll ein Fortschreiten der Erkrankung möglichst langfristig verhindert bzw. verzögert werden (69).

Pharmakologisch stehen für die Therapie in erster Linie β 2-Sympathomimetika, Anticholinergika und Steroide zur Verfügung.

Die Bronchodilatoren (β 2-Sympathomimetika und Anticholinergika) sind jeweils in lang- und kurzwirksamer Form verfügbar und es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine langfristige Therapie mit diesen Substanzen effektiv in der Prävention von Exazerbationen ist, wobei mit den langwirksamen Formen insgesamt bessere Ergebnisse erzielt werden konnten (6,38,72). Neben der Prävention spielen die Bronchodilatoren auch eine Rolle bei der Symptomlinderung und sind somit auch wichtige Bestandteile der Therapie der akuten Exazerbation (13).

Für die Steroidtherapie konnte vor allem in Kombination mit einem langwirksamen Sympathomimetikum ein positiver Effekt auf Symptomkontrolle und Prävention von Exazerbationen gezeigt werden (10). Als Monotherapie bei milder bis moderater COPD konnte hingegen kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (71). Sie sollten daher nur in Kombination mit Bronchodilatoren und nicht als Monotherapie eingesetzt werden (69).

Wann Antibiotika in der Therapie der COPD zum Einsatz kommen sollen, wird kontrovers diskutiert (13), obwohl in den meisten aktuelleren Studien ein genereller positiver Effekt zumindest im Rahmen der Therapie von Exazerbationen beschrieben wird (2,5). Einigkeit besteht darin, dass bei Hinweis auf eine bakterielle Genese einer Exazerbation eine antibiotische Therapie eingeleitet werden sollte, die sich am jeweiligen lokalen Erregerspektrum orientiert (54).

Mukolytische Medikamente wie z.B. Acetylcystein haben derzeit nur einen geringen Stellenwert in der Therapie der COPD. Sie finden ihre Anwendung lediglich zur Symptomlinderung (69), obwohl einzelne Studien zumindest einen positiven Effekt auf die Häufigkeit des Auftretens von Exazerbationen zeigen konnten (66).

Neben den genannten pharmakologischen Therapieoptionen ist außerdem eine Minimierung der Exposition gegenüber Noxen entscheidend. Es konnte bei Rauchern gezeigt werden, dass ein Verzicht auf Zigarettenkonsum zu einer deutlich langsameren Verschlechterung der FEV1 führte als bei Rauchern, die den Konsum fortsetzten (4,50). Somit hat die Raucherentwöhnung einen hohen Stellenwert in der Therapie der COPD (20).

1.2 Mukus

1.2.1 Allgemeines

Der Mukus eines gesunden Menschen besteht aus Wasser, Elektrolyten, Lipiden, Peptiden und Glykoproteinen (Mucinen), wobei die Mucine neben dem Wasser, das den größten Anteil an der Zusammensetzung hat, die Hauptkomponenten darstellen (53).

Normalerweise bildet er auf der Oberfläche der Atemwegsepithelien eine Gelschicht, die im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr Partikel wie Fremdkörper, Bakterien und Viren bindet und über die Bewegung des Flimmerepithels der Atemwege abtransportiert (mukoziliäre Clearance). Der auf diese Weise nach oben transportierte Mukus wird entweder verschluckt oder - vor allem bei vermehrter Produktion im Rahmen von Entzündungen - als Sputum abgehustet (53,75).

Er spielt somit eine wichtige Rolle für die pulmonalen Abwehrmechanismen, sowohl im Rahmen der mukoziliären Clearance als auch durch generelle antimikrobiologische und antiproteatische Eigenschaften (75).

Mucine sind stark glykosylierte Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von $2-20 \times 10^5$ Da, die charakteristischerweise in ihrer Proteinstruktur eine große Anzahl von *tandem repeats* haben, die reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin sind. MucGene, von denen bisher über 20 bekannt sind, kodieren für die jeweilige mRNA, aus der ein Proteingerüst synthetisiert wird. Posttranslational kommt es zu einer großen Anzahl von z.T. variablen Glykosylierungen, die zur Vielfalt der Mucine beitragen (53).

Aufgrund der Molekülgröße und ihrer physikalischen Eigenschaften bestimmen sie maßgeblich sowohl die rheologischen Eigenschaften (Viskosität) als auch die Bindungsfähigkeit von Krankheitserregern im Mukus, so dass Veränderungen dieser Konzentration eine Verschlechterung der natürlichen Abwehrmechanismen zur Folge haben. Bezüglich der rheologischen Eigenschaften ist für den Mukus im menschlichen Cervikalkanal bekannt, dass sich Veränderungen der Mucinkonzentration mit der 3. Potenz auf die Viskosität auswirken (77). Es ist anzunehmen, dass eine vergleichbare Abhängigkeit auch für den Mukus der menschlichen Atemwege gilt (36,41).

Die wichtigsten Mucine im Mukus der Atemwege sind MUC5AC und MUC5B, wobei bei gesunden Menschen MUC5AC vor allem in den Becherzellen produziert wird, MUC5B dagegen eher in den submukösen Drüsen. Weitere im Epithel der Lunge vorkommende Mucine sind MUC2 und MUC6, deren Konzentration im Mukus aber eine eher untergeordnete Rolle spielt (40).

Bei den genannten Mucinen handelt es sich um sezernierte, den Mukus bildende Mucine, daneben gibt es weitere membranständige Vertreter, die im Sputum nur in Spuren nachweisbar sind (52).

1.2.2 Veränderungen von Mukus / Mucinen bei COPD

Allgemein ist das Sekret der Atemwege im Rahmen von Erkrankungen komplexer aufgebaut als bei Gesunden und wird dann als Sputum bezeichnet. Neben den Mucinen finden sich in größerer Anzahl weitere Makromoleküle, wie zum Beispiel DNA und Actin, aber auch Entzündungszellen und Debris, die die rheologischen Eigenschaften mitbestimmen. (64)

Wie bereits erwähnt, bewirken Entzündungsreize in der Lunge, dass der Anteil von Becherzellen und submukösen Drüsen in der Epithelschicht der Atemwege zunimmt, was wiederum zu einer erhöhten Produktion von Sputum führt (53).

Aus verschiedenen Publikationen ist inzwischen bekannt, dass pathogene Keime und Entzündungsmediatoren zu einer verstärkten Transkriptionsrate der MUC-Gene und damit zu einer vermehrten Produktion und Sekretion von Mucinen führen. So bewirken zum Beispiel TNF- α und IL-1 β eine Hochregulation der Transkriptionsrate von MUC5AC, während IL-6 und IL-17 die Transkriptionsrate der beiden wichtigen Mucine (MUC5AC und MUC5B) steigern (74,75).

Auch Zigarettenrauch als häufigste pathogene Noxe bei der COPD bewirkt über Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) eine vermehrte Produktion von MUC5AC (28).

Kirkham et al. konnten in mehreren Studien bestätigen, dass durch chronische Entzündungen wie COPD, aber auch CF (Cystische Fibrose), sowohl die Konzentration der einzelnen Mucine erhöht ist, als auch, dass sich die relative Zusammensetzung des Mukus aus den Mucinen verändert (relativ gesehen war die Konzentration von MUC5B stärker erhöht, als MUC5AC) (39,40).

Insgesamt kommt es durch den chronischen Entzündungsprozess bei der COPD also einerseits zu generell vermehrter Sputumproduktion, andererseits ist auch die Zusammensetzung verändert (veränderte Mucinkonzentrationen). Beide Prozesse tragen zu einer Mukusakkumulation in den Bronchien bei, wobei erschwerend hinzukommt, dass auch die mukoziliäre Clearance in ihrer Funktion herabgesetzt ist.

1.3 Proteasen- /Antiproteasen-Gleichgewicht in der Lunge

Physiologischerweise kommen in der Lunge verschiedene Proteasen und Antiproteasen vor, die vor allem von Entzündungszellen (Neutrophilen, Alveolarmakrophagen, Lymphozyten) sezerniert werden.

Zu den wichtigsten Proteasen gehören die Serinprotease HNE (humane Neutrophilenelastase), Metalloproteasen der ADAM-Familie (a disintegrin and metalloproteinase) und die Serinprotease HAT (Human airway trypsin-like protease). Daneben spielen auch noch die Serinproteasen Cathepsin G und Proteinase 3 eine Rolle (26).

Es ist bekannt, dass *in vitro* Entzündungsreize zu einer Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Proteasen führen. Betrachtet man als Beispiel die HNE, führen entsprechende Reize dazu, dass die Protease entweder in die Plasmamembran der Zelle integriert oder in den extrazellulären Raum sezerniert wird, wobei in der Lunge vor allem Letzteres der Fall ist. Zu den Funktionen der HNE gehören dann u.a. der Abbau von Bakterien, der Abbau verschiedenster Moleküle (z.B. Oberflächenrezeptoren, Zytokine, Chemokine usw.) und die Förderung der Freisetzung von Zytokinen. Außerdem fördert die HNE sowohl die Sekretion gespeicherter Mucine als auch die Transkriptionsrate von MUC5AC und hat somit einen ursächlichen Anteil an der erhöhten Mucinkonzentration im Rahmen von Entzündungen (26,59).

Auch Zigarettenrauch führt zu einer erhöhten Anzahl von Neutrophilen in der Lunge und steigert die Sekretion von HNE (1).

Allgemein trägt eine hohe Konzentration von Proteasen durch Abbau von Bindegewebe (v.a. Elastin) zur Emphysembildung der Lunge im Rahmen einer COPD bei (16,29).

Neben den Proteasen gibt es verschiedenen Antiproteasen, z.B. α_1 -Antitrypsin (AAT), Cystatin C, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases) usw., die die Proteasen in ihrer Aktivität hemmen. Bei lungengesunden Menschen besteht hier ein Gleichgewicht, das eine übermäßige Proteasenaktivität verhindert. Bei COPD-Erkrankten geht man dagegen von einem gestörten Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewicht aus. Eine der am besten untersuchten Antiproteasen ist hierbei AAT, ein suffizienter Inhibitor der HNE. Bekanntermaßen führt ein AAT-Mangel über eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der Proteasen zur Entstehung eines Lungenemphysems (1).

Auch bei COPD-Patienten ohne (genetisch bedingten) AAT-Mangel wird vermutet, dass eine erhöhte Proteasenaktivität vorliegt und den Fortschritt der Erkrankung (besonders die Emphysembildung) entscheidend beeinflusst. Die genauen ursächlichen Faktoren sind aber bisher nicht bekannt (58).

Einflüsse des veränderten Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewichtes auf die Mucinkonzentration sind bisher nur in wenigen Studien beschrieben. Für Lungenerkrankungen wie Asthma und die Cystische Fibrose (CF) konnte gezeigt werden, dass neben entzündungsbedingten Veränderungen der Produktions- und Sekretionsrate von Mucinen ein verändertes Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewicht auch postsekretorisch über Degradationsprozesse einen entscheidenden Einfluss auf die Mucinkonzentration in den Bronchien hat. So konnte zum Beispiel in einer Studie von Henke et al. für CF-Patienten mit *Pseudomonas-aeruginosa*-Infektion gezeigt werden, dass die Mucinkonzentration deutlich geringer ist als bei lungengesunden Menschen. Dies ist vermutlich auf eine erhöhte HNE-Aktivität zurückzuführen (32). Bei Asthma-Patienten dagegen konnte eine Hemmung des Mucinabbaus gezeigt werden, die zur Mukusakkumulation beiträgt (37).

Eine solche postsekretorische Beeinflussung der Mucine durch Proteasen oder Antiproteasen im Rahmen einer COPD ist bisher nicht hinreichend untersucht.

1.4 Fragestellung

Eine optimale Betreuung von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung stellt immer noch eine therapeutische Herausforderung dar, und es ist bisher nicht möglich bei betroffenen Patienten langfristig eine Verschlechterung der Lungenfunktion zu verhindern (69). Umso wichtiger erscheint es, ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge, die zur Entstehung dieser Erkrankung führen, zu erlangen, um letztlich neue Wege in der Diagnostik und Therapie zu eröffnen.

Es ist bereits bekannt, dass der für die COPD charakteristische erhöhte Atemwegswiderstand durch eine größere Wanddicke der Bronchien und durch Mukusakkumulation zustande kommt (34,35) und dass verschiedene Noxen über einer Steigerung der Produktions- und Sekretionsrate zu einer erhöhten Mucinkonzentration in den Bronchien führen (53).

In dieser Studie sollen zunächst die Unterschiede in der Mucinkonzentration der wichtigsten Mucine MUC5AC und MUC5B bei exazerbierter und bei nicht-exazerbierter COPD herausgearbeitet werden und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden.

Des Weiteren soll der Frage nachgegangen werden, ob neben den unter 1.2.2 beschriebenen Faktoren andere mögliche Ursachen für Mukusakkumulation infrage kommen. Denkbar wäre diesbezüglich eine postsekretorische Beeinflussung der Mucine. Entsprechende Einflüsse sind bei CF- und Asthma-Patienten bereits beschrieben (32,37), für COPD-Patienten ist diese Fragestellung aber bisher unbeantwortet.

Es soll daher über eine Untersuchung der Mucindegradation *in vitro* herausgearbeitet werden, inwieweit die Mucine auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung im Anschluss an die Sekretion innerhalb der Luftwege durch verschiedene Faktoren in ihrer Stabilität verändert werden. Dies könnte neben den bereits genannten Ursachen wie Steigerung der Produktions- und Sekretionsrate zu einer Mukusakkumulation in den Bronchien beitragen.

Als beeinflussende Faktoren kommen unter anderem die verschiedenen Proteasen und Antiproteasen der Lunge infrage, aber auch Zigarettenrauch, der als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung einer COPD gilt.

Diese Dissertation wird sich dabei auf die Untersuchung der Proteasen HNE und Cathepsin G und die Untersuchung von Zigarettenrauch als Einflussfaktor beschränken. Sie ist damit Teil der Studie " Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction ", die im Juli 2015 in der Fachzeitschrift "*Respiratory Research*" publiziert wurde (15). Darin wurden neben den hier genannten noch weitere Faktoren der postsekretorischen Beeinflussung untersucht, z.B. die Beeinflussung durch Antiproteasen wie AAT.

2. Material/Methoden

2.1 Patientenkollektiv/Probenakquisition

Die in die Studie eingeschlossenen Probanden waren Patienten, die zwischen Mai 2008 und März 2011 aufgrund einer akuten COPD-Exazerbation einen stationären oder ambulanten Aufenthalt in der Klinik für Pneumologie des Universitätsklinikums Marburg hatten.

Das Vorliegen einer solchen akuten COPD-Exazerbation wurde entsprechend der Anthonisen-Kriterien anhand folgender Symptome definiert: Zunahme von Dyspnoe und Husten, vermehrte Sputummenge und vermehrte Sputumpurulenz (5). Ein Einschluss in die Studie erfolgte, wenn mindestens 2 der genannten Symptome innerhalb der letzten 7 Tage vor Studienbeginn aufgetreten waren.

Des Weiteren wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen ein GOLD-Stadium 2 oder 3 vorlag ($FEV_1/VC < 70\%$, $FEV_1 30-80\%$).

Ausschlusskriterien waren klinische Zeichen einer bakteriellen Infektion (Fieber über $38,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, CRP-Erhöhung $> 30\text{ mg/l}$ oder Procalcitonin-Erhöhung $> 5\text{ }\mu\text{g/l}$), eine vorausgehende Antibiotikatherapie, das Vorliegen einer Pneumonie oder ein entsprechender Verdacht und das Vorliegen von Asthma bronchiale oder ein entsprechender Verdacht.

Zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie wurden die Patienten als "exazerbierte COPD" betrachtet. Es erfolgte die Entnahme einer Sputumprobe (siehe 2.2), eine Lungenfunktionsmessung, eine Blutentnahme zur Kontrolle der Infektparameter und ein Röntgenbild des Thorax.

Alle Probanden wurden 5-6 Wochen später zu einem Folgetermin einbestellt. Nach Rückgang der Symptomatik wurden sie zu diesem Zeitpunkt als "nicht-exazerbierte COPD" gewertet. Analog zum ersten Termin erfolgten auch hier Sputumsammlung, Lungenfunktionsanalyse und Blutentnahme.

Ursprünglich wurden 12 Patienten in die Studie eingeschlossen, von diesen konnten 9 über den gesamten Studienzeitraum beobachtet werden. 2 Patienten schieden aus, da die Datenerfassung unvollständig war und der Folgetermin nicht wahrgenommen wurde, 1 Patient konnte Sputum nicht in der für die Untersuchungen erforderlichen Menge abhusten.

Das mittlere Alter der Studienpatienten betrug 59,9 Jahre. Von den 9 eingeschlossenen Patienten waren 5 zum Zeitpunkt der Studie Raucher, die übrigen 4 hatten einen

früheren Nikotinkonsum von mindestens 20 Packyears in der Anamnese. Weitere klinische Daten sind in Tabelle 2 gegeben.

Als Kontrollgruppe wurde für die Studie Mukus von Patienten untersucht, bei denen ein nicht-thorakaler chirurgischer Eingriff unter Vollnarkose durchgeführt wurde (55,56). Die Proben wurden uns freundlicherweise von der Virginia Commonwealth University zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Patienten hatten zum Zeitpunkt der Narkose keine bekannten Lungenerkrankungen. In dieser Gruppe standen Proben von 11 Probanden zur Verfügung.

Patient	Alter	Pack-years	Raucher-status		Röntgen-Thorax (Infiltrationen?)	CRP in mg/l	Leukozyten in G/l (normal: 4,3-10)	Procalcitonin in µg/l	FEV1 (in % des Sollwertes)	FVC (in % des Sollwertes)	FEV1/FVC (in % des Sollwertes)	Sputumfarbe
01	51	80	Raucher	Termin 1	nein	<5	6,24	*	49	95	47	klar
				Termin 5		<5	7,05	*	58	94	55	klar
02	61	80	Ex- Raucher	Termin 1	nein	<5	8,28	0,22	63	95	66	klar bis gelblich
				Termin 5		14	8,14	0,17	67	95	70	klar
03	74	20	Ex- Raucher	Termin 1	unbekannt	29	7,25	*	59	88	67	klar
				Termin 5		18	6,64	*	81	95	86	klar
04	67	20	Ex- Raucher	Termin 1	nein	11	10,7	<0,1	48	89	53	klar bis gelblich
				Termin 5		*	*	*	42	98	43	klar
05	65	30	Ex- Raucher	Termin 1	nein	18	3,92	<0,1	68	98	69	klar
				Termin 5		<5	5,21	<0,1	95	98	97	klar
06	52	50	Raucher	Termin 1	nein	11	13	*	32	93	34	klar
				Termin 5		<5	9,15	*	74	98	75	klar
07	57	35	Raucher	Termin 1	nein	<5	5,89	*	37	91	41	klar
				Termin 5		*	*	*	58	90	64	klar
08	50	50	Raucher	Termin 1	nein	14	15,3	<0,1	36	93	39	klar
				Termin 5		24	15,3	<0,1	51	92	55	klar
09	62	70	Raucher	Termin 1	nein	7	8,5	*	56	89	63	klar bis gelblich
				Termin 5		<5	6,15	*	67	89	75	klar

Tabelle 2: Klinische Daten der Studienpatienten.

* Daten nicht erfasst

2.2 Sputumproben

Zur Gewinnung der Sputumproben wurden die Studienpatienten gebeten, das beim normalen Abhusten entstandene Sputum in einem Plastikgefäß zu sammeln. War das Abhusten einer solchen Probe den Patienten nicht möglich, wurde ein "Flutter" zur Hilfe genommen, der das Abhusten durch Erzeugung eines erhöhten Widerstandes in den Luftwegen beim Atmen erleichtert.

Der Mukus der Kontrollgruppe (Patienten ohne bekannte Lungenerkrankung in Vollnarkose, s.o.) wurde nach der Extubation durch Ausschaben aus dem jeweiligen Tubus gewonnen (endotracheal tube, nachfolgend ETT).

Alle Proben wurden unmittelbar nach Gewinnung tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.3 MUC5AC und MUC5B Antikörper

Die für die Detektion der Mucine verwendeten Antikörper wurden bereits im Vorfeld innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. M. Henke hergestellt (31) und freundlicherweise für die folgenden Versuche zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um polyklonale Antikörper aus Hasen-Serum mit hoher Spezifität gegen MUC5AC und MUC5B und entsprechend den Ausführungen unter 1.2 wurde die Untersuchung auf die Messung der Konzentrationen dieser beiden für die Pathophysiologie der COPD wichtigsten und auch am besten erforschten Mucine beschränkt (39,40,52).

2.4 Western Blot

Zur Bestimmung der Mucinkonzentration in den verschiedenen Sputumproben wurde ein Western Blot durchgeführt.

Die jeweiligen Proben und eine interne Kontrolle (siehe 2.5) wurden mit PBS verdünnt (wenn nicht anders angegeben in der Verdünnung 1:10) und dann mit Laemmli-Puffer, bestehend aus 125 mM Tris-Puffer (pH 6,8), 4 % SDS, 20 % Glycerol, 20 mM DTT und 0,001 % Bromphenolblau, gemischt.

Im Anschluss wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, dann wurde eine Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel bei Raumtemperatur zunächst 30 Minuten bei 60 V, dann für weitere 2,5 Stunden bei 100 V.

Die so aufgetrennten Proteine wurden dann auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (Transfer in 20 % TG-Puffer + Methanol bei 300 mA für 3 Stunden, Temperatur 4 °C).

Durch Inkubation der Membranen in 10%iger Milch in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden unspezifische Bindungen blockiert.

Im Anschluss wurden die Primärantikörper (MUC5AC 1:100 in PBS bzw. MUC5B 1:100 in PBS) zugefügt und die Membranen über Nacht (ca. 18 Stunden) bei 4 °C inkubiert.

Zur Entfernung nicht bzw. unspezifisch gebundener Primärantikörper wurden die Membranen 3mal für je 10 Minuten in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit) für 1 Stunde bei Raumtemperatur und ein erneutes 3maliges Waschen in PBS für jeweils 10 Minuten.

Im Anschluss wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (Femto-Developer-Kit) zugefügt und die Membranen auf Röntgenfilm dargestellt.

Zur weiteren Auswertung wurde der Röntgenfilm eingescannt und mithilfe von NIH Image Software eine Densitometrie durchgeführt. Dabei wurde innerhalb der jeweiligen Mucin-Bande ein Messfeld definiert, in dem mithilfe des genannten Programmes die Farbmenge pro Flächeninhalt gemessen wurde. Die Größe des Messfeldes blieb dabei über alle Untersuchungen konstant.

Geräte / Chemikalien	Hersteller
Agarose	Roth
TG-Puffer	Medicago
Glycerol	Bio-Rad
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Biozym
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Starlab
Heizblock	Roth
PBS-Trockensubstanz	Biochrom
SDS (Sodiumdodecylsulfat, 10 %)	Bio-Rad
Tischzentrifuge	Heraeus
Mikrowelle	Privileg
Gelkammer	Owl-Scientific
Spannungsquelle	Bio-Rad
Trockenmilchpulver	Merck Chemical
Transferkammer	LKB Bromma
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2µm)	Whatman
Methanol	Sigma-Aldrich
Schüttelmaschine	Heidolph
Sekundärantikörper (HRP-konjugiert, goat-anti-rabbit)	MP Biomedicals
SuperSignal West Femto Developer Kit	Pierce
Röntgenfilm	Pierce
Entwicklermaschine	MS Laborgeräte

2.5 Interne Kontrolle

Um verschiedene Blots miteinander vergleichen zu können, wurde eine interne Kontrolle eingerichtet, die in jedem Blot als "Standard" mitlief.

Das Sputum für die Kontrolle wurde in großer Menge von einem einzelnen Patienten gewonnen, bei dem aufgrund einer Brochiektasie eine Lungentransplantation durchgeführt wurde.

Für die Auswertung wurde die Sputum-Menge des Standards auf 100 % festgesetzt, die Angabe der Sputum-Mengen der untersuchten Proben erfolgt im Weiteren als "% des Standard", wenn nicht anders angegeben.

2.6 Herstellung von "cigarette smoke condensate" (CSC)

Zur Herstellung von CSC wurde Zigarettenrauch in PBS geleitet.

Dazu wurde eine Kammer mit 3 Öffnungen verwendet, in deren 1. Öffnung die entzündete Zigarette befestigt wurde. Über die 2. Öffnung wurde Frischluft zugeführt und an der 3. wurde ein Schlauchsystem mit Sog angebracht, über das der Rauch abgeleitet werden konnte.

Der Sog wurde so reguliert, dass jeweils 1 Zigarette innerhalb von 5 Minuten geraucht wurde. Der Rauch wurde durch eine Flüssigkeit (PBS) geleitet, deren Temperatur stabil bei 37 °C gehalten wurde. Um eine optimale Verteilung des Rauches in der Flüssigkeit zu ermöglichen, geschah das Durchleiten durch PBS unter kontinuierlichem Rühren.

Bei diesem Vorgehen entspricht 1 Zigarette in 10 ml Flüssigkeit = 10 %. Für die folgenden Versuche wurde ein CSC mit 40 Zigaretten in 20 ml PBS hergestellt (CSC40, entspricht 200 %) und durch Verdünnung mit PBS die weiteren Konzentrationen CSC20, CSC10 und CSC5 erzeugt.

Geräte / Chemikalien	Hersteller
PBS-Trockensubstanz	Biochrom
Zigaretten (Malboro long)	Philip Morris GmbH
Heiz- und Magnetrührer	Roth

2.7 Mucinabbau *in vitro* und Beeinflussung durch Proteasen, Proteaseinhibitoren und CSC

Für die Untersuchung der Mucindegradation *in vitro* wurden native Sputumproben von Patienten mit exazerbierter und nicht-exazerbierter COPD über verschiedene Zeiträume (0, 3, 6, 24, 48 und 72 Stunden) bei 37 °C inkubiert und im Anschluss an die jeweilige Inkubationszeit bis zur weiteren Analyse mittels Western Blot erneut bei -70 °C gelagert, um weitere Abbauprozesse zu stoppen. Als Kontrollgruppe wurden ETT-Proben verwendet, die ebenfalls über die oben genannten Zeiträume inkubiert wurden.

Um zu untersuchen, durch welche Faktoren eine Beeinflussung des Mucinabbaus *in vitro* möglich ist, wurden den Sputumproben vor Inkubation verschiedene Proteasen, Proteaseinhibitoren und CSC zugefügt.

Als Proteaseinhibitoren wurden die Serinprotease-Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP, 2 mM), Phenyl-methyl-sulfonylfluorid (PMSF, 2 mM) und Tosyllysin-chloromethyl-heptanon-hydrochlorid (TLCK, 10 mM), die Cysteinprotease-Inhibitoren Leupeptin (40 µM) und E64 (500 ng/ml) und die Metalloprotease-Inhibitoren EDTA (100 mM) und GM 6001 (40 µM) verwendet. Diese wurden zu Sputumproben von COPD-Patienten 5-6 Wochen nach stattgehabter Exazerbation zugefügt und für 24h bei 37 °C inkubiert.

Um den Einfluss synthetischer Proteasen auf den Mucinabbau zu untersuchen wurden HNE (0,02 mg/ml) und Cathepsin G (100 µU/ml) verwendet und zusammen mit Sputumproben von Patienten während einer Exazerbation über 6h inkubiert.

Schließlich wurde auch CSC in verschiedenen Konzentrationen (CSC40, CSC20, CSC15, CSC10 und CSC5) zu Sputumproben von COPD-Patienten 5-6 Wochen nach stattgehabter Exazerbation zugefügt und über 0, 24 und 36 Stunden inkubiert.

Ebenso wie die nativen Proben wurden auch die mit Proteasen, Proteaseinhibitoren oder CSC versetzten Proben nach Ende der Inkubationszeit bei -70 °C gelagert, bis eine Bestimmung der Mucinkonzentration mittels Western Blot erfolgen konnte.

Geräte / Chemikalien	Hersteller
PBS-Trockensubstanz	Biochrom
Inkubationskammer	Thermo Scientific Heraeus
DFP	Sigma
PMSF	Sigma
TLCK	Sigma
Leupeptin	Merck Chemical
E64	Sigma
EDTA	Sigma
GM 6001	Merck Chemical
Humane Neutrophilen-Elastase (HNE)	Merck Chemical
Cathepsin G	Merck Chemical

2.8 ELISA

Um eine direkte Beeinflussung der Aktivität synthetischer Enzyme (hier HNE und Cathepsin G der Firma Merck Millipore) durch CSC zu untersuchen, wurden Proben der Enzyme mit CSC in den Konzentrationen CSC10 und CSC5 versetzt und die spezifische Enzymaktivität wurde mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt.

Als Substrate wurden die jeweiligen enzymespezifischen chromogenetischen Substrate der gleichen Firma verwendet (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-Nitroanilid für HNE und Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid für Cathepsin G), deren enzymatische Umsetzung zu einem Farbumschlag von farblos nach gelb mit einer entsprechenden Zunahme der Absorption bei 410 nm führt, die mithilfe eines Photometers gemessen wurde. Die Absorptionzunahme pro Zeit ist dabei proportional zur Enzymaktivität.

Um eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Substratkonzentration zu minimieren, lag das jeweilige Substrat in 10fach höherer Konzentration vor als das Enzym.

Geräte / Chemikalien	Hersteller
Humane Neutrophilen-Elastase (HNE)	Merck Chemical
Cathepsin G	Merck Chemical
HNE-spezifisches chromogenetisches Substrat	Merck Chemical
Cathepsin-G-spezifisches chromogenetisches Substrat und Substratpuffer	Merck Chemical
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Biozym
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Starlab
Photometer	Tecan

2.9 Statistische Auswertung

In die Auswertung wurden nur die 9 über den gesamten Studienzeitraum beobachteten Patienten eingeschlossen (Complete Case Analyse).

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Als statistisches Verfahren zum Vergleich von Sputumproben aus der gleichen Gruppe ("exazerbierte COPD" und "nicht-exazerbierte COPD") wurde der zweiseitige t-Test verwendet, für Sputumproben aus verschiedenen Gruppen der Mann-Whitney-U-Test.

Bei den durchgeführten Post-hoc-Analysen wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Die gesamte Auswertung und graphische Darstellung wurde mithilfe von GraphPad Prism Software (San Diego, CA) durchgeführt.

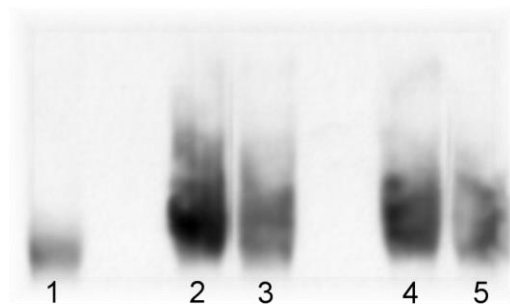
Für die statistische Auswertung der Studie wurden die gleichen Verfahren zu Grunde gelegt, wie sie auch in der Publikation "Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction" Verwendung fanden. Ein Teil der nachfolgenden Graphiken wurde in diesem Zusammenhang veröffentlicht (15).

3. Ergebnisse

3.1 Mucinkonzentration bei exazerbierter und nicht-exazerbierter COPD

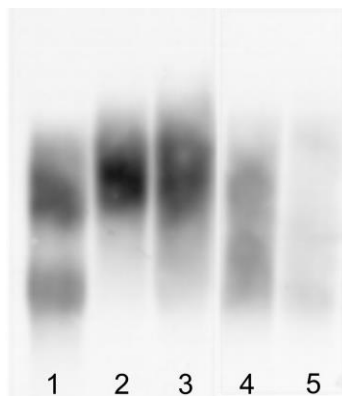
Wie oben beschrieben wurde im Rahmen der vorliegenden Studie Sputum von COPD-Patienten zu Beginn einer Exazerbation und 5-6 Wochen später gesammelt. Als Vergleich (Kontrollgruppe) standen 11 Sputumproben von Patienten ohne Lungenerkrankung zur Verfügung (ETT).

Zur Bestimmung der Konzentration der Mucine MUC5AC und MUC5B wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe Abbildung 1).



MUC5AC

- 1 - standard
- 2 - COPD-ex, patient 05
- 3 - COPD-follow, patient 05
- 4 - COPD-ex, patient 06
- 5 - COPD-follow, patient 06



MUC5B

- 1 - standard
- 2 - COPD-ex, patient 01
- 3 - COPD-follow, patient 01
- 4 - COPD-ex, patient 06
- 5 - COPD-follow, patient 06

Abbildung 1: Beispiel eines Western Blots von jeweils 2 repräsentativen Patienten mit Sputumproben vom Beginn einer COPD-Exazerbation (COPD-ex) und 5-6 Wochen später (COPD-follow); der Standard ist in jedem Western Blot als interne Kontrolle mitgelaufen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von MUC5AC zu Beginn einer Exazerbation fast doppelt so hoch ist wie bei nicht exazerbierter COPD. Auch bei MUC5B sieht man eine signifikant höhere Konzentration zu Beginn einer Exazerbation.

Vergleicht man MUC5AC und MUC5B mit der Kontrollgruppe ohne Lungenerkrankung, zeigt sich, dass vor allem die Konzentration von MUC5AC gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ist (5mal höher zu Beginn der Exazerbation und 3mal höher bei nicht exazerbierter COPD), während die Konzentration von MUC5B im Rahmen einer COPD nur moderat höher ist als in der Kontrollgruppe (fast doppelt so hoch zu Beginn einer Exazerbation, bei nicht exazerbierter COPD nicht mehr signifikant erhöht).

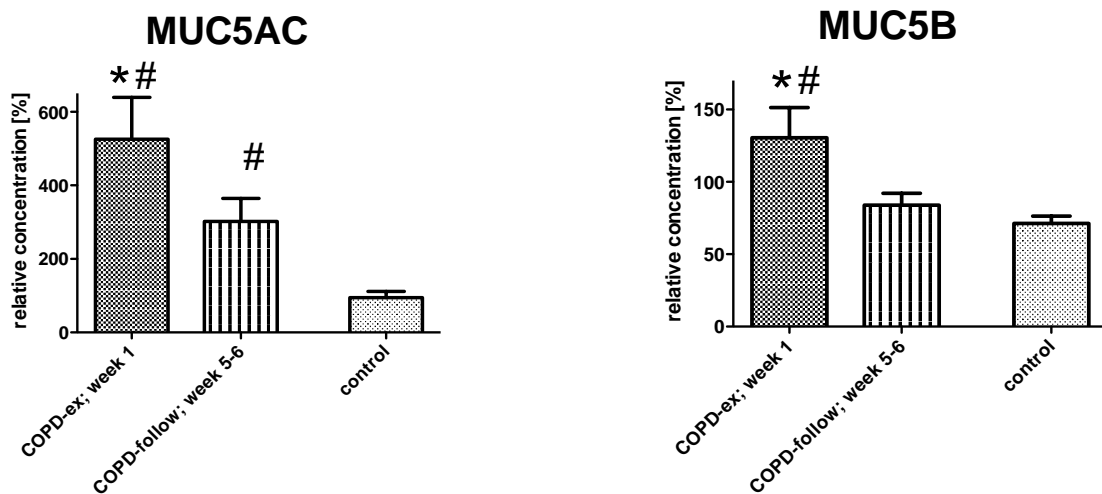


Abbildung 2: Mucinkonzentration im Sputum

Dargestellt ist die jeweilige Mucinkonzentration von exazerbierter COPD (COPD-ex), nicht exazerbierter COPD (COPD-follow) und Kontrollgruppe (control) als Prozent des Standards (relativen Konzentration von 100 %);

* signifikant erhöht gegenüber nicht exazerbierter COPD (COPD-follow);

signifikant erhöht gegenüber Kontrollgruppe (control, ETT).

3.2 Abbau von Mucinen (*in vitro*)

Ziel dieser Versuchsreihe war es, eine postsekretorische Beeinflussung der Mucinkonzentration durch im Mukus befindliche Faktoren bei exazerbierter und nicht-exazerbierter COPD zu untersuchen und zu vergleichen.

Dazu wurden Sputumproben von Patienten mit exazerbierter und mit nicht-exazerbierter COPD über verschiedene Zeiträume (0, 6, 24, 48 und 36 Stunden) bei 37 °C inkubiert, und die jeweilige Mucinkonzentration erneut mittels Western Blot bestimmt.

Um einen Vergleich zu Patienten ohne Lungenerkrankung zu haben, wurden außerdem ETT-Proben verwendet und ebenfalls über verschiedene Zeiträume inkubiert (0, 3, 6 und 24 Stunden).

Es zeigte sich, dass sowohl bei Sputum von COPD-Patienten ohne Exazerbation (COPD-follow) als auch bei den ETT-Proben nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ca. 40 % der Mucine abgebaut wurden. Im Gegensatz dazu fand bei den Sputumproben von COPD-Patienten mit Exazerbation (COPD-ex) im gleichen Inkubationszeitraum ein signifikant geringerer Abbau statt. Selbst nach bis zu 72 Stunden Inkubationszeit konnte für Proben von Patienten mit Exazerbation *in vitro* kein erkennbarer Abbau von MUC5B gezeigt werden, bei MUC5AC zeigte sich ein deutlich geringerer Abbau (ca. 30-40 % nach 72 Stunden, siehe Abbildung 3).

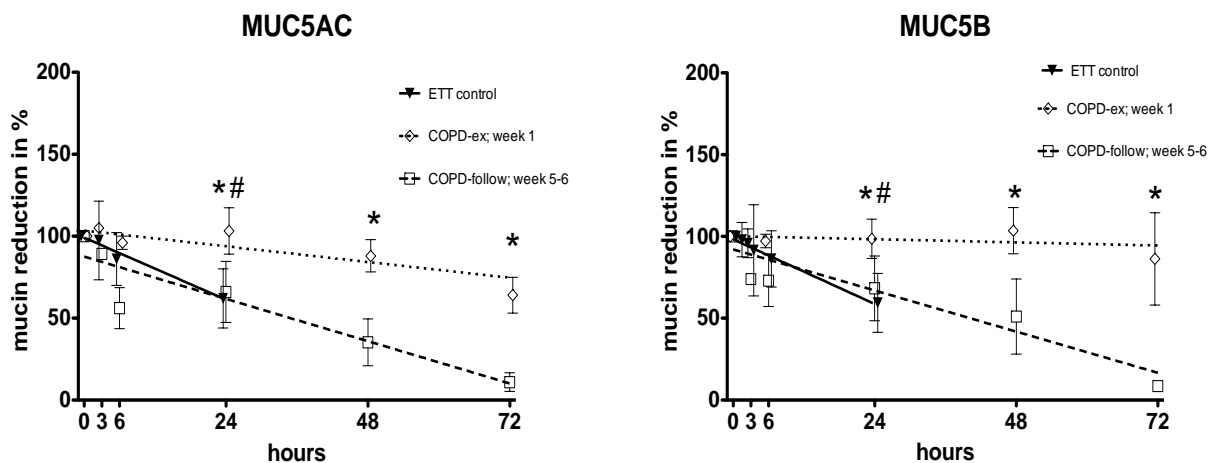


Abbildung 3: Mucinabbau *in vitro*

Dargestellt ist die jeweilige Mucinkonzentration in % des Standards in Abhängigkeit von der Inkubationszeit;

* signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen exazerbierter (COPD-ex) und nicht exazerbierter COPD (COPD-follow);

signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen exazerbierter COPD (COPD-ex) und Kontrollgruppe (control, ETT).

3.3 Beeinflussung des Mucinabbaus *in vitro* durch verschiedene Faktoren

3.3.1 Beeinflussung durch Proteaseinhibitoren

Um zu untersuchen, welche Proteasen im Sputum für den *in-vitro*-Abbau der Mucine verantwortlich sind, wurden Sputumproben von COPD-Patienten 5-6 Wochen nach stattgehabter Exazerbation nativ und zusammen mit verschiedenen Proteaseinhibitoren für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Mucinkonzentration erneut mittels Western Blot bestimmt.

In der nativen Probe zeigte sich, wie bereits unter 3.2 beschrieben, nach Inkubation eine deutlich geringere Mucinkonzentration als in der nicht inkubierten Probe (Reduktion der Mucinkonzentration um etwa 95 %).

Zur Inhibition des Abbaus wurden die Serinprotease-Inhibitoren (DFP, PMSF und TLCK), die Cysteinprotease-Inhibitoren (Leupeptin und E64) und die Metalloprotease-Inhibitoren (EDTA und GM 6001) verwendet, und es zeigte sich, dass die Degradation sowohl von MUC5AC als auch von MUC5B durch Zugabe von Serinprotease-Inhibitoren gehemmt werden konnte, nicht aber durch Zugabe von Metalloprotease- oder Cysteinprotease-Inhibitoren (siehe Abbildung 4).

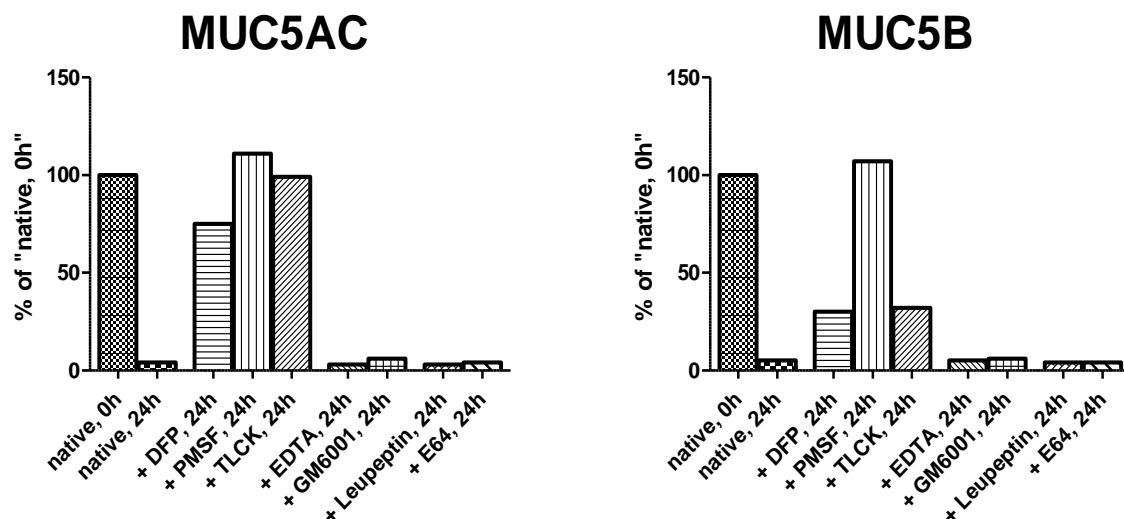


Abbildung 4: Hemmung des Mucinabbaus durch Proteaseinhibitoren

In der Auswertung wurde die Mucinkonzentration im nativen Sputum ohne Inkubation auf 100 % festgesetzt; die Angabe der Konzentrationen der inkubierten Proben erfolgt als %-Anteil der nativen, nicht-inkubierten Probe (native, 0 h); eine signifikante Hemmung zeigt sich nur nach Zugabe von Serinprotease-Inhibitoren.

Die effektivste Hemmung zeigte sich nach Zugabe von PMSF, das seine hemmende Wirkung durch irreversible Bindung an Serinproteasen entfaltet. Hier fand nach 24 Stunden Inkubationszeit keine erkennbarere Mucindegradation statt.

3.3.2 Beeinflussung durch synthetische Serinproteasen

Das nächste Ziel der Studie war es herauszufinden, ob in den Sputumproben von COPD-Patienten während einer Exazerbation (Woche 1), die in den vorangehenden Untersuchungen bei einer Inkubationszeit über 72h keinen nennenswerten Mucinabbau gezeigt hatten, ein solcher Abbau durch synthetische Proteasen erfolgen kann.

Dazu wurden die synthetischen Serinproteasen HNE (Humane Neutrophilen-Elastase) und Cathepsin G den entsprechenden Sputumproben zugefügt und über 6 h bei 37 °C inkubiert. Die Ermittlung der Mucinkonzentration erfolgte im Anschluss mittels Western Blot.

Die HNE lag in einer Ausgangskonzentration von 0,02 mg/ml vor, Cathepsin G in einer Konzentration von 100 µU/ml. Den Sputumproben zugefügt wurden sie jeweils in einer Verdünnung von 1:60 und 1:100.

Es zeigte sich ein dosisabhängiger Abbau sowohl durch HNE als auch durch Cathepsin G (siehe Abbildungen 5 und 6).

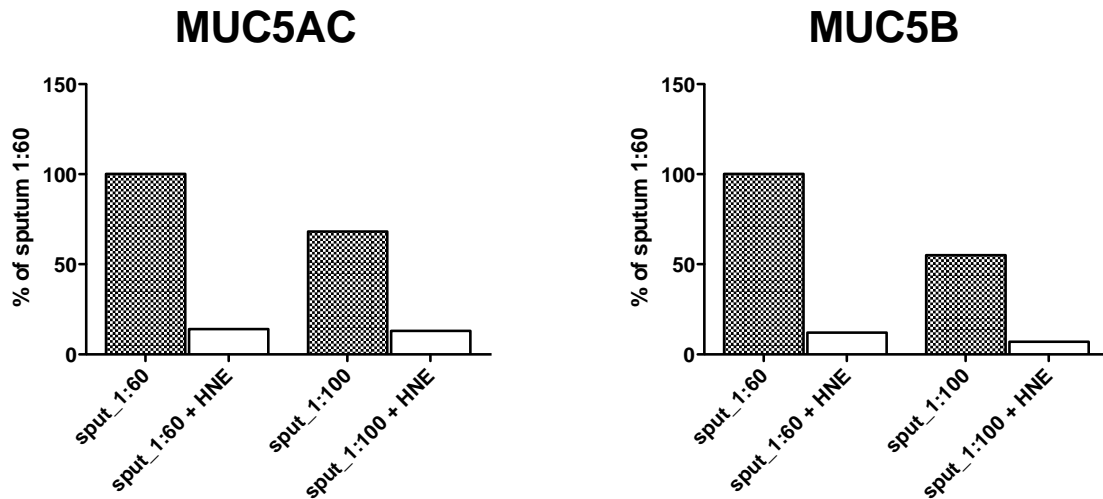


Abbildung 5: Mucinabbau durch HNE

Bei allen Proben erfolgte eine Inkubation über 6 h; für die Auswertung wurde die Mucinkonzentration im nativen und 1:60 verdünnten Sputum auf 100 % festgesetzt; die Angabe der Konzentrationen der übrigen Proben erfolgt als %-Anteil der nativen, 1:60 verdünnten Probe (sput_1:60); es zeigt sich ein signifikanter Mucinabbau durch HNE.

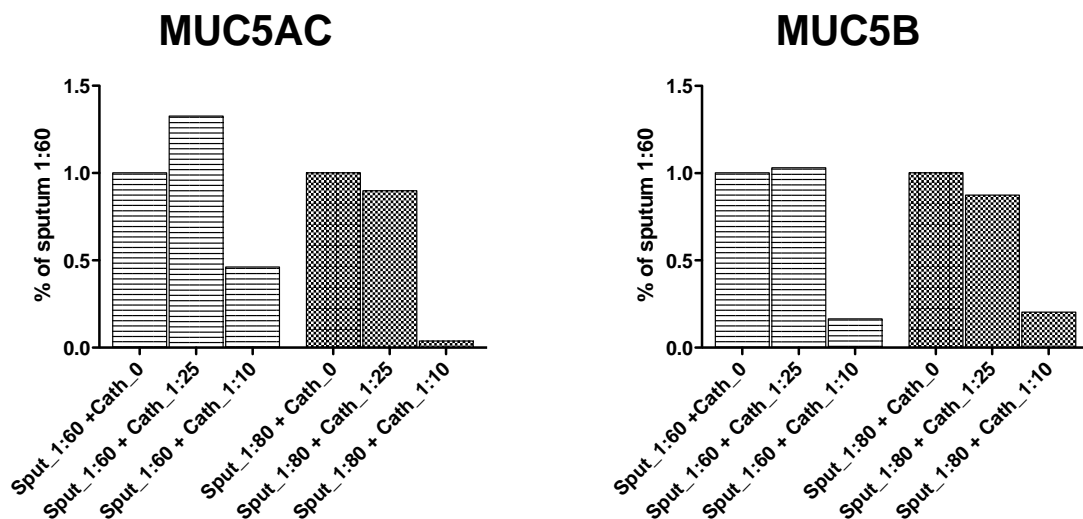


Abbildung 6: Mucinabbau durch Cathepsin G

Bei allen Proben erfolgte eine Inkubation über 6 h; für die Auswertung wurde die Mucinkonzentration im nativen und 1:60 verdünnten Sputum auf 100 % festgesetzt; die Angabe der Konzentrationen der übrigen Proben erfolgt als %-Anteil der nativen, 1:60 verdünnten Probe (sput_1:60 + Cath_0); es zeigt sich ein signifikanter, dosisabhängiger Mucinabbau durch Cathepsin G.

3.3.3 Beeinflussung durch Zigarettenrauch

Zigarettenrauch stellt eine der wichtigsten ursächlichen Noxen bei der Entstehung einer COPD dar.

Um eine mögliche Beeinflussung der Mucindegradation durch Zigarettenrauch zu untersuchen (als einen Faktor, der über eine Hemmung des Mucinabbaus zu einer erhöhten Mucinkonzentration führen könnte), wurden Sputumproben von Patienten nach Ablauf einer Exazerbation (COPD-follow), bei denen sich nativ ein deutlicher Mucinabbau nach Inkubation gezeigt hatte, mit CSC in unterschiedlichen Konzentrationen (CSC40 bis CSC5) versetzt und über verschiedene Zeiträume (0 h, 24 h und 36 h) bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Mucinkonzentration mittels Western Blot gemessen.

Es zeigte sich, dass sowohl der Abbau von MUC5AC als auch von MUC5B dosisabhängig durch Zufügen von CSC gehemmt werden konnte (siehe Abbildung 7).

Um auszuschließen, dass allein das Zufügen von CSC auch ohne Inkubation zur Messung einer höheren Mucinkonzentration im Western Blot führt, wurde auch Sputumproben ohne nachfolgende Inkubation CSC hinzugefügt. In diesen Proben hatte das CSC keinen signifikanten Einfluss auf die Mucinkonzentration.

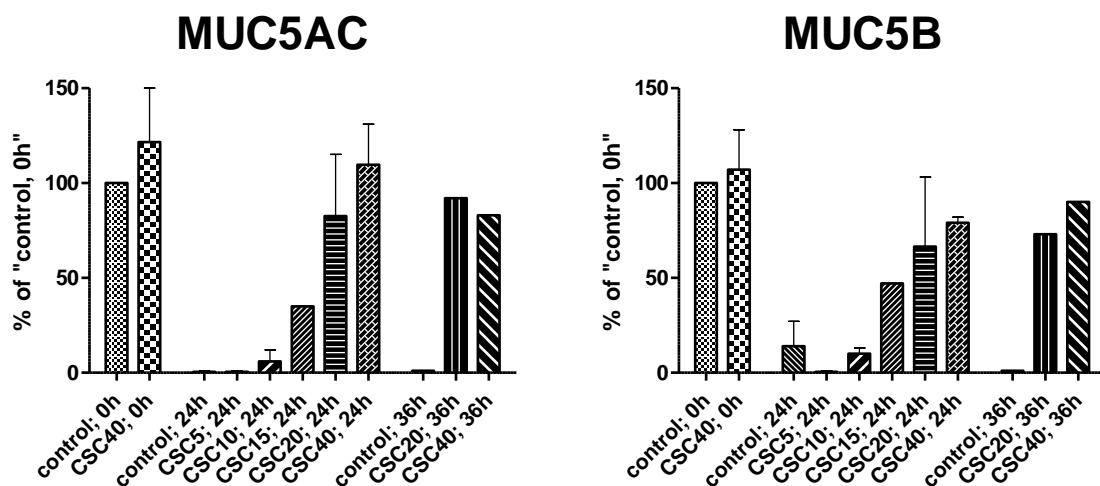


Abbildung 7: Beeinflussung des Mucinabbaus durch CSC

CSC40 entspricht 40 Zigaretten in 20 ml PBS (200 %), die übrigen Konzentrationen (CSC20-CSC5) wurden durch eine Verdünnungsreihe erzielt;

für die Auswertung wurde die Mucinkonzentration im nativen, nicht inkubierten Sputum auf 100 % festgesetzt; die Angabe der Konzentrationen der übrigen Proben erfolgt als %-Anteil dieser Probe (control; 0 h)

es zeigt sich eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der Mucindegradation durch CSC.

Nachdem in den vorangehenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass der Mucinabbau im Sputum durch Zugabe von CSC *in vitro* gehemmt werden kann, soll nun untersucht werden, ob auch die Aktivität einzelner Proteasen durch CSC beeinflussbar ist.

Dazu wurde CSC in verschiedenen Konzentrationen zu synthetisch hergestellten Serinproteasen zugefügt (HNE und Cathepsin G) und die Enzymaktivität mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurde die Enzymaktivität der jeweiligen Protease ohne Zugabe von CSC gemessen (control).

Auch hier zeigte sich sowohl für HNE als auch für Cathepsin G eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der Enzymaktivität durch CSC (siehe Abbildungen 8 und 9).

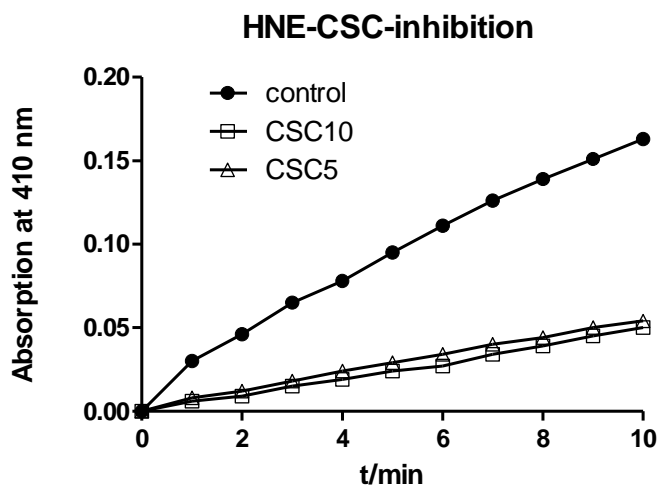


Abbildung 8: Beeinflussung der HNE-Aktivität durch CSC

Dargestellt ist die Absorption der Proben bei 410nm (als Maß für die Enzymaktivität) inklusive der Standardabweichung (maximal 0,004) in Abhängigkeit von der Zeit;

HNE lag in einer Konzentration von 0,33 µg/ml vor;

es zeigt sich eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der Enzymaktivität durch CSC.

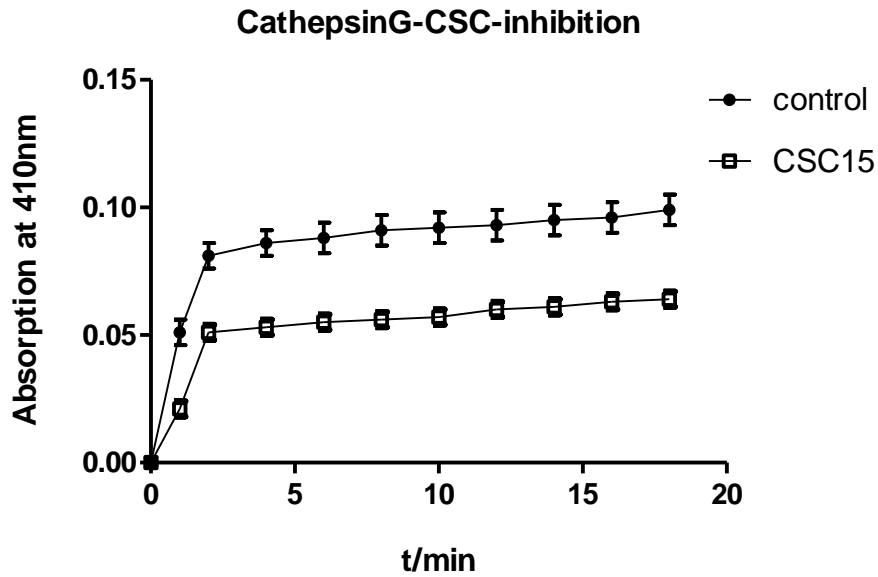


Abbildung 9: Beeinflussung der Cathepsin G-Aktivität durch CSC

Dargestellt ist die Absorption der Proben bei 410 nm (als Maß für die Enzymaktivität) inklusive der Standardabweichung in Abhängigkeit von der Zeit;

Cathepsin G lag in einer Konzentration von $1 \mu\text{U}/\mu\text{l}$ vor;

es zeigt sich eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität durch CSC.

3.3.4 Beeinflussung durch den pH-Wert

Es ist bekannt, dass durch Zigarettenrauch der pH-Wert innerhalb der Luftwege bzw. im Sputum reduziert wird.

Auch in dem *in vitro* erzeugten CSC zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Abfall des pH-Wertes. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von CSC40 lag der pH-Wert bei 6,0. Durch Verdünnen mit PBS zeigte sich ein Anstieg des pH-Wertes, so dass bei einer Konzentration von CSC5 ein pH-Wert von 7,0 erreicht wurde.

Um herauszufinden, ob die hemmende Eigenschaft von CSC allein über eine Veränderung des pH-Wertes zu erklären ist, wurden Sputumproben von Patienten zu Beginn einer COPD-Exazerbation (Woche 1) mit verschiedenen pH-Werten (5,5, 6,0, 6,5 und 7,0) über 6 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und die resultierende Mucinkonzentration gemessen. Die unterschiedlichen pH-Werte wurden durch Titrieren mit Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) erreicht.

Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss des pH-Wertes auf den Mucinabbau in den verwendeten Proben.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mucinkonzentration im Sputum von COPD-Patienten zum Zeitpunkt einer akuten COPD-Exazerbation erhöht ist sowohl gegenüber einer lungengesunden Kontrollgruppe als auch gegenüber denselben Patienten mit nicht-exazerbierter COPD. Es zeigten sich außerdem Hinweise darauf, dass als Ursache für diese Mukusakkumulation neben den bereits bekannten und in der Einführung beschriebenen Faktoren auch postsekretorische Einflüsse, die zu einem verminderten Mucinabbau führen, eine Rolle spielen.

Insgesamt muss kritisch angemerkt werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv relativ klein war und dass zur Untermauerung der hier gefundenen Ergebnisse weitere Untersuchungen an einer größeren Studienpopulation erfolgen sollten.

4.1 Mucinkonzentration im Verlauf einer COPD-Exazerbation

Wie erwartet und bereits aus anderen Studien bekannt (45), konnte bestätigt werden, dass die Mucinkonzentration bei COPD-Patienten deutlich erhöht ist gegenüber der lungengesunden Kontrollgruppe. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen, dass durch die chronische Entzündungsreaktion bei einer COPD vermehrt Cytokine ausgeschüttet werden, die über eine Erhöhung der Anzahl von Becherzellen und einer Vergrößerung der submukösen Drüsen zu vermehrter Mucinproduktion führen (53,75).

Abweichend zu einigen bisherigen Veröffentlichungen, zum Beispiel den Studien von Kirkham et al. (39,40), zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung vor allem eine deutliche Erhöhung von MUC5AC (sowohl bei exazerbierter als auch bei nicht-exazerbierter COPD), während MUC5B nur moderat erhöht war. Dies mag zum einen an der schwierigeren Detektion aller Varianten von MUC5B liegen (63,64), die sich stark in ihrem Glykosylierungsgrad unterscheiden, der wiederum Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Moleküle und möglicherweise auf die Bindungsfähigkeit des Antikörpers hat. Zum anderen könnte die Wahl der Kontrollgruppe einen Störfaktor darstellen. Hier sei vor allem auf die Problematik der Sputumsammlung hingewiesen, da Patienten, die lungengesund sind, normalerweise auch keinen solchen produzieren.

Aufgrund der Tatsache, dass vielfach gezeigt werden konnte, dass Zigarettenrauch als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung einer COPD einen steigernden Effekt auf

die Transkription und Sekretion von MUC5AC hat (21,28), erscheint eine erhöhte Konzentration dieses Mucins aber durchaus nachvollziehbar, zumal über die Hälfte der in die Studie eingeschlossenen Patienten zum Studienzeitpunkt aktive Raucher waren und die übrigen zumindest einen früheren, langjährigen Nikotinkonsum zu verzeichnen hatten.

Einigkeit besteht in allen genannten Studien darin, dass die Gesamtmucinkonzentration erhöht ist.

Vergleicht man die Mucinkonzentrationen von exazerbierter und nicht-exazerbierter COPD, so zeigt sich eine deutlich erhöhte Konzentration sowohl von MUC5AC als auch von MUC5B zum Zeitpunkt der Exazerbation. In den bisher aus der Literatur bekannten Studien zur Bestimmung der Mucinkonzentration ist eine solche Unterscheidung zwischen exazerbierter und nicht-exazerbierter Form der COPD nicht durchgeführt worden. Die Ergebnisse entsprechen aber insoweit ebenfalls den Erwartungen, als dass Entzündungsreize zur Mucinüberproduktion führen und eben diese Entzündungsreize im Rahmen von Exazerbationen verstärkt sind (49). Die ausgelöste Mukusakkumulation wird als wichtige pathogenetische Komponente für den im Rahmen der Exazerbation erhöhten Atemwegswiderstand angesehen (53).

4.2 Postsekretorische Einflüsse

4.2.1 Mucinabbau

Als ursächlich für die Mukusakkumulation bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung sind die Theorien der gesteigerten Sekretion und Produktion von Mucinen etabliert (51,53).

Mit dem Ziel auch eine mögliche postsekretorische Beeinflussung der Mucinkonzentration zu bestätigen, die neben den genannten Ursachen zur Akkumulation der Mucine beitragen könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Mucinabbau *in vitro* untersucht.

Es zeigt sich zunächst, dass die nach Inkubation bei Körpertemperatur beobachtete Degradation der Mucine bei nicht-exazerbierter COPD schneller erfolgte als bei exazerbierter COPD. Es muss angenommen werden, dass bestimmte im Rahmen einer

Exazerbation im Sputum vorkommende Faktoren den Abbau der Mucine hemmen oder die Konzentration der Faktoren, die die Mucine abbauen, geringer ist.

Physiologischerweise kommen in der Lunge verschiedene Proteasen (Serin- und Metallo-Proteasen) vor, die potentiell für den Mucinabbau verantwortlich sind (26). Gerade die relativ gut erforschte humane Neutrophileneelastase kann ein breites Spektrum von Proteinen abbauen, wozu neben Elastin, Fibronectin und Kollagen auch die Mucine als mögliche Substrate zählen (18,32). Ein Gegengewicht dazu bilden die Antiproteasen, die die Proteasen in ihrer Aktivität hemmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *in vitro* eine Degradation der Mucine durch Zugabe von Serinproteaseinhibitoren gehemmt werden konnte, während durch Metallo- und Cysteinproteaseinhibitoren keine Inhibition möglich war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Untersuchung der Proteasen-Wirkung auf die Serinproteasen beschränkt. Hier zeigte sich, dass eine Beschleunigung des Abbaus der Mucine durch Zugabe der Serinproteasen HNE und Cathepsin G möglich ist und es ist anzunehmen, dass diese Vorgänge in ähnlicher Weise auch in der menschlichen Lunge ablaufen. Die Mucinkonzentration hängt somit auch von der Konzentration und Aktivität der Proteasen und Antiproteasen ab. Wie oben erwähnt konnte Ähnliches bereits für CF- und Asthma-Patienten gezeigt werden (32,37).

Insgesamt bestätigt sich die Theorie, dass die Mucinkonzentration auch bei COPD-Patienten durch Proteasen postsekretorisch verändert werden kann und entsprechende Einflüsse neben den bereits bekannten Ursachen zu der erhöhten Mucinkonzentration bei einer COPD beitragen könnten.

Als mögliche Ursache für den im Rahmen einer Exazerbation verlangsamten Mucinabbau kommt also u.a. ein verändertes Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewicht infrage. Daneben muss aber auch die Anwesenheit anderer Faktoren mit hemmender Eigenschaft auf die Proteasen im Sputum in Erwägung gezogen werden. Im Weiteren sollen diese möglichen Ursachen näher betrachtet werden.

4.2.2 Proteasen-/Antiproteasen- Gleichgewicht

Generell ist ein verändertes Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewicht als pathogenetischer Faktor bei vielen Lungenerkrankungen akzeptiert (18). Dabei konzentrierte sich die Forschung bisher eher auf den Beitrag an der Entstehung eines

Emphysems oder einer Fibrose durch gesteigerten Abbau von Proteinen des Bindegewebes wie Elastin und Kollagen (62) bzw. auf das Fortschreiten einer pulmonalen Erkrankung durch gesteigerte Mucinproduktion und -sekretion (24). Die postsekretorischen Einflüsse des veränderten Gleichgewichtes auf die Mucinkonzentration durch gesteigerten oder verminderten Abbau wurden dabei bislang nur wenig untersucht.

Betrachtet man die Proteasen und Antiproteasen nun als einen solchen Einflussfaktor auf die Mucinkonzentration und berücksichtigt man die Erkenntnisse, dass sowohl Entzündungsmediatoren als auch Zigarettenrauch die Freisetzung von Proteasen steigern, würde man auch eine gesteigerte Mucindegradation zu Beginn einer Exazerbation erwarten (1,26).

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte das Gegenteil, nämlich eine Hemmung der Degradation zu Beginn einer Exazerbation gezeigt werden, während bei nicht-exazerbierter COPD *in vitro* ein relativ schneller Abbau der Mucine stattfand.

Als eine mögliche Ursache für diese verminderte Proteasenaktivität kann diskutiert werden, dass bei den eingeschlossenen Patienten im Vergleich zu anderen Studienkollektiven keine bakterielle Entzündung vorlag (siehe Ausschlusskriterien). Man weiß, dass nur etwa die Hälfte der pulmonalen Exazerbationen durch Bakterien oder Viren ausgelöst sind und die übrigen eher durch inhalierte Noxen (Luftverschmutzung, Zigarettenrauch) (76). Die Anwesenheit von Bakterien und infolgedessen gesteigerte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren trägt aber entscheidend zur Freisetzung von Proteasen bei (26), so dass hier zwischen den die Exazerbation auslösenden Faktoren differenziert werden sollte.

Als weitere Ursache kommt eine verminderte Aktivität durch Bindung der Proteasen an DNA infrage. Bekanntermaßen ist sowohl bei CF- als auch bei COPD-Patienten die DNA-Konzentration im Sputum erhöht (47). Bei CF-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von HNE an DNA zu einer Downregulation der proteolytischen Aktivität des Enzyms führt (44).

Denkbar wäre außerdem eine Inhibition der Proteasen und damit auch der Mucindegradation durch einen Überschuss an Antiproteasen während einer Exazerbation. Ein Beispiel dafür ist AAT, zu dessen wichtigsten Funktionen eine Hemmung der HNE gehört (65). Hierbei ist bereits bekannt, dass die Konzentration

dieser Antiprotease bei COPD-Patienten signifikant erhöht ist gegenüber einer lungengesunden Kontrollgruppe (48).

Um die Theorie des veränderten Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewichtes als Ursache für die verminderte Mucindegradation zu Beginn einer Exazerbation weiter zu erhärten, müssten zusätzliche Untersuchungen erfolgen, u.a. die Bestimmung der Konzentration von Proteasen und Antiproteasen in den Sputumproben. Entsprechende Versuche sind im Rahmen der Studie "Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction" durchgeführt worden (15), sie sind aber nicht mehr Teil dieser Dissertation.

Eine weitere potentielle Ursache für die verminderte Mucindegradation zu Beginn einer Exazerbation ist die Anwesenheit weiterer Faktoren mit einem hemmenden Einfluss auf die Proteasenaktivität, wobei als ein möglicher Faktor Zigarettenrauch infrage kommt, der bekanntermaßen einer der wichtigsten Faktoren für die Pathogenese der COPD ist.

4.2.3 Einfluss von Zigarettenrauch

Bezüglich der Erforschung des Risikofaktors Zigarettenrauch in Hinblick auf seine pathogenetischen Einflüsse auf die Entstehung einer COPD ist in der Vergangenheit eine Vielzahl an Studien durchgeführt worden. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass er als Noxe die im Rahmen einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung auftretende chronische Entzündungsreaktion verstärkt (22), die mukoziliäre Clearance vermindert (78) und die Mucinproduktion und -sekretion steigert (28).

Auch ein möglicher Einfluss von Zigarettenrauch auf die Aktivität von Proteasen und Antiproteasen ist untersucht worden, wird aber bisher in der Literatur kontrovers diskutiert. So wurde in einigen Studien ein hemmender Einfluss auf Antiproteasen gefunden (25), andere Studien konnten dies dagegen nicht bestätigen und fanden keinen signifikanten Effekt (61). Dies legt nahe, dass die ablaufenden Vorgänge komplexer sind und möglicherweise weitere bisher nicht berücksichtigte Faktoren die Aktivität der genannten Enzyme beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch seine Wirkung nicht nur über eine Stimulation der Mukusproduktion entfaltet, sondern auch postsekretorisch durch eine Hemmung des Mucinabbaus. Das in den Versuchen verwendete CSC konnte *in vitro* sowohl isoliert die Aktivität der synthetischen Enzyme

HNE und Cathepsin G hemmen als auch generell in den Sputumproben eine Hemmung des Mucinabbaus herbeiführen.

Auf welche Weise die hemmende Wirkung von Zigarettenrauch zustande kommt, ist bisher nicht eindeutig geklärt worden.

Eine mögliche Erklärung würde eine Veränderung des pH-Wertes im Sputum durch den Zigarettenrauch bieten, da die meisten Enzyme, die im menschlichen Körper vorkommen, nur innerhalb eines relativ engen pH-Optimums effizient arbeiten (19). Auch das im Rahmen der Studie erzeugte CSC zeigte trotz der Verwendung von PBS als Puffer einen erniedrigten pH-Wert, wodurch theoretisch die Aktivität der Proteasen eingeschränkt sein könnte. Durch Wiederholung der Versuche bei einem ausgeglichenen pH-Wert von 7,0, bei denen sich weiterhin die hemmende Wirkung des CSC zeigte, konnte dies aber als möglicher ursächlicher Faktor ausgeschlossen werden. Bekannt ist, dass eine Vielzahl der negativen Effekte von Zigarettenrauch dadurch ausgelöst werden, dass er zum einen eine große Anzahl an Oxidanzien enthält und zum anderen über Entzündungsreize zur Entstehung freier Radikale führt und damit insgesamt zu großem oxidativen Stress (8,23). Carp et al. konnten einen hemmenden Effekt von Zigarettenrauch auf das Enzym Alpha-1-Antitrypsin durch Oxidation von Methionin-Gruppen zeigen (11). Denkbar wären ähnliche Oxidationsprozesse von Aminosäureresten auch bei den Proteasen HNE und Cathepsin G, die zu einer Hemmung der Enzyme führen könnten.

Letztendlich handelt es sich bei Zigarettenrauch um ein komplexes Gemisch verschiedenster Moleküle mit ebenso komplexer Wirkung auf das menschliche Lungengewebe (33), was ein endgültiges Verstehen der pathogenetischen Vorgänge bei der Entstehung einer COPD umso schwieriger macht.

Klar ist aber nach wie vor, dass ein trotz Vorliegen einer COPD fortgesetzter Zigarettenkonsum das Fortschreiten der Erkrankung fördert und die Raucherentwöhnung somit ein entscheidender Faktor in der Therapie ist (20,67).

4.3 Möglicher Ansatz für Therapieoptionen

Die Erkenntnis, dass auch postsekretorische Einflüsse zu einer Mukusakkumulation in den Bronchien beitragen, legt nahe, dies auch therapeutisch zu nutzen und durch postsekretorische Beeinflussung mit dem Ziel eines vermehrten Mucinabbaus die Akkumulation zu vermindern.

Zur Verfügung stehen zum Beispiel Mukolytika, wobei die Rolle dieser Medikamente in der Therapie der COPD kontrovers diskutiert wird, da ein positiver Effekt entsprechender Medikamente (wie zum Beispiel Acetylcystein oder Carbocystein) auf die Lungenfunktion nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnte in wenigen Studien ein positiver Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens von Exazerbationen und eine Verbesserung der Funktion der kleinen Luftwege gezeigt werden (12,66). Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen dieser Arbeit, dass der Mucinabbau in den Bronchien vor allem im Rahmen von Exazerbationen beeinträchtigt ist, was den Einsatz solcher Medikamente gerade zur Akuttherapie sinnvoll erscheinen lässt.

Versucht man den für den Mucinabbau positiven Effekt der Proteasen zu nutzen, gerät man aufgrund der negativen Effekte eines Proteasenüberschusses schnell an eine Grenze. Aus Untersuchungen an CF-Patienten ist bekannt, dass bestimmte Infektionen zu einer erhöhten Konzentration bzw. Aktivität der HNE führen, die über Effekte wie einer Steigerung der Mucinsekretion, Schädigung des Lungenepithels und Emphysembildung zu einem Fortschreiten der Erkrankung beitragen (3). Auf der anderen Seite konnte zum Beispiel in der Studie von Gehring et al. auch gezeigt werden, dass ein völliges Ausschalten des Enzyms zwar die Mucinsekretion vermindert, nicht aber generell die Obstruktion der Bronchien durch Mucine (27).

Hier besteht weiterer Forschungsbedarf, um das komplexe Gleichgewicht der Proteasen und Antiproteasen besser zu verstehen und für therapeutische Zwecke nutzen zu können.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine Atemwegserkrankung mit hoher Prävalenz, die gekennzeichnet ist durch eine verstärkte Entzündungsreaktion der Lunge ausgelöst durch eine chronische Exposition gegenüber bestimmten Noxen, wobei Zigarettenrauch die wichtigste unter ihnen darstellt. Die chronische Exposition führt zu strukturellen Veränderungen der Lunge und es kommt zu einem irreversibel erhöhten Atemwegswiderstand, der charakteristisch für die Erkrankung ist.

Der erhöhte Widerstand ist zum einen bedingt durch die im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion auftretenden Remodelling-Vorgänge, die die Wanddicke der Bronchien erhöhen und zu Emphysembildung mit verminderter Elastizität der Lunge führen. Zum anderen kommt es durch Entzündungsreize zu einer erhöhten Mucinproduktion und -sekretion, die über Akkumulation des Mukus zu einer weiteren Lumeneinengung der Bronchien beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sputumproben untersucht, die von Patienten zum Zeitpunkt einer akuten nicht-bakteriellen Exazerbation einer COPD und 5-6 Wochen nach Exazerbation gewonnen wurden. Als Kontrolle dienten Proben von lungengesunden Patienten.

Es wurde zunächst die Konzentration der beiden im Sputum wichtigsten Mucine MUC5AC und MUC5B bei nicht-exazerbierter COPD, bei exazerbierter COPD und bei der gesunden Kontrollgruppe mittels Western Blot gemessen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von MUC5AC in den Bronchien bei Vorliegen einer COPD erhöht ist gegenüber lungengesunden Menschen. Zusätzlich zeigte sich auch eine Erhöhung der Konzentration dieses Mucins bei exazerbierter COPD verglichen mit nicht-exazerbierter COPD. Für MUC5B konnte eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe nur bei exazerbierter COPD nachgewiesen werden.

Als Ursache für die erhöhte Mucinkonzentration im Rahmen einer Exazerbation konnte neben den aus der Literatur bereits bekannten Faktoren auch die Vermutung einer postsekretorischen Beeinflussung der Mucine bestätigt werden. Bei der Untersuchung der Mucindegradation durch Inkubation der nativen Proben bei Körpertemperatur zeigte sich, dass der Abbau der Mucine durch die physiologischerweise im Sputum vorkommenden Proteasen bei exazerbierter COPD signifikant langsamer erfolgte als bei nicht-exazerbierter COPD. Außerdem zeigte sich, dass potentiell ein Abbau der Mucine

durch Zugabe synthetischer Serinproteasen zu den Sputumproben gefördert und durch Zugabe von Serinproteaseinhibitoren gehemmt werden kann. Ursächlich für die Unterschiede im Mucinabbau bei exazerbierter und nicht-exazerbierter COPD scheint also ein verändertes Proteasen-/Antiproteasen-Gleichgewicht in der Lunge zu sein, dass bei Vorliegen einer nicht-bakteriellen Exazerbation zugunsten der antiproteatischen Wirkung verschoben ist.

Als ein das Gleichgewicht beeinflussender Faktor kommt Zigarettenrauch infrage, für den in der Studie einen hemmender Einfluss auf die Proteasenaktivität gezeigt werden konnte. Für die entsprechenden Untersuchungen wurde *cigarette smoke condensate* (CSC) verwendet. Eine hemmende Wirkung zeigte sich dabei sowohl auf die mittels ELISA gemessene Aktivität synthetisch hergestellter Proteasen (HNE und Cathepsin G) als auch auf den Mucinabbau in den Sputumproben.

Zusammenfassend bestätigt sich die Theorie einer postsekretorischen Beeinflussung der Mucinkonzentration, die durch Hemmung des Abbaus der Mucine die Mukusakkumulation in den Bronchien verstärkt. In Kenntnis dieser Vorgänge sollte der Stellenwert mukolytischer Medikamente in der Therapie einer COPD weiter untersucht und ggf. neu bewertet werden.

Bezüglich des Zigarettenkonsums, dessen für den Krankheitsverlauf negative Wirkung auf die Mucinproduktion und -sekretion bereits bekannt ist, zeigen sich auch postsekretorisch negative Effekte auf den Mucinabbau, was die ohnehin etablierte Bedeutung der Raucherentwöhnung im Rahmen der Therapie weiter unterstützt.

5.2 Englische Zusammenfassung

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a lung disease with a high prevalence which is caused by an enhanced inflammatory response to chronic exposure to noxious particles or gases. The most important one among these noxious agents is cigarette smoke. The chronic inflammatory response leads to structural changes within the lung tissue causing persistent airflow limitation that is characteristic for COPD.

The increased airflow resistance is not only caused by airway remodelling due to chronic inflammatory response but also by increased mucin synthesis und secretion leading to a narrowing of the airway radius.

In this study, there were sputum samples taken from patients with an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and 5-6 weeks after the exacerbation. Those samples were compared to a control group of samples from patients without a known lung disease. In all three groups the concentration of the main mucins in the sputum (MUC5AC and MUC5B) was measured by western blot. It was shown that the concentration of MUC5AC was higher in patients with COPD than in patients without a lung disease. Furthermore it could also be shown that this mucin was higher concentrated in sputum collected at the time of exacerbation than in samples of non-exacerbated COPD. For MUC5B a significant higher concentration could only be shown in exacerbated COPD compared to the control group.

As a cause for this higher mucin concentration at the time of exacerbation there was found that in addition to the already known factors there is also a postsecretory influence on mucin concentration. Looking at the mucin degradation by incubating the sputum samples at body temperature, it was shown that the degradation process was significantly decreased in samples of exacerbated COPD than in those of non-exacerbated COPD. It was also found that *in vitro* it was possible to increase the degradation process by adding synthetic proteases like HNE or cathepsin G and to decrease the process by adding antiproteases.

The reason for the differences in the degradation rate seems to be an imbalance in the protease/antiprotease network that leads to an increased effect of antiproteases during an acute exacerbation of COPD.

One factor that could have influences on the balance of proteases and antiproteases in the airways is cigarette smoke. In this study, it was shown that cigarette smoke

condensate (CSC) could decrease the activity of synthetic serin proteases measured by ELISA as well as it could decrease the mucin degradation in the sputum samples.

In conclusion, the theory of a postsecretory modification of mucins that contributes to the mucus accumulation in the airways of COPD patients was supported by the described findings.

Putting this theory into consideration, the use of mucolytic agents in the therapy of COPD should be reconsidered.

Cigarette smoke, which is already known to have an increasing effect on mucin production and secretion, was now shown to have also negative effects on mucin degradation which supports the already well-established necessity of smoking cessation in the therapy of patients with COPD.

6. Literaturverzeichnis

1. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 361-7, 2008.
2. Allegra L, Blasi F, de BB, Cosentini R, Tarsia P. Antibiotic treatment and baseline severity of disease in acute exacerbations of chronic bronchitis: a re-evaluation of previously published data of a placebo-controlled randomized study. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 149-55, 2001.
3. Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, Stockley RA, Cole PJ. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 26-32, 1991.
4. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 675-9, 2002.
5. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 106: 196-204, 1987.
6. Appleton S, Poole P, Smith B, Veale A, Lasserson TJ, Chan MM. Long-acting beta2-agonists for poorly reversible chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD001104, 2006.
7. Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med* 350: 2635-7, 2004.
8. Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, Gea J, Barbera JA. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 477-88, 2010.
9. Buist AS, Vollmer WM, McBurnie MA. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 703-8, 2008.
10. Calverley PM, Boonsawat W, Cseke Z, Zhong N, Peterson S, Olsson H. Maintenance therapy with budesonide and formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 22: 912-9, 2003.
11. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 2041-5, 1982.
12. Cazzola M, Matera MG. N-acetylcysteine in COPD may be beneficial, but for whom? *Lancet Respir Med* 2: 166-7, 2014.

13. Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 29: 1224-38, 2007.
14. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, Miller BE, Bakke P, Calverley P, Coxson H, Crim C, Edwards LD, Lomas DA, Duvoix A, MacNee W, Rennard S, Silverman E, Vestbo J, Wouters E, Agusti A. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 1065-72, 2012.
15. Chillappagari S, Preuss J, Licht S, Muller C, Mahavadi P, Sarode G, Vogelmeier C, Guenther A, Nahrlich L, Rubin BK, Henke MO. Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction. *Respir Res* 16: 85, 2015.
16. Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med* 11: 153-9, 2005.
17. Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J. *Physiologie*. 4. Auflage ed. Urban & Fischer, p. 482-510, 2014.
18. Delacourt C, Herigault S, Delclaux C, Poncin A, Levame M, Harf A, Saudubray F, Lafuma C. Protection against acute lung injury by intravenous or intratracheal pretreatment with EPI-HNE-4, a new potent neutrophil elastase inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 290-7, 2002.
19. Dettmer U, Folkerts M, Kächler E, Sönnichsen A. Säure-Basen-Haushalt. In: *Intensivkurs Biochemie*. München: Elsevier, p. 300-304, 2005.
20. Devillier P, Salvator H, Roche N, Grassin-Delyle S, Naline E, Dorocant S, Neveu H. [Long-term treatment strategy in chronic obstructive pulmonary disease: How to change the course of the disease]. *Presse Med* 43: 1368-80, 2014.
21. Di YP, Zhao J, Harper R. Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1. *J Biol Chem* 287: 27948-58, 2012.
22. Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 6: 68, 2005.
23. Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking, emphysema, and damage to alpha 1-proteinase inhibitor. *Am J Physiol* 266: L593-L611, 1994.
24. Fahy JV, Schuster A, Ueki I, Boushey HA, Nadel JA. Mucus hypersecretion in bronchiectasis. The role of neutrophil proteases. *Am Rev Respir Dis* 146: 1430-3, 1992.
25. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 206: 1315-6, 1979.

26. Garcia-Verdugo I, Descamps D, Chignard M, Touqui L, Sallenave JM. Lung protease/anti-protease network and modulation of mucus production and surfactant activity. *Biochimie* 92: 1608-17, 2010.
27. Gehrig S, Duerr J, Weitnauer M, Wagner CJ, Graeber SY, Schatterny J, Hirtz S, Belaaouaj A, Dalpke AH, Schultz C, Mall MA. Lack of neutrophil elastase reduces inflammation, mucus hypersecretion, and emphysema, but not mucus obstruction, in mice with cystic fibrosis-like lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 189: 1082-92, 2014.
28. Gensch E, Gallup M, Sucher A, Li D, Gebremichael A, Lemjabbar H, Mengistab A, Dasari V, Hotchkiss J, Harkema J, Basbaum C. Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J Biol Chem* 279: 39085-93, 2004.
29. Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT, Downey GP. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G705-G717, 2001.
30. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2015. Global strategy for the diagnosis management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, updated 2015. <http://www.goldcopd.org/> . 2015.
Ref Type: Electronic Citation
31. Henke MO, John G, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 816-21, 2007.
32. Henke MO, John G, Rheineck C, Chillappagari S, Naehrlich L, Rubin BK. Serine proteases degrade airway mucins in cystic fibrosis. *Infect Immun* 79: 3438-44, 2011.
33. Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50: 307-64, 1997.
34. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364: 709-21, 2004.
35. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350: 2645-53, 2004.
36. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 278: 1355-60, 1968.
37. Innes AL, Carrington SD, Thornton DJ, Kirkham S, Rousseau K, Dougherty RH, Raymond WW, Caughey GH, Muller SJ, Fahy JV. Ex vivo sputum analysis reveals impairment of protease-dependent mucus degradation by plasma proteins in acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 203-10, 2009.

38. Johnson M, Rennard S. Alternative mechanisms for long-acting beta(2)-adrenergic agonists in COPD. *Chest* 120: 258-70, 2001.
39. Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ. MUC5B is the Major Mucin in the Gel-phase of Sputum in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008.
40. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J* 361: 537-46, 2002.
41. Litt M, Wolf DP, Khan MA. Functional aspects of mucus rheology. *Adv Exp Med Biol* 89: 191-201, 1977.
42. Malhotra R, Olsson H. Immunology, genetics and microbiota in the COPD pathophysiology: potential scope for patient stratification. *Expert Rev Respir Med* 1-7, 2015.
43. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1419-24, 2001.
44. Papayannopoulos V, Staab D, Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One* 6: e28526, 2011.
45. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1256-76, 2001.
46. Peacock JL, Anderson HR, Bremner SA, Marston L, Seemungal TA, Strachan DP, Wedzicha JA. Outdoor air pollution and respiratory health in patients with COPD. *Thorax* 66: 591-6, 2011.
47. Picot R, Das I, Reid L. Pus, deoxyribonucleic acid, and sputum viscosity. *Thorax* 33: 235-42, 1978.
48. Prinsen JH, Schweisfurth H, Rasche B, Breuer J. Comparison of three methods for the determination of serum alpha-1-antitrypsin in patients with pulmonary diseases. *Clin Physiol Biochem* 7: 198-202, 1989.
49. Ramos FL, Krahnke JS, Kim V. Clinical issues of mucus accumulation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 9: 139-50, 2014.
50. Rennard SI, Vestbo J. Natural histories of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 5: 878-83, 2008.
51. Rogers DF. The role of airway secretions in COPD: pathophysiology, epidemiology and pharmacotherapeutic options. *COPD* 2: 341-53, 2005.

52. Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 533-7, 2001.
53. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86: 245-78, 2006.
54. Rothberg MB, Pekow PS, Lahti M, Brody O, Skiest DJ, Lindenauer PK. Antibiotic therapy and treatment failure in patients hospitalized for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA* 303: 2035-42, 2010.
55. Rubin BK, Finegan B, Ramirez O, King M. General anesthesia does not alter the viscoelastic or transport properties of human respiratory mucus. *Chest* 98: 101-4, 1990.
56. Rubin BK, Ramirez O, Zayas JG, Finegan B, King M. Collection and analysis of respiratory mucus from subjects without lung disease. *Am Rev Respir Dis* 141: 1040-3, 1990.
57. Siddiqi A, Sethi S. Optimizing antibiotic selection in treating COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3: 31-44, 2008.
58. Snider GL. Understanding inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the process begins. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1045-6, 2003.
59. Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med* 40: 411-29, 1989.
60. Statistisches Bundesamt. Die 10 häufigsten Todesursachen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html> . 2013.
Ref Type: Electronic Citation
61. Stone PJ, Calore JD, McGowan SE, Bernardo J, Snider GL, Franzblau C. Functional alpha 1-protease inhibitor in the lower respiratory tract of cigarette smokers is not decreased. *Science* 221: 1187-9, 1983.
62. Tetley TD. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 48: 560-5, 1993.
63. Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule. *J Biol Chem* 272: 9561-6, 1997.
64. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu Rev Physiol* 70: 459-86, 2008.
65. Travis J, Owen M, George P, Carrell R, Rosenberg S, Hallewell RA, Barr PJ. Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human alpha 1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 260: 4384-9, 1985.

66. Tse HN, Tseng CZ. Update on the pathological processes, molecular biology, and clinical utility of N-acetylcysteine in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 9: 825-36, 2014.
67. Underner M, Perriot J, Peiffer G. [Smoking cessation in smokers with chronic obstructive pulmonary disease.]. *Rev Mal Respir* 31: 937-60, 2014.
68. Van't Wout EF, van SA, Lomas DA, Stolk J, Marciniak SJ, Hiemstra PS. Function of monocytes and monocyte-derived macrophages in alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2014.
69. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 347-65, 2013.
70. Vestbo J, Lange P. Can GOLD Stage 0 provide information of prognostic value in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 166: 329-32, 2002.
71. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 353: 1819-23, 1999.
72. Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, Schmidt H, Rutten-van Molken MP, Beeh KM, Rabe KF, Fabbri LM. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 364: 1093-103, 2011.
73. Vogelmeier C, Vestbo J. COPD assessment: I, II, III, IV and/or A, B, C, D. *Eur Respir J* 43: 949-50, 2014.
74. Voynow JA, Gendler SJ, Rose MC. Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 661-5, 2006.
75. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135: 505-12, 2009.
76. Wedzicha JA, Donaldson GC. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 48: 1204-13, 2003.
77. Wolf DP, Blasco L, Khan MA, Litt M. Human cervical mucus. I. Rheologic characteristics. *Fertil Steril* 28: 41-6, 1977.
78. Xavier RF, Ramos D, Ito JT, Rodrigues FM, Bertolini GN, Macchione M, de Toledo AC, Ramos EM. Effects of cigarette smoking intensity on the mucociliary clearance of active smokers. *Respiration* 86: 479-85, 2013.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AAT	α 1-Antitrypsin
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CF	Zystische Fibrose
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COPD-ex	exazerbierte COPD
COPD-follow	nicht-exazerbierte COPD
CRP	C-reaktives Protein
CSC	cigarette smoke condensate
Da	Dalton
DFP	Diisopropyl-fluorophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alii
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ETT	endotracheal tube
FEV1	Einsekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
h	Stunde
HAT	human airway trypsin-like protease
HNE	humane Neutrophilenelastase
i.d.R.	in der Regel
IL	Interleukin
l	Liter
M	molar
mA	Milliampere

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ROS	reactive oxygen species
SDS	sodium dodecyl sulfate / Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
TG-Puffer	Tris-Glycin-Puffer
TGF- β	transforming growth factor
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteases
TLCK	Tosyllysin-chloromethyl-heptanon-hydrochlorid
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
V	Volt
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μ g	Mikrogramm

7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine Akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Aumüller, Prof. Dr. Barth, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Bartsch, Prof. Dr. Baum, Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Bien, Prof. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Gerdes, Prof. Dr. Görg, Prof. Dr. Hasilik, Prof. Dr. Hertl, Prof. Dr. Hofmann, Prof. Dr. Klose, Prof. Dr. Koolmann, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Lill, Prof. Dr. Lohoff, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Maisch, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Dr. Mueller, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Plant, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Richter, Prof. Dr. Riße, Prof. Dr. Roehm, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Dr. Schofer, PD Dr. Schrader, Prof. Dr. Seitz, Prof. Dr. Steiniger, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Vogt, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner, PD Dr. Westermann, Prof. Dr. Wulf

7.3 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt folgenden Personen:

PD Dr. Markus Henke für die Bereitstellung eines interessanten Themas, die Bereitschaft meine Dissertation als Doktorvater zu betreuen, seinen steten Optimismus auch in scheinbar ausweglosen Situationen und seine uneingeschränkte Unterstützung;

Prof. Dr. Claus Vogelmeier für die Unterstützung der Arbeitsgruppe von Dr. Markus Henke am Biomedizinischen Forschungszentrum;

Dr. Shashi Chillappagari für die fachliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe;

Dr. Christina Rheineck für die Einarbeitung im Labor und die gute Zusammenarbeit;

meiner Familie und meinen Freunden für die emotionale Unterstützung.