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 des Atemwegsepithels als Sensor der angeborenen Immunität

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

Christian Hess
aus Kassel

Marburg, 2007

Angenommen im Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 25.05.2007

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. R. Bals
Korreferent: Prof. Dr. H. Renz

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen, das mögliche getan hat.“

(J.W. von Goethe, Italienische Reise, 16.März, 1787)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 3

2.1 Die angeborene Immunität der Lunge 3

2.1.1 Das Atemwegsepithel als Modulator der angeborenen Immunantwort 4

2.1.2 Toll-like Rezeptoren des Atemwegsepithels 6

2.1.3 Der Einfluss von Makrophagen auf das Atemwegsepithel 10

2.2 Aspergillus fumigatus 11

2.2.1 Klinische Relevanz von Aspergillus fumigatus 12

2.2.2 Abwehrmechanismen der Lunge gegen *Aspergillus fumigatus* 15

2.3 Fragestellung 17

3 Material und Methoden 18

3.1 Zellkultur, Bakterien, Pilze 18

3.2 Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel und air liquid interface Kulturen 19

3.3 Stimulationsexperimente 19

3.4 Transfektion der Zellen 22

3.5 Isolation von Monozyten aus Buffy-Coat 22

3.6 Isolation von Makrophagen aus der Bauchhöhle von Mäusen 23

3.7 Stimulation peritonealer Makrophagen 23

3.8 Antimikrobieller Assay 24

3.9 Kokultur von Epithelzellen und Makrophagen 24

3.10 Isolation von RNA und RT-PCR 25

3.11 ELISA („enzyme linked immuno sorbent assay“) 26

3.12 FACS („fluorescence-activated cell sorting“) Analyse 26

3.13 Tierversuche 27

3.13.1 Infektion und Präparation von Mäusen 27

3.13.2 Bestimmung der Bakterienzahl in der Lunge 28

3.13.3 Aufbereitung der BAL 28

3.14 Statistische Auswertung 29

4 Ergebnisse 30

4.1 Die Kokultur mit Makrophagen verstärkt die Reaktion der Epithelzellen bei einer bakteriellen Infektion 30

4.1.1 Die IL-6 Konzentration in der Kokultur ist nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* deutlich erhöht 30

4.1.2 Makrophagen sensibilisieren das Atemwegsepithel für die Erkennung von Streptococcus pneumoniae 31

4.1.3 Die Sensibilisierung der Atemwegsepithelzellen durch Makrophagen ist abhängig von NF-kB 32

4.2 Durch Inkubation mit Makrophagen-Medium wird die Reaktion der Epithelzellen verstärkt 34

4.2.1 Makrophagen geben mehr Zytokine ab wenn sie mit LPS stimuliert werden . 35

4.2.2 Atemwegsepithelzellen reagieren nicht auf Stimulation mit LPS 36

4.2.3 Vorinkubation der Epithelzellen mit Makrophagen-Medium verstärkt die Reaktion auf Grampositive - und Gramnegative Bakterien 36

4.2.4 Die Abwehr einer bakteriellen Infektion wird durch die Vorinkubation der Epithelzellen mit Makrophagen-Medium verstärkt 40

4.2.5 Vorinkubation mit Makrophagen-Medium sensibilisiert die Epithelzellen für die Erkennung von bakteriellen Komponenten 41

4.2.6 Die Aktivierung der Epithelzellen durch Makrophagen-Medium ist abhängig von TNF-alpha 47

4.2.7 Vorstimulation mit TNF-alpha ist ausreichend, um die Epithelzellen für die Erkennung von TLR-Liganden zu sensibilisieren 50

4.3 Die verminderte Zytokinsekretion von Makrophagen beeinflusst den Verlauf einer bakteriellen Infektion in vivo 52

4.3.1 Makrophagen von p65-KO Mäusen geben nach Stimulation mit LPS deutlich weniger IL-1 und TNF-alpha ab 52

4.3.2 p65 KO und p65 WT Mäuse zeigen deutliche Unterschiede in der Entzündungsreaktion 53

4.4 Atemwegsepithelzellen reagieren auf die Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* .. 55

4.4.1 Konidien induzieren IFN-ß und IP-10 jedoch kein hBD-2, IL-6 und IL-8 55

4.4.2 Die Aufnahme der Konidien ist für die Erkennung notwendig 57

4.4.3 Die Induktion der IP-10 Expression ist NF-kB abhängig 58

4.4.4 Atemwegsepithel erkennt doppelsträngige Konidien RNA 59

4.4.5 Die IFN-β und IP-10 Induktion ist RIP-1/TBK-1 abhängig 61

4.4.6 Die Konidien RNA wird über TLR3 erkannt 62

5 Diskussion 63

5.1 Makrophagen modulieren die Entzündungsreaktion des Atemwegsepithels 63

5.2 Die Reaktion von Atemwegsepithelzellen auf den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* 71

Literatur 76

1 Zusammenfassung

Das Atemwegsepithel bildet die Grenzfläche zwischen Körperinnerem und unserer Umwelt. Als physikalische Barriere verhindert es das Eindringen von Fremdkörpern und pathogenen Mikroorganismen. Verschiedene Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Atemwegsepithelzellen ebenso wie klassische Immunzellen in der Lage sind Bakterien zu erkennen und durch die Sekretion sowohl proinflammatorischer- als auch antimikrobieller Substanzen aktiv an der Infektionsabwehr beteiligt sind. Durch seine Funktion ist das Atemwegsepithel ständig einer Vielzahl an Keimen ausgesetzt. Bemerkenswert ist, dass nicht durch jeden Kontakt eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Es muss also Mechanismen geben, durch welche die Reaktionsfähigkeit des Epithels reguliert wird. Makrophagen sind in der Lage durch die Sekretion verschiedener Zytokine die Reaktion anderer Zellen zu modulieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss Makrophagen auf die Reaktionsfähigkeit der Epithelzellen bei einer bakteriellen Infektion haben. Die vorliegende Studie ergab, dass Atemwegsepithelzellen in der Ko-Kultur mit Makrophagen deutlich stärker auf die Stimulation mit Bakterien reagieren. Die Abgabe proinflammatorischer Zytokine durch die Epithelzellen wurde merklich verstärkt. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die gesteigerte Reaktion des Atemwegsepithels auf eine erhöhte Expression der für die Erkennung von grampositiven und gramnegativen wichtigen Rezeptoren TLR2 und TLR5 zurückzuführen ist. Versuche mit dem Medium kultivierter Makrophagen zeigten, dass für diesen Effekt von Makrophagen sezerniertes TNF-α verantwortlich ist. Durch einen antimikrobiellen Assay konnte darüber hinaus belegt werden, dass Makrophagen durch die Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IL1-β) auch die antibakterielle Aktivität des Atemwegsepithels deutlich verstärken.

Mit der Atemluft gelangen aber nicht nur einzellige Keime, wie Bakterien und Viren in die Lunge. Das Atemwegsepithel wird täglich mit komplexeren Pathogenen wie z. B. Pilzsporen konfrontiert. Über die Fähigkeit von Atemwegsepithelzellen auf Pilzsporen zu reagieren ist nur wenig bekannt. Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ist der Auslöser verschiedener schwerwiegender Erkrankungen der Atemwege. Aus diesem Grund wurde die Reaktion des Atemwegsepithels auf diesen Erreger untersucht.

Es zeigte sich, dass Atemwegsepithelzellen auf ruhende- jedoch nicht auf auskeimende Sporen (Konidien) oder Myzel von *A. fumigatus* reagieren. Diese Reaktion ist gekennzeichnet

durch eine starke Induktion der IFN-β-Expression sowie der Expression Interferon induzierbarer Gene. Die Charakterisierung dieser Reaktion ergab, dass für die Erkennung die Aufnahme der Konidien durch die Epithelzellen notwendig ist. Im weiteren Verlauf konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Reaktion auf doppelsträngige RNA aus den Konidien zurückzuführen ist, und dass diese über TLR3 erkannt wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit des Atemwegsepithel auf eine bakterielle Infektion zu reagieren durch Makrophagen verstärkt werden kann. Die Daten geben zudem einen Einblick in das komplexe Zusammenspiel der an der Immunantwort beteiligten Zellen. Die Reaktion der Epithelzellen auf die Konidien von *Aspergillus fumigatus* verdeutlicht zudem, dass das Atemwegsepithel auch einen effektiven Schutz vor komplexeren Pathogenen, wie Pilzsporen bietet und darüber hinaus aktiv an deren Erkennung beteiligt ist.

2 Einleitung

2.1 Die angeborene Immunität der Lunge

Die Lunge steht in direktem Kontakt mit unserer Umwelt. Täglich durchströmen sie mehrere Tausend Liter Luft und mit jedem Atemzug werden Bakterien und andere Krankheitserreger in die Lunge transportiert. Trotz dieser großen Menge an Keimen sind Infektionen der Atemwege selten. Grund dafür ist ein aus mehreren Komponenten bestehendes Abwehrsystem (Bals and Hiemstra, 2004). Das Zilien tragende Atemwegsepithel verhindert als physikalische Barriere, dass Keime in den Körper eindringen können. Das Atemwegsepithel ist zusätzlich mit einer schleimigen Schicht, dem Atemwegssekret überzogen. Darin werden eingeatmete Mikroorganismen gefangen und können so durch den koordinierten Zilienschlag nach oben transportiert und ausgehustet werden (Diamond et al., 2000). Das Atemwegssekret dient zum einen als Schutz für das Atemwegsepithel, in dem es den direkten Kontakt zwischen Epithel und Krankheitserregern verhindert, zum anderen wirkt es durch seine Zusammensetzung selbst antimikrobiell (Lillehoj and Kim, 2002). Aufgrund seiner zähflüssigen Konsistenz sind im Atemwegssekret viele lösliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems gebunden. So findet man z. B. die Proteine des Komplementsystems, Surfaktantproteine, Antiproteasen, Clarazellproteine (CC10, CCSP) aber auch Proteine der PLUNC („palate, lung, and nasal epithelium clone“)-Familie, sowie eine Vielzahl antimikrobieller Proteine und Peptide (AMP), die an der Abwehr von Keimen beteiligt sind (Jacquot et al., 1992; Bingle and Craven, 2002; Beisswenger and Bals, 2005; Felgentreff et al., 2006). Krankheitserreger die diesen ersten passiven Abwehrmechanismen entgangen sind, werden durch die in der Lunge vorhandenen Zellen der angeborenen Immunantwort, in erster Linie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, daran gehindert sich festzusetzen und zu vermehren (Curtis, 2005). Residente Makrophagen sind in nahezu allen Geweben zu finden. So auch in der Lunge, wo sie aufgrund ihrer Lokalisation als Alveolarmakrophagen bezeichnet werden. Sie sind die ersten Immunzellen, die im Falle einer Infektion mit den Krankheitserregern in Kontakt kommen. Die Hauptaufgabe der Alveolarmakrophagen ist die Phagozytose der vorhandenen Keime. Die phagozytierten Krankheitserreger werden mit Hilfe von reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) (z. B. Superoxid O_2^-), Proteasen und AMP abgetötet. Die abgetöten Keime werden anschließend weiter prozessiert und kleine Teile der Keime zusammen mit Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert. Durch den Kontakt mit diesen Komplexen werden

naive T-Zellen aktiviert. Somit sind Makrophagen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Jin et al., 2004). Neben dieser Funktion sind Makrophagen auch wichtige Modulatoren der angeborenen Immunantwort. Der Kontakt mit den Mikroorganismen veranlasst die Makrophagen zur Abgabe verschiedener Zytokine, wie z. B. TNF-α, IL-1β oder IL-8. Diese Zytokine haben großen Einfluss auf die Reaktion der Epithelzellen und führen zur Einwanderung weiterer Immunzellen in das entzündete Gewebe (Fujiwara and Kobayashi, 2005). Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Zellen, die auf diese chemotaktischen Reize reagieren und schon relativ kurz nach einer bakteriellen Infektion zum Ort der Entzündung wandern. Dort unterstützen sie die schon anwesenden Makrophagen bei der Abwehr der Infektion. Genauso wie die Makrophagen phagozytieren sie die vorhandenen Erreger und töten diese. Zusätzlich geben sie große Mengen antimikrobieller Substanzen wie z. B. hCAP18/LL-37 ab und schaffen so ein antibakterielles Milieu welches eine weitere Vermehrung der Bakterien verhindert (Cowland et al., 1995). Neutrophile Granulozyten haben nur eine sehr geringe Lebensdauer von einigen Stunden. Neuere Daten zeigen aber, dass selbst sterbende Granulozyten noch an der Abwehr der Infektion beteiligt sind. Nukleäre DNA und antimikrobielle Substanzen aus den sterbenden Zellen bilden extrazelluläre Fallen in denen sich Bakterien verfangen (Brinkmann et al., 2004). Diese so genannten NET haben aufgrund ihrer Zusammensetzung eine hohe lokale antibakterielle Aktivität.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind mit den verschiedensten Rezeptorsystemen ausgestattet, die es ihnen ermöglichen, Mikroorganismen zu erkennen und aufzunehmen. Zu den wichtigsten Rezeptoren der Immunzellen gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR). Die Entdeckung, dass Atemwegsepithelzellen ebenfalls TLR exprimieren (Muir et al., 2004) hat zu der Erkenntnis geführt, dass das Atemwegsepithel neben seiner passiven Barriere-Funktion auch aktiv an der Entzündungsreaktion beteiligt ist.

2.1.1 Das Atemwegsepithel als Modulator der angeborenen Immunantwort

Wie zuvor erwähnt, exprimieren Atemwegsepithelzellen TLR, die es ihnen ermöglichen, pathogene Mikroorganismen zu erkennen und daraufhin ein aktives Abwehrsystem in Gang zu setzen. Dieses Abwehrsystem besteht aus zwei unterschiedlichen Mechanismen (Abb. 3). Zum einen bekämpft das Epithel die Bakterien direkt durch die verstärkte Produktion und Abgabe von antimikrobiellen Substanzen in das Lumen der Atemwege. Zum anderen

moduliert es die Entzündungsreaktion durch die Abgabe von Chemokinen und Zytokinen in das unter dem Epithel liegende Gewebe.

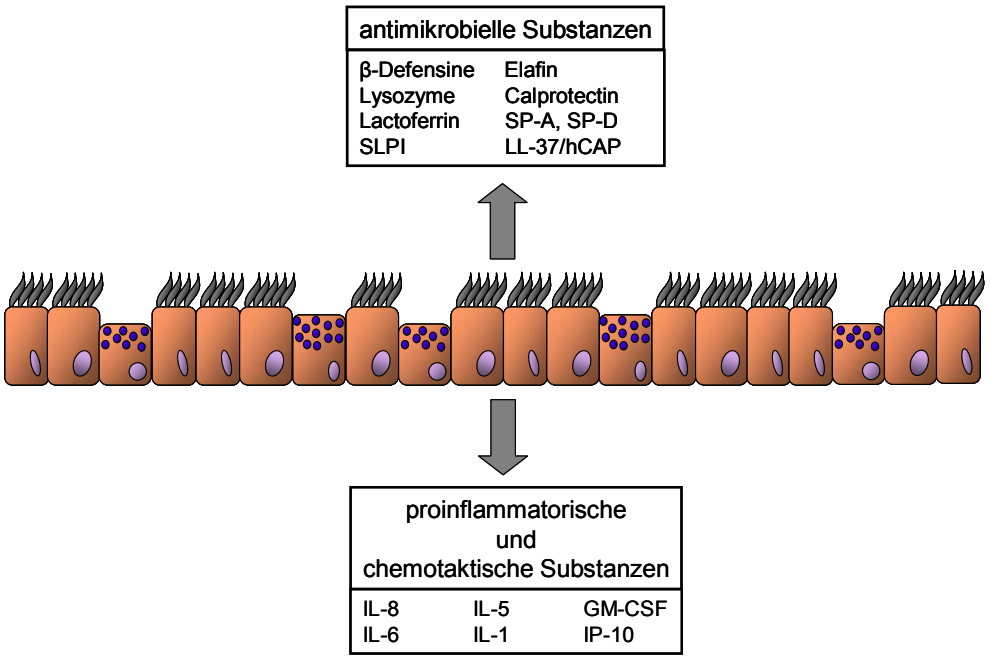

Abb. 3: Die Rolle des Atemwegsepithels bei der Abwehr einer Infektion. Überblick über die vom Atemwegsepithel abgegebenen Substanzen. Die Abgabe von antimikrobiellen Substanzen erfolgt primär apikal in das Lumen der Lunge. Entzündungsfördernde und chemotaktische Substanzen werden nach basolateral in das Gewebe abgegeben.

Zu den von Epithelzellen abgegebenen antimikrobiellen Substanzen gehören große Proteine, wie z. B. das Lysozym, Lactoferrin oder SLPI (secretory leukocyte proteinase inhibitor) (Hiemstra, 2001) aber auch kleine Peptide wie z. B. die Defensine (Schutte and McCray, Jr., 2002).

Defensine sind kationische Peptide mit einer molekularen Größe von 3 bis 4 kD (Schneider et al., 2005). Der hohe Anteil positiv geladener Aminosäuren ermöglicht es ihnen, an die negativ geladene Bakterienmembran zu binden und diese durch Porenbildung oder Destabilisierung zu schädigen (Wu et al., 1999; Heller et al., 2000). Aufgrund der allgemeinen molekularen Struktur werden drei Gruppen von Defensinen unterschieden: die α-Defensine, β-Defensine und θ-Defensine. Atemwegsepithelzellen exprimieren jedoch nur β-Defensine. Zurzeit sind vier humane β-Defensine (hBD) bekannt, hBD-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4. Die Expression und Sekretion der β-Defensine wird streng reguliert und somit den

jeweiligen Erfordernissen angepasst. Die Sekretion von hBD-1 erfolgt konstitutiv und stellt somit eine Art basalen Schutz gegen Infektion dar (McCray, Jr. and Bentley, 1997). Die Expression der anderen β-Defensine wird durch den Kontakt mit pathogenen Keimen wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* induziert (Singh et al., 1998; Harder et al., 2001; Garcia et al., 2001).

Zusätzlich zur aktiven Bakterienabwehr beeinflussen die Epithelzellen die Entzündungsreaktion des darunter liegenden Gewebes. Durch die Abgabe von chemotaktisch aktiven Substanzen wie IL-8 (Nakamura et al., 1991) oder GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor) (Smith et al., 1990) werden Neutrophile und Makrophagen zum Ort der Infektion rekrutiert und unterstützen das Atemwegsepithel bei der Bekämpfung der Bakterien. Die Sekretion proinflammatorischer Substanzen wie IL-1 und IL-6 (Mattoli et al., 1991) verstärkt die Entzündung des unter dem Epithel liegenden Gewebes und trägt dadurch ebenfalls zur effektiven Klärung der Infektion bei (Rennard et al., 1994).

Das Atemwegsepithel bildet die Grenzfläche zur Umwelt und ist deshalb ständig einer Vielzahl verschiedenster Mikroorganismen ausgesetzt. Um zu verhindern, dass durch diesen Kontakt sofort eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird, verfügen Atemwegsepithelzellen über ein dieser Situation angepasstes TLR-Profil.

2.1.2 Toll-like Rezeptoren des Atemwegsepithels

Alle Zellen der angeborenen Immunantwort besitzen Toll-like Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, verschiedenste Pathogene zu erkennen und zwischen fremden und körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Die Bezeichnung leitet sich von dem Protein Toll ab. Toll wurde zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo es eine wichtige Rolle bei der Embrionalentwicklung einnimmt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Toll in der ausgewachsenen Fliege eine ganz andere Funktion erfüllt. Dort fungiert es als Schlüsselrezeptor bei der Erkennung und Abwehr von Pilzen und Bakterien (Lemaitre et al., 1996). Kurze Zeit später fand man heraus, dass Toll strukturelle Ähnlichkeit mit dem Typ I Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) der Säugetiere aufweist (Gay and Keith, 1991). Durch Datenbankrecherchen konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt 12 weitere Rezeptoren identifiziert werden, die aufgrund der homologen Struktur als Toll-like Rezeptoren bezeichnet werden. Im Menschen konnten bisher allerdings nur 10 dieser 12 Rezeptoren funktionell nachgewiesen werden (Tab. 1). Strukturell gesehen sind TLR Typ I Transmembran Proteine, die mit dem

Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) zusammen eine Superfamilie bilden. Sowohl TLR als auch IL-1R besitzen eine konservierte intrazelluläre Signaldomäne, die Toll/IL-1Rezeptor-Domäne (TIR) (O'Neill, 2002). Die TIR-Domäne ist von großer Bedeutung für die Signaltransduktion. Hier enden dann auch die Ähnlichkeiten der beiden Rezeptortypen. Während der extrazelluläre Fortsatz des IL-1R aus drei immunglobulinähnlichen Bereichen besteht, setzt sich die extrazelluläre Region der TLR aus Aminosäure-Repeatstrukturen mit zahlreichen Leucinen zusammen. Solche Leucin reiche Regionen (LRR) eignen sich sehr gut für die Protein-Protein-Interaktion (Akira and Sato, 2003).

Tab. 1: TLR und ihre Liganden.

TLR	Ligand (Ursprung)
TLR1	Triacyllipopeptide (Bakterien)
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptid (verschiedene Pathogene) Lipoteichonsäure (LTA) (Grampositive Bakterien) Lipoarabinomannan (Mycobakterien) Zymosan (Pilze)
TLR3	dsRNA (Viren) mRNA (Wirt)
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS) (Gramnegative Bakterien)
TLR5	Flagellin (Bakterien)
TLR6	Diacyllipopeptide (Mycoplasma)
TLR7	ssRNA (Viren)
TLR8	ssRNA (Viren)
TLR9	CpG DNA (Bakterien)
TLR10	unbekannt

Einzelne TLR unterscheiden sich hauptsächlich in der Zusammensetzung dieser LRR. Diese Unterschiede sind es auch, die es den TLR erlauben eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden zu erkennen (Tab. 1) (Barton and Medzhitov, 2002). Zusätzlich ermöglichen die LRR die Dimerisation von verschiedenen Rezeptoren, wodurch das Spektrum der Liganden nochmals erhöht wird (Bell et al., 2003). Bisher ist allerdings nur die Dimerisation von TLR2 und TLR1 sowie TLR2 und TLR6 bekannt.

Durch die Bindung eines Liganden an den jeweiligen TLR wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die weitergeleitet über die TIR-Domäne zur Expression und Abgabe einer Vielzahl von Effektorproteinen, insbesondere von Chemokinen und Zytokinen (u.a. TNF-α, IL-8, IL-6, IL-1β) aber auch antimikrobiellen Peptiden wie z. B. hBD-2 führt (Akira, 2003). Obwohl sich die TIR-Domäne der einzelnen TLR nicht unterscheidet, wird durch jeden TLR die Expression eines eigenen Repertoires an Effektorproteinen initiiert. Darüber hinaus führt die Bindung verschiedener Liganden desselben Rezeptors ebenfalls zur Expression unterschiedlicher Chemokine. Dies wird durch die Verwendung von insgesamt vier verschiedenen Adapterproteinen (Myd88, Mal, TRAM und TRIF) ermöglicht (Takeda and Akira, 2004). Über die Bindung der verschiedenen Adapterproteine an die TIR-Domäne werden unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert, die jeweils zur Expression der verschiedenen Gene führen. Dabei werden zwei Signalwege unterschieden (Abb. 1).

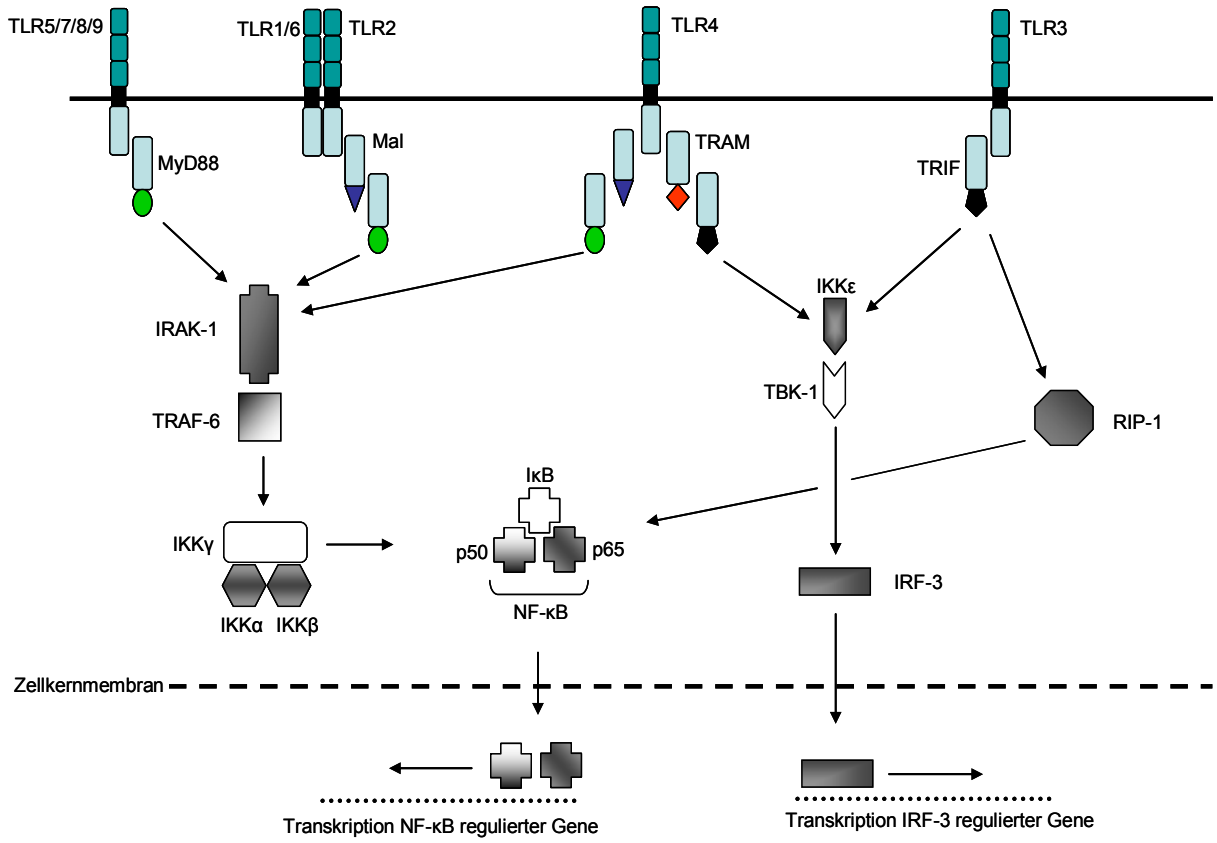

Abb. 1: Signalwege der TLR. Aktivierung der TLR durch Bindung eines Liganden, führt zur Dimerisation mit einem der vier Adaptermoleküle (Myd88, Mal, TRAM, TRIF). Das Signal wird über verschiedene Kinasen weitergeleitet und führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die wichtigsten Adaptermoleküle sind MyD88, das zur Transkription NF-κB regulierter Gene führt und TRIF, das die Transkription IRF-3 regulierter Gene aktiviert.

Der MyD88 abhängige Signalweg führt über verschiedene Kinasen (u.a. IRAK-1, IRAK-4) zur Aktivierung von NF-κB und der Expression NF-κB abhängiger Gene (Suzuki et al., 2002; Takeuchi and Akira, 2002). Der über TRIF vermittelte, auch MyD88 unabhängig genannte Weg führt zum einen über TBK-1 (TANK-binding-Kinase) und IKKε zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (interferon regulatory factor) und der Transkription von IFN-β oder Interferon induzierbarer Gene wie z. B. IP-10 (Fitzgerald et al., 2003). Zum anderen über RIP-1 (receptor interacting protein) zu einer verzögerten Aktivierung von NF-κB (Akira et al., 2006). Der MyD88 unabhängige Signalweg wurde bisher nur für TLR3 und TLR4 beschrieben, wobei TLR3 ausschließlich den MyD88 unabhängigen Signalweg benutzt.

Wie zuvor beschrieben, ist das Atemwegsepithel ständig einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Aus diesem Grund findet man in Atemwegsepithelzellen ein dieser Situation angepasstes TLR-Profil (Abb. 2). Atemwegsepithelzellen exprimieren die mRNA für die TLR 1-6 und TLR9 (Greene et al., 2005). Die Expression von TLR7 und TLR8 konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden.

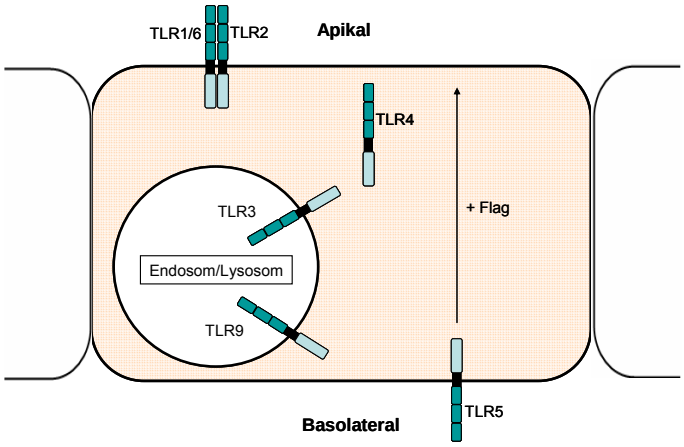

Abb. 2: TLR Expression in Atemwegsepithelzellen. TLR2 und seine Co-Rezeptoren TLR1 und TLR6 sind auf der apikalen Oberfläche exprimiert. TLR4 ist intrazellulär, TLR3 und TLR9 in den Endosomen/Lysosomen lokalisiert. TLR5 wird primär auf der basolateralen Seite der Zellen exprimiert, wird aber durch Stimulation mit Flagellin zur apikalen Membran rekrutiert.

Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), der Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), ist in Atemwegsepithelzellen intrazellulär lokalisiert (Guillot et al., 2004). Den für die Erkennung von Grampositiven Bakterien verantwortlichen Rezeptor TLR2 kann man auf der Zellmembran nachweisen. Er wird jedoch von Atemwegsepithelzellen nicht sehr stark exprimiert (Hertz et al., 2003). TLR5 erkennt Flagellin, den Proteinbestandteil der

Bakteriengeißel und ist somit ein weiterer wichtiger Rezeptor für die Bakterienerkennung (Adamo et al., 2004). TLR5 wird auch auf der Zelloberfläche der Atemwegsepithelzellen exprimiert, ist dort jedoch ähnlich dem Darmepithel, welches ebenfalls einer großen Anzahl an Mikroorganismen ausgesetzt ist, primär basolateral, also auf der dem Lumen abgewandten Seite lokalisiert. Die TLR3 und 9 sind in den Membranen von Lysosomen und Endosomen integriert und erkennen dort Nukleinsäuren von phagozytierten Mikroorganismen. Die Lokalisation und Expression der TLR verhindert somit eine anhaltende oder zu starke Aktivierung des Atemwegsepithels durch die vorhandenen Keime. Dieser Zustand ist aber nicht unveränderlich. So ist bekannt, dass TLR5 durch Stimulation mit Flagellin zur apikalen Membran rekrutiert (Smith and Ozinsky, 2002; Prince, 2006) und die Expression von TLR2 durch Stimulation mit TNF-α erhöht werden kann (Wolfs et al., 2002).

2.1.3 Der Einfluss von Makrophagen auf das Atemwegsepithel

Verschiedene Studien belegen das Vorhanden sein einer komplexen Wechselbeziehung von Atemwegsepithelzellen und Makrophagen. Wie zuvor schon erwähnt sind Makrophagen in der Lage, verschiedenste Chemokine und Zytokine zu produzieren, mit denen sie die Reaktion benachbarter Zellen, u.a. den Atemwegsepithelzellen beeinflussen können (Krakauer, 2002). Die Substanzen mit der größten modulatorischen Aktivität sind IL-1β, TNF-α und IFN-γ, wobei letzteres nur in geringen Mengen von Makrophagen produziert wird. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch Stimulation mit IL-1β zum einen die Sensitivität der Epithelzellen gegenüber LPS deutlich erhöht (Liu et al., 2003) und zum anderen die Expression von hBD-2 induziert werden kann (Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2003). Aus Untersuchungen mit anderen Zellen weiß man, dass durch Stimulation mit TNF-α und IFN-γ die Expression der TLR verstärkt werden kann. In Atemwegsepithelzellen konnte dieser Effekt bisher jedoch nur für TLR2 (Homma et al., 2004) nachgewiesen werden. Die Abgabe von Zytokinen und Chemokinen ist aber nicht der einzige Weg, über den Makrophagen die Reaktion von anderen Zellen beeinflussen können. Es ist bekannt, dass Makrophagen ebenso wie Neutrophile während einer Infektion Mikropartikel so genannte Ektosomen abgeben (Satta et al., 1994). Ob es sich dabei um einen aktiven Mechanismus oder, um die Überreste apoptotischer Zellen handelt, ist nicht geklärt. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stimulation mit von Makrophagen stammende Ektosomen zu einer verstärkten Entzündungsreaktion der Atemwegsepithelzellen führt (Cerri et al., 2006). Der diesem Effekt zugrunde liegende Mechanismus ist aber noch nicht bekannt.

Makrophagen werden im Gegenzug aber auch durch das Atemwegsepithel beeinflusst. Takabayashi et al. konnten zeigen, dass Epithelzellen über einen Integrin und TGF-β abhängigen Mechanismus die Reaktionsfähigkeit der Alveolarmakrophagen beeinflussen (Takabayshi et al., 2006). Weitere Studien zeigen, dass die Zytokinsekretion von Makrophagen in der Ko-Kultur mit Atemwegsepithelzellen deutlich erhöht ist und dass sie sensitiver auf die Stimulation mit bakteriellen Toxinen reagieren (Krakauer, 2002; Fujiwara and Kobayashi, 2005). Beide Mechanismen sind Teil einer Wechselbeziehung von Makrophagen und Atemwegsepithelzellen, die eine gezielte Regulation der Entzündungsreaktion ermöglichen.

2.2 Aspergillus fumigatus

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitär pathogener saprophytischer Schimmelpilz. Das hauptsächliche Vorkommen ist im Boden oder auf sich zersetzender Vegetation. Man findet ihn aber auch im Hausstaub, an Wänden, in Nahrungsmitteln und sogar im Trinkwasser. Das Hauptcharakteristikum zur Identifikation von *A. fumigatus* sind die Konidiophoren und Konidien, welche dem Pilz zur Fortpflanzung dienen (Raper and Fennell, 1965). Die Konidiophoren von *A. fumigatus* haben eine Länge von ca. 500µm und bilden am Ende ein ca. 20-30µm durchmessendes abgerundetes Bläschen, das Konidiophorenvesikel. Auf diesem Vesikel sitzen längliche, ca. 6-8µm lange und 2-3µm breite Ausstülpungen, die konidienbildenden Phialiden. Von den Phialiden werden die grün-braun gefärbten Konidien in langen Ketten abgeschnürt (Raper and Fennell, 1965). Die Konidien sind die asexuellen Sporen, welche dem Pilz bei der Vermehrung und Ausbreitung dienen. Unter Kulturbedingungen bildet *A. fumigatus* einen an Samt erinnernden, teilweise flockigen Thallus. Die Färbung kann von weiß über grüngrau bis zu mehr oder minder schwarz reichen. Sämtliche Aspergillus Arten sind im Allgemeinen thermophil. *A. fumigatus* kann beispielsweise noch bei Temperaturen von bis zu 55°C problemlos wachsen. Seine Konidien sind sogar in der Lage, Temperaturen von bis zu 70°C zu überleben (Kwon-Chung and Bennett, 1992). Seinen Namen Aspergillus fumigatus („rauchender Aspergillus“) verdankt er der an Rauch erinnernden Wolke, die bei der Ablösung der Sporen von den Konidiophoren entsteht. Jede Konidiophore ist in der Lage, Tausende Konidien zu bilden, welche schon durch leichte Luftbewegungen abgelöst werden und so in die freie Luft gelangen. Aufgrund ihrer geringen Größe (2-3µm) und ihrer Langlebigkeit (mehrere Monate) können die

Konidien mit dem Luftstrom über weite Entfernungen hinweg transportiert werden (Warris and Verweij, 2005). Die geringe Größe und ihre Verbreitung mit der Luft sind es auch, die ein Vordringen der Konidien in die unteren Atemwege bis in den Alveolarraum ermöglichen, wo sie auskeimen und schwerwiegende Erkrankungen verursachen können (Warris and Verweij, 2005; Denning, 1998). Aus diesem Umstand ergibt sich eine nicht zu unterschätzende klinische Relevanz.

2.2.1 Klinische Relevanz von Aspergillus fumigatus

Die Konidien von *A. fumigatus* machen nur etwa 1% aller in der Luft befindlichen Pilzsporen aus, verursachen aber über 90 % aller invasiven Pilzerkrankungen (Pastor et al., 2005). Das macht *A. fumigatus* zum Häufigsten durch die Luft verbreiteten fungiden Krankheitserreger. Obwohl es sich um einen primär saprophytischer Organismus handelt, ist *A. fumigatus* durchaus in der Lage, im menschlichen Körper parasitäre Mykosen zu verursachen (Bodey and Vartivarian, 1989). Die durch *A. fumigatus* verursachten Infektionen können die verschiedensten Organe betreffen, u.a. Haut, Augen, Nieren (Denning, 1998) und den Verdauungstrakt (Prescott et al., 1992). Aufgrund der Verbreitung über die Luft ist das am häufigsten betroffene Organ jedoch die Lunge (Latge, 1999). Durch Aspergillus verursachte allergische Reaktionen sind in den meisten Fällen nicht sehr schwerwiegend und auf eine wiederholte Exposition ohne Kolonisation zurückzuführen. Eine schnelle Besserung der Beschwerden wird normalerweise schon durch das Vermeiden der Exposition erreicht. Dem gegenüber stehen Infektionen, bei denen es zu einer dauerhaften Besiedlung und Wachstum des Pilzes in den Organen, den so genannten invasiven Aspergillosen, kommt (Denning, 1998; Marr et al., 2002). Die drei häufigsten Erkrankungen im Zusammenhang mit *A. fumigatus* werden im Folgenden kurz erläutert.

Aspergillom

Das Aspergillom wird aufgrund seiner Erscheinungsform häufig auch als "Pilzball" bezeichnet und ist die historisch gesehen klassischste Aspergillose (Latge, 1999). Dabei kommt es zu einer Infektion und Wucherung von Schimmelpilzmyzel in einer vorhandenen Höhlung der Atemwege, wie den Nasennebenhöhlen, Stirnhöhlen oder anderen durch frühere Krankheiten wie z. B. der Sarkoidose (Israel et al., 1982) oder Tuberkulose (Soubani and Chandrasekar, 2002) entstandene Erweiterungen des Atemtraktes. Das Schimmelpilzgeflecht

wächst zu einer kugeligen Struktur heran und hüllt sich nach und nach in eine Eiweißschicht ein. Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Bildung von Sporen an der Oberfläche, welche sich weiter verteilen und neue Infektionsherde ausbilden können (Csekeo et al., 1997). Eines der häufigsten Symptome des Aspergillom ist der Bluthusten (Hemoptysis). Dazu kommt es, wenn durch das sich ausdehnende Aspergillom Gefäße in dem es umgebenden Gewebe zerstört werden (Dixon and Walsh, 1992). In seltenen Fällen kann sich aus dem Aspergillom eine invasive Aspergillose entwickeln (Tomee et al., 1995).

Invasive Aspergillose (IA)/Chronische necrotisierende Aspergillose (CNA)

Die invasive Aspergillose (IA) ist die schwerste Form der durch *A. fumigatus* verursachten invasiven Infektionen (Denning, 1998). Sie unterscheidet sich von der chronisch nekrotisierenden Aspergillose (CNA) durch ihren schnelleren Verlauf und der größeren Wahrscheinlichkeit, weitere Organe in Mitleidenschaft zu ziehen (Binder et al., 2006). Invasive Aspergillosen sind durch Wachstum des Pilzes innerhalb der betroffenen Organe gekennzeichnet. Dabei kommt es zu massiven Zerstörungen des Gewebes und den damit verbundenen Beeinträchtigungen der Organfunktion (Denning, 1994). Die am Häufigsten betroffenen Organe sind die Lunge, die Nieren, das Herz und in seltenen Fällen auch das Gehirn (Shapiro and Tabaddor, 1975; Boon et al., 1990). Die Sterblichkeitsrate liegt bei einer frühen Diagnose und Behandlung immer noch bei 30-90%, unbehandelt endet eine solche Infektion in allen Fällen tödlich (Denning, 1996).

Allergische bronchopulmonare Aspergillose (ABPA)

Die allergische bronchopulmonare Aspergillose (ABPA) äußert sich durch klassische asthma-ähnliche Symptome wie z. B. chronische Entzündung mit Infiltration der Bronchien und Bronchiolen sowie Erweiterung und Anschwellung (Bronchiectasis) des Lungengewebes (Cockrill and Hales, 1999). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es zu einer Lungenfibrose und Zerstörung von Lungengewebe kommen. Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen, wie z. B. Asthma (Basich et al., 1981) oder Cystischer Fibrose (Mroueh and Spock, 1994) haben ein erhöhtes Risiko, eine ABPA zu erleiden. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, aber eine Beteiligung von Aspergillus spezifischen IgE Typ I und IgG Typ III Hypersensitivitätsreaktionen ist wahrscheinlich (Wang et al., 1978).

Die Wahrscheinlichkeit an einer Aspergillose zu erkranken ist relativ gering. Dennoch hat die Zahl der Erkrankungen, allen voran die invasive Aspergillose, in den letzten zwei Jahrzehnten deutlich zugenommen (Groll et al., 1996; Dixon et al., 1996). Ironischerweise liegt die Ursache dieser Entwicklung in den Fortschritten der Medizin in diesem Zeitraum begründet. Hauptursache für die zunehmende Zahl der Infektionen ist der steigende Einsatz immunsupprimierender Behandlungen wie z. B. nach Organ- oder Knochenmarktransplantationen, Krebs-Therapie sowie zur Linderung der Auswirkungen von Autoimmunerkrankungen (Cohen et al., 1993; Rogers, 1995).

Tab. 2: Wahrscheinlichkeit an einer invasiven Aspergillose zu erkranken in Bezug auf die zugrunde liegende Vorerkrankung bzw. Behandlung.

Vorerkrankung/Behandlung	(%)
Lungentransplantation	19-26
akute Leukämie	5-24
allogene Knochenmarkstransplantation	4-9
autologe Knochenmarkstransplantation	0,5-6
HIV	0-12
Lebertransplantation	1,5-10
Herz- und Nierentransplantation	0,5-10
Verbrennungen	1-7

Immunsupprimierte Patienten haben ein deutlich erhöhtes Risiko, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken (Tabelle 2). Erschwerend kommt hinzu, dass diese Patienten aufgrund des brachliegenden Immunsystems kaum Symptome einer Infektion zeigen und dadurch eine frühzeitige Diagnose und Therapie erheblich erschwert wird (Denning, 1996). Das ist auch der Grund, weshalb diese Infektion mittlerweile zu den häufigsten Todesursachen dieser Patientengruppe (Denning, 1994; Balloy et al., 2005) zählt.

2.2.2 Abwehrmechanismen der Lunge gegen *Aspergillus fumigatus*

Jeder Mensch atmet im Durchschnitt mehrere hundert Konidien pro Tag ein ohne zu erkranken (Chazalet et al., 1998). Es muss in der Lunge also ein effizientes Abwehrsystem geben, welches eine Infektion mit *A. fumigatus* oder anderen Pilzen effektiv verhindert. Das Atemwegsepithel bietet als physikalische Barriere einen ersten Schutz und verhindert ein Eindringen der Konidien in den Körper. In den oberen Atemwegen werden eingeatmete Konidien zusätzlich im Atemwegssekret gebunden und mit dem Zilienschlag ausgeworfen. In den unteren Atemwegen bilden residente Alveolarmakrophagen die erste aktive Abwehr (Schaffner et al., 1982). Sie erkennen die Sporen als Fremdkörper, phagozytieren diese (Ibrahim-Granet et al., 2003) und verhindern dadurch schon frühzeitig eine Infektion. Genauere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Makrophagen ungefähr 2 Stunden benötigen, um die Konidien aufzunehmen und, dass nach 24 Stunden 90% der aufgenommenen Konidien abgetötet sind (Ibrahim-Granet et al., 2003). Das Abtöten der Sporen erfolgt im Phagolysosom über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) (Philippe et al., 2003).

Trotz der großen Effizienz der Makrophagen kommt es vor, dass einige Sporen dieser ersten Abwehr entgehen. Diese Sporen keimen aus und können im weiteren Verlauf zu Hyphen heranwachsen. Auskeimende Sporen und Hyphen werden ebenfalls von den Makrophagen erkannt. Im Gegensatz zur unspezifischen Phagozytose von ruhenden Konidien ohne erkennbare Entzündungsreaktion (Gersuk et al., 2006) reagieren die Makrophagen nun mit der Abgabe von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen wie z. B. TNF-α, IL-1β (Marr et al., 2003) oder IL-8. Dies führt zum Einstrom von Neutrophilen in die Lunge. Diese bilden die zweite Abwehrreihe gegen die Infektion (Schaffner et al., 1982). Die Neutrophile binden an die Hyphen, welche zu groß sind um von den Makrophagen phagozytiert zu werden (Diamond et al., 1978) und zerstören diese durch die Abgabe von RSS (Bellocchio et al., 2004). Aufgrund der unterschiedlichen Reaktion der Makrophagen auf die verschiedenen Keimstadien der Konidien, wird die Beteiligung von verschiedenen Rezeptoren bei der Erkennung vermutet. Neueste Studien zeigen, dass Dectin-1, (Brown and Gordon, 2001) ein auf Makrophagen und Neutrophilen stark exprimierter β-Glucan Rezeptor (Lavigne et al., 2006; Willment et al., 2005), maßgeblich an der Erkennung von auskeimenden Konidien und Hyphen beteiligt ist (Steele et al., 2005). Die Hyphenzellwand von *A. fumigatus* besteht zu großen Teilen aus verzweigten β-1,3-Glucanen, welche von Dectin-1 erkannt werden (Brown et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist die Zellwand der Konidien zweischichtig aufgebaut und

besteht aus einer hydrophoben Proteinaußenhülle (Paris et al., 2003) und einer β-1,3-Glucan-reichen inneren Zellwand, die erst beim Auskeimen auf die Außenseite gelangt (Hohl et al., 2005), wo sie dann von Makrophagen und Neutrophilen erkannt werden kann. Dies erklärt auch, wieso Makrophagen auf Hyphen und keimende Konidien reagieren, während ruhende Konidien keine Reaktion hervorrufen. Weitere Studien zeigen, dass für die Induktion der Entzündungsreaktion das Zusammenspiel von Dectin-1 und TLR2 notwendig ist (Gantner et al., 2003). Zusätzlich wird von mehreren Gruppen aber auch eine Beteiligung von TLR4 bei der Konidienerkennung postuliert (Mambula et al., 2002; Meier et al., 2003; Netea et al., 2003).

Ob Atemwegsepithelzellen neben ihrer passiven Barrierefunktion auch eine aktive Rolle bei der Abwehr einer Pilzinfektion spielen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr unzureichend untersucht. Es ist bekannt, dass die von Typ II Pneumozyten gebildeten Surfactant Proteine (SP) –A und –D an Konidien binden können (Allen et al., 1999) und dadurch die Fähigkeit von Makrophagen und Neutrophilen diese zu phagozytieren, verbessert wird (Madan et al., 1997; Madan et al., 2005). Des Weiteren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Epithelzellen in der Lage sind, Konidien aktiv aufzunehmen (Paris et al., 1997; Wasylnka and Moore, 2002) und diese abzutöten (DeHart et al., 1997), wenn auch weniger effektiv als Makrophagen (Wasylnka and Moore, 2003). Dieser Prozess steht aber analog zu den Makrophagen nicht mit einer Entzündungsreaktion in Verbindung.

2.3 Fragestellung

Zahlreiche Studien der letzten Jahre zeigen, dass die Rolle des Atemwegsepithels bei der Abwehr einer Infektion nicht auf die Funktion als physikalische Barriere beschränkt ist. Diese Studien belegen, dass die Zellen des Atemwegsepithels in der Lage sind, Bakterien zu erkennen und durch die Sekretion sowohl proinflammatorischer- als auch antimikrobieller Substanzen selbst aktiv an der Immunantwort der Lunge beteiligt sind.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Makrophagen auf die Immunantwort des Atemwegsepithels zu untersuchen. Makrophagen sind wichtige Modulatoren des angeborenen Immunsystems. Durch die Sekretion verschiedener Zytokine sind sie in der Lage, die Immunantwort benachbarter Zellen zu beeinflussen. Der Einfluss von Makrophagen auf die Zellen des Atemwegsepithels wurde bisher nur in Ansätzen untersucht. Dementsprechend wenig ist über die Interaktion dieser beiden Zellen bekannt. In dieser Arbeit sollte deswegen mit Hilfe immunologischer und zellbiologischer Methoden untersucht werden, welchen Einfluss Makrophagen auf die Reaktion der Epithelzellen bei einer bakteriellen Infektion haben. Zudem sollten die diesem Einfluss zugrunde liegenden Mechanismen näher charakterisiert werden. Die Ergebnisse sollten zudem noch im Mausmodell überprüft werden.

Das Atemwegsepithel ist ständig einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Während die durch einzellige Organismen wie Bakterien und Viren verursachte Abwehrreaktion des Atemwegsepithels schon sehr gut untersucht ist. Ist über die Reaktion der Epithelzellen auf komplexere Pathogene wie etwa Pilzsporen, die ebenfalls mit der Atemluft in die Lunge gelangen, so gut wie gar nichts bekannt. Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ist aufgrund seiner Verbreitung und Pathogenität von großer klinischer Relevanz. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Reaktion des Atemwegsepithels auf *A. fumigatus* zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur, Bakterien, Pilze

Sämtliche verwendeten Zellkulturmedien, das fötale Kälberserum (FCS) sowie 1x Trypsin/EDTA (0,5%,) wurden von Gibco (Karlsruhe, Deutschland), das PBS von PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen. Die Medien für die Pilz- und die Bakterienkultur stammten von LabM (Lancashire, UK) bzw. Roth (Karlsruhe, Deutschland). Die humane Atemwegsepithelzelllinie A-549 und die humane Monozytenzelllinie U-937 wurden in RPMI 1640, 10% FCS kultiviert. Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 wurde in DMEM, 10% FCS kultiviert. Alle Zellen wurden in einem Zellinkubator bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 kultiviert. Für die Generierung von Makrophagen aus den U-937 Zellen wurden diese für 24 Stunden mit 10nM Phorbol-12Myristat-13Acetat (PMA) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert und nach 24 Stunden die nicht adherenten Zellen entfernt. *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 wurde in LB Medium unter Schütteln bei 37°C über Nacht angezogen. Die Bakterien wurden überimpft und bei einer OD_{600} von 0,8 geerntet, anschließend einmal mit PBS gewaschen, 5 Minuten bei 1500 upm abzentrifugiert und in der gewünschten Konzentration in PBS aufgenommen. *Streptococcus pneumoniae* PN36 (Dr. M. Witzenrath, Charité Berlin, Deutschland) wurde auf Blutagarplatten über Nacht bei 37 °C angezogen und in CASO Bouillon + 3 % Hefeextrakt + 10 % FCS in einem offenem 50 ml Röhrchen stehend ohne Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD_{600} = 0,3 angezogen. Die Bakterien wurden bei 3100 upm für 10 Minuten ohne Bremse abzentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert. *S. pneumoniae* PN36 wurde auf Blutagarplatten ausgestrichen, alle anderen Bakterien auf LB Agarplatten. Konidien von *Aspergillus fumigatus*, klinisches Isolat 27707 (Dr. K. Schröppel, Universität Erlangen, Deutschland) wurden auf YPD-Agarplatten 2-3 Tage bei 30°C kultiviert. Die Konidien wurden mit 3 ml PBS + 0,1% Tween 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) vom Pilzrasen gespült, mit PBS gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Für die Stimulation wurden die Konidien für 30 Minuten bei 65°C abgetötet und die Konzentration mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Pilzhyphen von *A. fumigatus* wurden durch mehrtägige Inkubation der Konidien in RPMI 1640 erhalten.

3.2 Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel und air liquid interface Kulturen

Primäre humane Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden aus Trachea und den Bronchien von Patientenmaterial durch enzymatischen Verdau mit Protease 14 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gewonnen. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Marburg genehmigt. Die Patienten wurden aufgeklärt und ihre Zustimmung eingeholt. Die Zellen wurden in Airway epithelial cell growth medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Für das Anlegen von *air liquid interface* Kulturen wurden primären Epithelzellen, die zuvor in Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert wurden verwendet. Die Zellen wurden mit Trypsin vereinzelt und auf zuvor mit Typ 1-Kollagen (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) beschichteten, semipermeablen Membranen mit einer Porengröße von 0,4µm (Millicell-HA; Durchmesser 12 bzw. 30 mm; Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA) ausgesät. Nachdem die Zellen konfluent waren wurde das Medium von apikaler Seite entfernt. Das basolaterale Medium wurde durch eine 1:1 Mischung von DMEM und HAM-F12 mit 2% Ultroser G (Biosepra, Fremont, USA) ersetzt. Die Ausbildung von *tight junctions* wurde durch Messung des transepithelialen Widerstandes überprüft. Für die Versuche wurden nur Kulturen verwendet, die mindestens 2 Wochen kultiviert wurden und bei denen ein transepithelialer Widerstand von mehr als 1000 $\Omega \cdot cm^2$ gemessen wurde. Neben primären Epithelzellen wurden auch A-549 Zellen für die *air liquid interface* Kultur verwendet. Die A549-Kulturen wurden verwendet, wenn der transepitheliale Widerstand einen Wert von mehr als 400 $\Omega \cdot cm^2$ erreicht hatte.

3.3 Stimulationsexperimente

Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien

Für sämtliche Experimente mit abgetöteten Bakterien wurde *P. aeruginosa* PAO1 bei einer OD_{600} von 1,0 und *S. pneumoniae* PN36 bei einer OD_{600} von 0,3 abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und im Ausgangsvolumen PBS resuspendiert. Um die Bakterien abzutöten wurde diese Suspension für 30 Minuten bei 95°C inkubiert und danach in einer 1:10 Verdünnung auf die Zellen gegeben.

Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)

Für die Stimulation mit LPS wurden zu Makrophagen differenzierte Monozyten (siehe 3.5) und mit PMA aktivierte U937-Zellen (siehe 3.1) verwendet. Es wurden jeweils $1x10^6$ Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und für 18 Stunden mit 100ng/ml LPS stimuliert. Um die Reaktion von Epithelzellen auf LPS-Stimulation zu testen wurden primäre Atemwegsepithelzellen und die Zelllinie A549 verwendet. Es wurden jeweils $1x10^6$ Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und für 18 Stunden mit 100ng/ml, 1µg/ml und 10µg/ml LPS (Ultra-pure LPS, *E.coli* 0111:B4; Cayla-InvivogenEurope, Toulouse, Frankreich) stimuliert.

Stimulation mit Makrophagen-Medium

Für die Stimulation mit Makrophagen-Medium wurden $1x10^7$ PMA aktivierte U937-Zellen pro Kulturschale (10cm) ausgesät und für 18 Stunden mit 100ng/ml LPS (Ultra-pure LPS, *E.coli* 0111:B4; Cayla-InvivogenEurope, Toulouse, Frankreich) stimuliert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Für die Versuche wurden $1,5x10^5$ Epithelzellen (pHBE, A549) pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät und für 18 Stunden mit dem Makrophagen-Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und neues Medium zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 6 Stunden mit hitzeinaktivierten Bakterien oder spezifischen TLR-Liganden stimuliert. Folgende TLR-Liganden wurden in den angegebenen Konzentrationen verwendet: 100ng/ml Flagellin (TLR5); 1µg/ml Peptidoglycan (PGN) von *Staphylococcus aureus* (TLR2). Alle TLR-Liganden wurden von InvivoGen (Toulouse, Frankreich) bezogen. Um die Wirkung des im Makrophagen-Medium enthaltenen TNF-α und IL-1β zu untersuchen wurden diese Zytokine in einigen Versuchen selektiv neutralisiert. Zu diesem Zweck wurde das Medium für 1 Stunde mit neutralisierenden Antikörpern gegen hTNF-α (15µg/ml) bzw. hIL-1ß (15µg/ml) (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) oder einer Kombination beider Antikörper behandelt. Als Kontrolle wurde ein IgG_1-Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) in der gleichen Konzentration eingesetzt. Die Zellen wurden mit Lysepuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und das Lysat bis zur RNA-Isolation (siehe 3.10) bei -80°C eingefroren.

Stimulation mit Zytokinen

Um den Einfluss von TNF-α und IL-1β auf die Epithelzellen zu untersuchen, wurden $1,5x10^5$ Zellen pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät und für 18 Stunden mit 5ng/ml TNF-α oder 1ng/ml IL-1β (R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 6 Stunden mit den TLR-Liganden stimuliert.

Stimulation mit Konidien und Hyphen

Für die Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien und Hyphen wurden primäre Atemwegsepithelzellen in konventioneller Flüssig- und *air liquid interface* Kultur verwendet. Die Konidien wurden in der gewünschten Konzentration im Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. In einigen Versuchen wurden auch gequollene Konidien verwendet. Diese wurden dafür für 3 bzw. 6 Stunden in RPMI 1640 inkubiert und im Anschluss inaktiviert. Um die Aufnahme der Konidien durch die Epithelzellen zu untersuchen wurde die Endocytose der Zellen blockiert. Dafür wurden die Zellen für 1 Stunde mit 0,1µM, 0,5µM und 1µM Cytochalasin D (*Zygosporium mansonii*; EMD Biosciences, La Jolla, USA) vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Versuche durchgeführt. Um die Signaltransduktion näher zu charakterisieren, wurden die Zellen vor Stimulationsbeginn mit 30µM und 50µM Resveratrol (*trans*-3,4′,5-Trihydroxystilbene; EMD Biosciences, La Jolla, USA) für eine Stunde vorinkubiert.

Bei allen Stimulationsversuchen wurde bei Versuchsende der zellfreie Kulturüberstand bis zur ELISA Messung (siehe 3.11) bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden mit Lysepuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und das Lysat bis zur RNA-Isolation (siehe 3.10) ebenfalls bei -80°C eingefroren.

3.4 Transfektion der Zellen

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz TransIT LT-1 (Mirus Bio Corporation, Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Für die Transfektion von primären Atemwegsepithelzellen wurden $1x10^5$ Zellen pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Um die Reaktion auf die Konidien-RNA zu testen, wurden die Zellen mit verschiedenen Mengen der Konidien-RNA (siehe 3.10) transfiziert. Das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu RNA war in allen Versuchen 3:1. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und bis zur ELISA-Analyse (siehe 3.11) bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden mit Lysepuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und das Lysat bis zur RNA-Isolation (siehe 3.10) ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Für die Messung der NF-kB-Aktivierung, wurden $5x10^4$ primäre Atemwegszellen pro Loch einer 24-Lochplatte ausgesät und mit 0,5µg 5xNFkB-Luciferase-Reporterplasmid pro Loch transfiziert. Das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu Plasmid war bei allen Transfektionen 3:1. Nach 24 Stunden Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Konidien oder zur Kontrolle mit 10ng/ml TNF-α stimuliert. Die Messung der Lumineszenz wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung des Ultra 384 Multiplatereader (TECAN, Grödig, Österreich) durchgeführt.

Wurden $2,5x10^5$ HEK-293 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und entweder mit 1µg hTLR3-Plasmid oder 1µg pcDNA3.1-Plasmid transfiziert. Das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu Plasmid war bei allen Versuchen 3:1. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit $1x10^6$ Konidien/ml stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Lysepuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und das Lysat bis zur RNA-Isolation (siehe 3.10) bei -80°C eingefroren.

3.5 Isolation von Monozyten aus Buffy-Coat

Für die Experimente mit primären humanen Makrophagen wurden Makrophagen *in vitro* aus Monozyten generiert. Zu diesem Zweck wurden mononukleäre Zellen aus einem Buffy-Coat (Blutbank der Philipps-Universität Marburg) durch Dichtegradientenzentrifugation über einen

Ficoll Gradienten (Dichte 1,077 g/ml; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) isoliert. Um die Reinheit der Monozyten zu erhöhen, erfolgte eine weitere Aufreinigung mit MACS-Technologie nach Anleitung des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Durch die Verwendung von magnetischen Partikeln, an die ein anti-CD14-Antikörper gebunden ist, wurden nur die CD14 positiven mononukleären Zellen, die Monozyten isoliert. Die Zellzahl wurde bestimmt und jeweils 1 x 10^6 Zellen / ml in großen Zellkulturschalen ausgesät. Für die Differenzierung zu Makrophagen wurden die Monozyten in mit 50ng/ml GM-CSF supplementiertem RPMI 1640+10% FCS kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die nicht adherenten Zellen entfernt und die adherenten Makrophagen für die Versuche verwendet.

3.6 Isolation von Makrophagen aus der Bauchhöhle von Mäusen

Für die Gewinnung peritonealer Makrophagen wurde den Mäusen 1-2 ml Thioglykollat-Medium (BD Difco, Heidelberg, Deutschland) in die Bauchhöhle gespritzt. Die Mäuse wurden nach drei Tagen mit Isofluran/Forene (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) betäubt und durch Genickbruch getötet. Für die Durchführung der Bauchhöhlenspülung, wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert, das Bauchfell vorsichtig aufgeschnitten und sorgfältig abgezogen, ohne dabei die Bauchhöhle zu verletzen. Dann wurden 10 ml eiskaltes PBS in die Bauchhöhle gespritzt und wieder herausgezogen. Diese Prozedur wurde mit weiteren 10 ml PBS wiederholt. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und in RPMI-1640-Medium bis zur gewünschten Zellkonzentration (1 Mio. Zellen / ml) verdünnt.

3.7 Stimulation peritonealer Makrophagen

Peritoneale Makrophagen aus LysMcre/$p65^{lox/lox}$ und LysMcre/$p65^{wt/wt}$ Mäusen wurden in RPMI 1640 (ohne FCS) in einer 24-Lochplatte ausgesät und für 1h im Brutschrank kultiviert. In dieser Zeit setzten sich die Makrophagen am Boden ab, andere Zellen blieben im Überstand. Nach 1 Stunde wurde der Überstand abgesaugt und die adherenten Zellen mehrmals mit Medium gewaschen. Im Anschluss wurden die Makrophagen mit 10 ng/ml LPS in RPMI 1640, 10 % FCS stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zytokinkonzentration mittels ELISA bestimmt.

3.8 Antimikrobieller Assay

Der antimikrobielle Assay wurde mit ausdifferenzierten primären Atemwegsepithelzellen in *air liquid interface* Kultur durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur Ausdifferenzierung in 24-Lochplatten wie unter 3.2 beschrieben kultiviert. Die Bakterien wurden wie unter 3.1 beschrieben angezogen und die Bakteriensuspension in PBS so verdünnt, dass die gewünschte Bakterienmenge in 40µl enthalten war. Vor der Infektion wurden die Zellen für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium vorinkubiert. Die Infektion erfolgte von apikal mit $5x10^4$ Bakterien durch vorsichtiges auftropfen der Bakteriensuspension. Die Kontrollen wurden mit 40µl PBS ohne Bakterien behandelt. Nach 8 Stunden wurden die Zellen apikal mit 100µl PBS gespült. Um die Anzahl der noch lebenden Bakterien zu bestimmen, wurden geeignete Verdünnungen der Spülung auf Agarplatten ausgestrichen und diese bei 37°C inkubiert bis Kolonien zu erkennen waren und diese dann ausgezählt. Die Konzentration von IL-8 und IL-6 im Medium wurde Mittels ELISA bestimmt.

3.9 Kokultur von Epithelzellen und Makrophagen

Für die Kokultur Versuche wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit primären Makrophagen (siehe 3.5) und die Zelllinie A549 mit PMA-U937 Makrophagen (siehe 3.1) kokultiviert. Dafür wurden jeweils $1x10^6$ Epithelzellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und nach 24 Stunden pro Loch $1x10^5$ Makrophagen dazugegeben. Diese Kokultur wurde dann für 24 Stunden mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 bzw. *S. pneumoniae* PN36 stimuliert und im Anschluss die IL-6 Konzentration im Medium mittels ELISA bestimmt. Um NF-kB in den Zellen auszuschalten, wurden die Zellen zuerst für 1 Stunde mit 30µM Isohelenalin (irreversibler NF-kB-Inhibitor; EMD Biosciences, La Jolla, USA) vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in die Kokultur eingebracht.

3.10 Isolation von RNA und RT-PCR

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus humanen und murinen Zellen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Ein DNA-Verdau erfolgte während der Isolation der RNA auf der Säule mit Hilfe des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für die reverse Transkription wurden 1,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die cDNA mit einem cDNA Synthese Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mittels oligo$(dT)_{18}$ Primern synthetisiert. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt und jeweils 5 µl in jeder PCR-Reaktion (25 µl Gesamtvolumen) eingesetzt. Für die PCR-Ansätze wurde ein SYBR Green PCR Mix (ABgene, Hamburg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Folgendes Protokoll wurde für alle PCR´s angewendet: 15 Minuten 95°C; 40 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und 45 Sekunden 60°C; eine Minute 95°C; eine Minute 55°C; Schmelzkurve (55°C bis 94°C in 0,5°C Schritten). In Tabelle 3 sind alle verwendeten Primer (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) aufgeführt. Die realtime PCR-Reaktionen wurde in einem ICycler (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden –RT-Proben und Wasser mitgeführt. Die relative Expression normalisiert auf ß-Actin wurde mittels der ΔΔCT Methode berechnet (Heid et al., 1996; Livak and Schmittgen, 2001). Die PCR-Effizienz war für alle Reaktionen vergleichbar.

Tab. 3: Verwendete Primer

Ziel Gen	5`-Primer	3`-Primer
TLR 2	GAGAGTGGGAAATATGGACACCTT	GCAGTTCCAAACATTCCACG
TLR 3	CCTGCAGCTGACTAGGAACT	TGCTGCAAATCGAGAATTT
TLR 5	GAAAACCGCATTGCCAATAT	GGCCACCTCAAATACTGCTG
hBD-1	GCCTCAGGTGGTAACTTTCTCA	GCGTCATTTCTTCTGGTCACT
hBD-2	TCAGCTCCTGGTGAAGCTC	GGGCAAAAGACTGGATGACA
hBD-3	TATTATTGCAGAGTCAGAGGCG	CACTCTCGTCATGTTTCAGGG
IP-10	TGAAATTATTCCTGCAAGCCAA	CAGACATCTCTTCTCACCCTTCTTT
IFN-beta	CAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGC	TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT
beta-Actin	AGCCTCGCCTTTGCCGA	CTGGTGCCTGGGGCG

Für die RNA-Isolation aus *Aspergillus fumigatus* Konidien wurden diese mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Aus den zerkleinerten Konidien wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) die Gesamt-RNA

isoliert. Ein DNA-Verdau erfolgte während der Isolation der RNA auf der Säule mit Hilfe des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland). In einigen Versuchen wurde die Konidien-RNA mit RNase I bzw. RNase III (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verdaut.

3.11 ELISA („enzyme linked immuno sorbent assay“)

Die Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen sowie in BALF und Lungenhomogenisaten von Mäusen wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA Kits nach Anleitung des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bestimmt. Folgende humane Zytokine wurden mittels ELISA nachgewiesen: IL-6, IL-8, IP-10, IL-1ß und TNF-α. Zudem wurde die Konzentration der folgenden murinen Zytokine im ELISA gemessen: IL-1ß, IL-6, KC und TNF-α.

3.12 FACS („fluorescence-activated cell sorting“) Analyse

Die Quantifizierung von TLR2 und TLR5 wurde mittels FACS Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden primäre Atemwegsepithelzellen wie unter 3.3 (Stimulation mit Makrophagen-Medium) stimuliert. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen verwendet. Nach der Stimulation wurde das Medium entfernt und die adherenten Zellen durch Inkubation mit PBS+EDTA 3,7% bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden vereinigt, mit FACS Puffer (PBS, 1 % FCS, 0,1 % NaN_3) gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden folgende Antikörper oder die entsprechenden Isotypkontrollen dazugegeben: Phycoerythrin (PE) gekoppelter anti-TLR2 bzw. anti-TLR5 (eBioscience, San Diego, USA). Zusätzlich wurde von jeder Probe eine Kontrolle ganz ohne Antikörper mitgeführt. Die Proben wurden für 30-60 Minuten im Dunkeln bei RT mit den Antikörpern inkubiert. Dann wurden sie mit FACS-Puffer gewaschen, in FACS-Puffer oder Cell Fix (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen und in einem FACSort Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) der FACS-Analyse unterzogen. Die Auswertung wurde mit Hilfe der frei verfügbaren WinMDI 2.8 Software (Joseph Trotter; http://facs.scripps.edu/software.html) gemacht.

3.13 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden LysMcre/p65$^{lox/lox}$- bzw. als Kontrollen LysMcre/p65$^{wt/wt}$-Mäuse verwendet. Die LysMcre/p65$^{lox/lox}$-Mäuse tragen die Information für die Cre-Rekombinase in ihrem Lysozym M Locus und zusätzlich ein mit *loxP* Sequenzen flankiertes Gen der NF-*k*B Untereinheit p65 (Clausen et al., 1999). Diese Kombination ermöglicht es, mittels des Cre/*loxP*-Rekombinationssystems (Kuhn et al., 1995; Rajewsky et al., 1996) das p65 Gen selektiv in myeloischen Zellen auszuschalten und somit NF-*k*B in diesen Zellen irreversibel zu inhibieren. Die Kontrolltiere tragen das Wildtyp-Gen für p65, welches durch die Cre-Rekombinase nicht beeinflusst wird. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch Isolation von DNA aus den Schwanzspitzen und Analyse der entsprechenden Gene durch PCR. Dafür wurden das REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und folgende Primer verwendet: 5´-GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC-3´und 5´-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3´ für LysMcre sowie 5´-GAGCGCATGCCTAGCACCAG-3´ und 5´-GTGCACTGCATGCGTGCAG-3´ für p65 (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland). Die Mäuse wurden unter SPF- („specific pathogen free“) Bedingungen im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps-Universität Marburg gehalten und erhielten endotoxinfreies Standardfutter. Um Tiere mit gleichem genetischem Hintergrund zu erhalten wurden LysMcre/p65$^{lox/wt}$-Tiere verpaart und für die Versuche nur gleichgeschlechtliche Wurfgeschwister mit den benötigten Genotypen (p65$^{lox/lox}$ und p65$^{wt/wt}$) verwendet. Für die Infektionsversuche wurden sowohl Männchen wie auch Weibchen im Alter zwischen zwei und vier Monaten verwendet. Für die Isolation von Makrophagen aus der Bauchhöhle wurden Mäuse im Alter von bis zu einem Jahr verwendet. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Giessen genehmigt.

3.13.1 Infektion und Präparation von Mäusen

Sämtliche Infektionsversuche wurden mit vier Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die Infektion der Tiere erfolgte durch intranasale Applikation der Bakterien. Die Tiere wurden durch intraperitoneale (i. p.) Injektion von 2,5 mg Ketaminhydrochlorid/Ketanest (Parke Davis, Berlin, Deutschland) und 0,18 mg Xylazinhydrochlorid/Rompun (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) betäubt und an den Schneidezähnen an einem gespannten Draht aufgehängt. Die Bakterien wurden wie unter 3.1 beschrieben angezogen und die Bakteriensuspension in PBS so verdünnt, dass die gewünschte Infektionsdosis in 40 µl PBS enthalten war. Diese wurde in jeweils 10 µl Schritten den Mäusen in die Nasenlöcher geträufelt. Nach 24 Stunden wurden

die Tiere betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Luftröhre wurde punktiert und die bronchoalveoläre Lavage (BAL) durch Spülung der Lunge mit 5 x 1 ml PBS durchgeführt. Die BAL wurde aufgefangen und bis zur Bestimmung der Zellzahl und Herstellung von Zytospins (siehe 3.16) auf Eis gelagert. Anschließend wurden Lunge und Luftröhre entnommen. Die rechten Lungenlappen wurden für die Ermittlung der Bakterienzahl (siehe 3.15) in 1 ml PBS homogenisiert und auf Eis gestellt.

3.13.2 Bestimmung der Bakterienzahl in der Lunge

Für die Ermittlung der Bakterienzahl wurden geeignete Verdünnung der Lungenhomogenisate hergestellt und diese auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert bis Kolonien sichtbar waren. Anhand der Kolonienzahl wurde dann die Anzahl lebender Bakterien pro ml Lungenhomogenisat errechnet. Der Rest der Lungenhomogenisate wurde abzentrifugiert und die Überstände für eine spätere Bestimmung der Zytokinkonzentration bei -80 °C gelagert.

3.13.3 Aufbereitung der BAL

Die Bestimmung der Zellzahl sowie die Herstellung der Zytospins für die Differentialzellzählung erfolgten unmittelbar nach der Lungenspülung. Die Zellen der BAL wurden herunterzentrifugiert (4°C, 10 min, 900 upm) und die Überstände (BALF) für spätere ELISA-Analysen (siehe 3.11) bei -80°C gelagert. Die Zellpellets wurden in 1 ml PBS aufgenommen. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit Kristallviolettlösung (50 mg Kristallviolett, 0,5 ml Eisessig in 10 ml H_2O) verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für die Herstellung der Zytopräparate wurden 100000 - 200000 Zellen in einer Zytozentrifuge für 10 Minuten bei 500 upm auf Objektträger zentrifugiert. Diese wurden über Nacht an der Luft getrocknet und dann durch eine panoptische Zellfärbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung) angefärbt. Dazu wurden die Präparate fünf Minuten in May-Grünwald-Färbelösung inkubiert, zweimal mit Leitungswasser gespült, 20 Minuten in Giemsa-Gebrauchslösung inkubiert und in Leitungswasser gewaschen. Sie wurden getrocknet und mit Corbit eingedeckelt. Von jedem Präparat wurden 150-200 Zellen ausgezählt wobei die Anzahl der verschiedenen Zelltypen bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt wurde. Der prozentuale Anteil jedes Zelltyps wurde mit der jeweiligen Gesamtzellzahl multipliziert und so die Anzahl der verschiedenen Zelltypen in der BAL erhalten.

3.14 Statistische Auswertung

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

4 Ergebnisse

4.1 Die Kokultur mit Makrophagen verstärkt die Reaktion der Epithelzellen bei einer bakteriellen Infektion

Während einer Infektion stehen Atemwegsepithelzellen und Makrophagen in unmittelbarem Kontakt zueinander. Um diese Situation auch *in vitro* zu simulieren und um den Einfluss dieses Zell-Zell-Kontaktes untersuchen zu können, wurde ein Kokulturmodell etabliert. Um die Infektion zu simulieren, wurden die Zellen in der Kokultur mit hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert. Für die Stimulation wurde zum einen der *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sowie der *Streptococcus pneumoniae* PN36 verwendet. Die Auswahl der verwendeten Bakterien erfolgt unter zwei Gesichtspunkten. Von beiden Bakterien bekannt, dass sie in der Lage sind sehr schwerwiegende Entzündungen der Atemwege verursachen (Wilson and Dowling, 1998; Niroumand and Grossman, 1998). Zudem konnte durch diese Auswahl die Reaktion sowohl auf grampositive (PN36) als auch gramnegative (PAO1) Bakterien untersucht werden. Als Parameter für die Entzündungsreaktion wurde die IL-6 Konzentration im zellfreien Überstand mittels ELISA gemessen. Makrophagen produzieren selber nur sehr geringe Mengen IL-6 (Fujiwara and Kobayashi, 2005), weshalb sich dieses Zytokin sehr gut eignet, die Reaktion der Epithelzellen zu messen.

4.1.1 Die IL-6 Konzentration in der Kokultur ist nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* deutlich erhöht

Zu Beginn sollte geklärt werden, ob Makrophagen die Reaktion der Epithelzellen bei einer bakteriellen Infektion verändern können. Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen mit zu Makrophagen differenzierten U937-(PMA-U937) Zellen (siehe 3.1) kokultiviert und mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) Bakterien stimuliert. Der Versuch wurde in gleicher Weise mit primären Atemwegsepithelzellen in Kokultur mit zu Makrophagen differenzierten primären Monozyten durchgeführt. Als Kontrollen wurden Epithelzellen und Makrophagen auch als Monokulturen mit *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 stimuliert. Abbildung 4 zeigt eine vergleichbare Reaktion der A549- bzw. der primären Atemwegsepithelzellen auf die Kokultur mit PMA-U937 bzw. Makrophagen sowie die Stimulation mit hitzeinaktivierten Pseudomonaden. Die A549-Zellen sowie die primären Atemwegsepithelzellen waren in Monokultur gut mit *P. aeruginosa* PAO1 stimulierbar,

während bei den in Monokultur kultivierten und mit Bakterien stimulierten PMA-U937 bzw. Makrophagen keine Veränderung der IL-6 Konzentration im Medium gemessen werden konnte. Im Medium der mit PAO1 stimulierten Kokultur wurde eine, gegenüber den Kontrollen, deutlich höhere IL-6 Konzentration gemessen (Abb. 4).

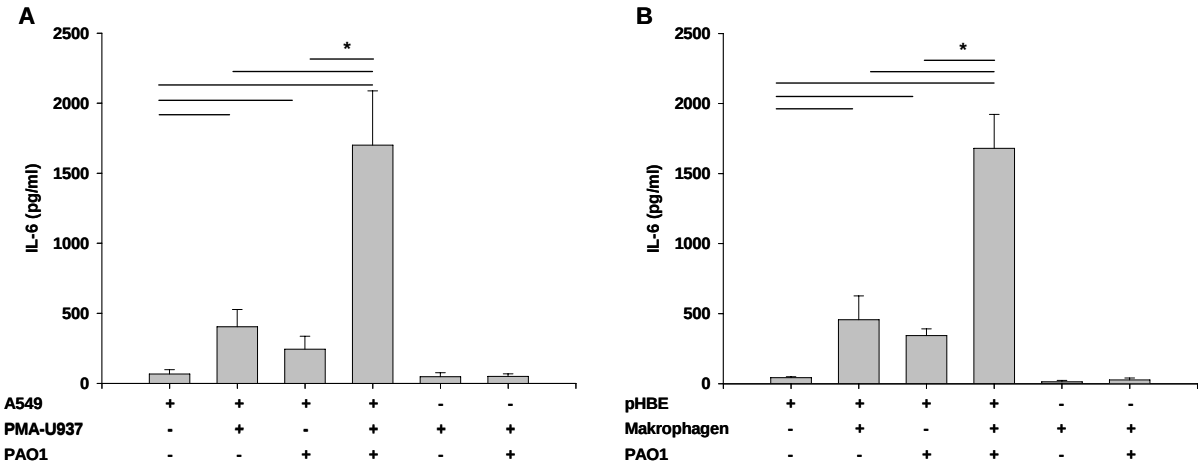

Abb. 4: IL-6 Konzentration der Zellen in Kokultur nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A) A549 Zellen ($1x10^6$) wurden mit PMA aktivierten U937 (PMA-U937) ($1x10^5$) und B) primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) ($1x10^6$) mit aus primären Monozyten generierten Makrophagen ($1x10^5$) kokultiviert. 18 h nach Stimulation mit einer 1:10 Verdünnung hitzeinaktiviertem PAO1 (OD_{600}= 0,8) wurde die Konzentration von IL-6 im Medium mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Die Kokultur alleine führte ebenfalls zu einer gesteigerten IL-6 Sekretion, was als Hinweis darauf gewertet wurde, dass die Makrophagen alleine schon einen aktivierenden Einfluss auf die Epithelzellen haben.

4.1.2 Makrophagen sensibilisieren das Atemwegsepithel für die Erkennung von Streptococcus pneumoniae

In früheren Stimulationsversuchen (Daten nicht gezeigt) hat sich gezeigt, dass Atemwegsepithelzellen nicht auf eine *in vitro* Stimulation mit Grampositiven Bakterien reagieren. Aufbauend auf die mit *P. aeruginosa* PAO1 Stimulation erzielten Ergebnisse, sollte nun überprüft werden, ob die Kokultur auch Einfluss auf die Reaktion der Epithelzellen bei einer Infektion mit Grampositiven Bakterien hat. Dafür wurden wiederum A549-Zellen mit PMA-U937 bzw. primäre Atemwegsepithelzellen mit aus primären Monozyten generierten Makrophagen kokultiviert und mit hitzeinaktiviertem *Streptococcus pneumoniae* PN36

stimuliert. Erwartungsgemäß war keine gesteigerte IL-6-Abgabe der Atemwegsepithelzellen in Monokultur nach Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* PN36 feststellbar (Abb. 5).

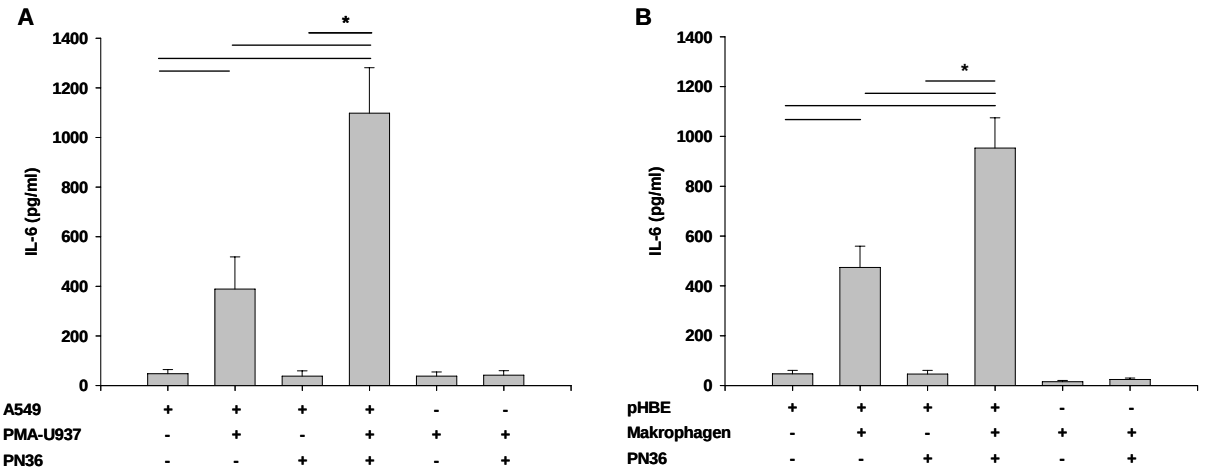

Abb. 5: IL-6 Konzentration der Zellen in Kokultur nach Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* PN36. A) A549 Zellen ($1x10^6$) wurden mit PMA aktivierten U937 (PMA-U937) ($1x10^5$) und B) primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) ($1x10^6$) mit aus primären Monozyten generierten Makrophagen ($1x10^5$) kokultiviert. 18 h nach Stimulation mit einer 1:10 Verdünnung hitzeinaktiviertem PN36 (OD_{600}= 0,3) wurde die Konzentration von IL-6 im Medium mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Analog den Versuchen mit *P. aeruginosa* PAO1 konnte in der Kokultur eine deutlich erhöhte Sekretion von IL-6 nach der Stimulation mit *S. pneumonia* PN36 gemessen werden. Die in Monokultur gehaltenen Makrophagen zeigten keine Reaktion auf die Stimulation mit Streptokokken. Auch hier waren die Ergebnisse für Zelllinien und primäre Zellen vergleichbar.

4.1.3 Die Sensibilisierung der Atemwegsepithelzellen durch Makrophagen ist abhängig von NF-kB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation vieler an der Entzündungsreaktion beteiligten Prozesse (Tak and Firestein, 2001; Xiao and Ghosh, 2005). Deshalb sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob an dem in der Kokultur beobachteten Effekt ebenfalls NF-κB-abhängige Prozesse beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung von NF-κB mit Hilfe des NF-κB-Inhibitors Isohelenalin unterbunden.

Die Versuche wurden wieder mit Zelllinien und primären Zellen durchgeführt. Zuerst wurde NF-κB in den Makrophagen ausgeschaltet. Hierzu wurden die Zellen für eine Stunde mit Isohelenalin (30µM) vorinkubiert und anschließend in die Kokultur mit den Epithelzellen eingebracht. Im Anschluss wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert und die IL-6 Konzentration im Medium bestimmt (Abb. 6). Die Reaktion war für Zelllinien und primäre Zellen vergleichbar. Deshalb sind in Abbildung 6 nur die Ergebnisse der primären Zellen dargestellt.

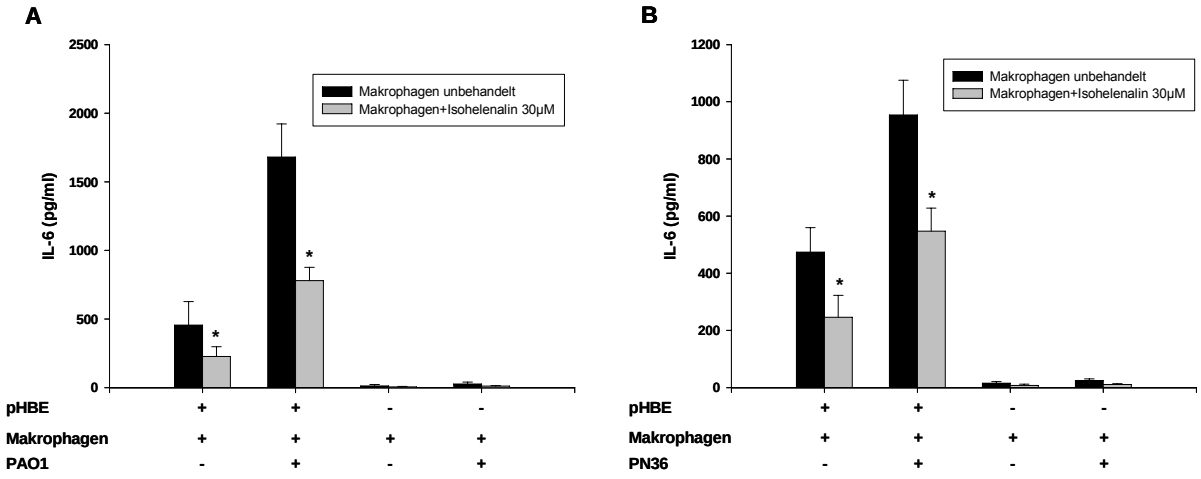

Abb. 6: Einfluss der NF-κB Inhibition in den Makrophagen auf die IL-6 Konzentration. Aus primären Monozyten generierte Makrophagen wurden vor dem Einbringen in die Kokultur für eine Stunde mit der angegebenen Konzentration des NF-κB-Inhibitors Isohelenalin inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 18 Stunden mit A) einer 1:10 Verdünnung hitzeinaktiviertem PAO1 (OD_{600}= 0,8) oder B) einer 1:10 Verdünnung hitzeinaktiviertem PN36 (OD_{600}= 0,3) stimuliert. Die Konzentration von IL-6 im Medium wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den nicht mit Isohelenalin behandelten Kokulturen von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Die Inhibition von NF-kB in den Makrophagen führte zu einer deutlich geringeren IL-6 Abgabe nach Stimulation verglichen mit der unbehandelten Kokultur. Bei der unstimulierten Kokultur wurde die Konzentration an IL-6 in Bezug zur Referenz ebenfalls gesenkt. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Inhibition von NF-kB in den Epithelzellen hat, wurde NF-kB in den Atemwegsepithelzellen ebenfalls durch einstündige Vorinkubation mit Isohelenalin inhibiert. Durch das Ausschalten von NF-kB in den Epithelzellen konnte die IL-6 Abgabe sowohl in der stimulierten als auch in der unstimulierten Kokultur fast vollständig unterbunden werden (Abb. 7). Auch bei den in Monokultur mit Bakterien stimulierten

Epithelzellen konnte keine Änderung gegenüber der unstimulierten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 7).

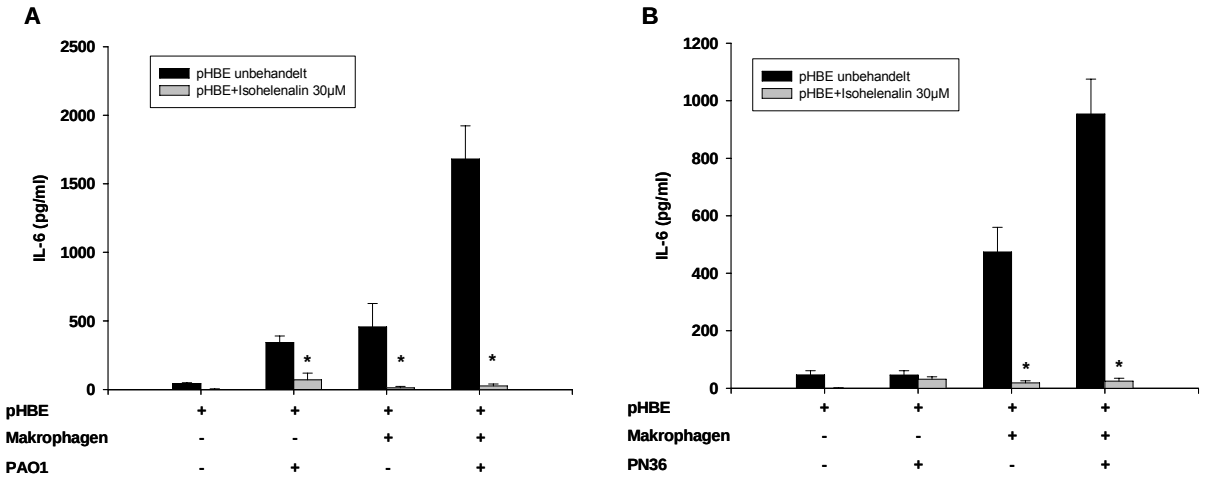

Abb. 7: Einfluss der NF-κB Inhibition in den Epithelzellen auf die IL-6 Konzentration. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden vor dem Einbringen in die Kokultur für eine Stunde mit der angegebenen Konzentration des NF-κB-Inhibitors Isohelenalin inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 18 Stunden mit A) einer 1:10 Verdünnung hitzeinaktiviertem PAO1 (OD_{600}= 0,8) oder B) einer 1:10 Verdünnung hitzeinaktiviertem PN36 (OD_{600}= 0,3) stimuliert. Die Konzentration von IL-6 im Medium wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den nicht mit Isohelenalin behandelten Kokulturen von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

4.2 Durch Inkubation mit Makrophagen-Medium wird die Reaktion der Epithelzellen verstärkt

Die Ergebnisse der Kokultur zeigten, dass die Makrophagen aktivierend auf die Epithelzellen wirken und, dass dieser Einfluss zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, in diesem Fall durch gesteigerte IL-6 Abgabe repräsentiert, führt. Als nächstes sollte überprüft werden, ob für diesen Effekt der direkte Zellkontakt notwendig ist oder, ob er durch lösliche Mediatoren im Medium verursacht wird. Zu diesem Zweck sollten die Atemwegsepithelzellen mit Medium von kultivierten Makrophagen vorinkubiert und nach anschließender Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien die Entzündungsreaktion quantifiziert werden.

4.2.1 Makrophagen geben mehr Zytokine ab wenn sie mit LPS stimuliert werden

Makrophagen produzieren eine Vielzahl regulatorisch aktiver Substanzen, u. a. die proinflammatorischen Zytokine IL-8, TNF-α, IL-1β und IFN-γ. Deshalb sollte zunächst getestet werden, wie sich die Abgabe dieser Substanzen bei einer bakteriellen Infektion verändert. Dafür wurden PMA-U937-Zellen und zu Makrophagen differenzierte primäre Monozyten mit LPS stimuliert. Im Anschluss wurde die Konzentration von IL-8, TNF-α, IL-1β und IFN-γ im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt und mit der unstimulierten Kontrolle verglichen.

Zytokin/Chemokin	PMA-U937		Mø	
		LPS (100ng/ml)		LPS (100ng/ml)
IL-8 (pg/ml)	987 ± 245	12097 ± 3134	742 ± 209	11457 ± 2109
TNF-α (pg/ml)	576 ± 197	5432 ± 1298	478 ± 121	4493 ± 967
IL-1β (pg/ml)	61 ± 24	585 ± 145	45 ± 13	637 ± 98
IFN-γ (pg/ml)	n.M.	n.M.	n.M.	n.M.

Tab. 4: Zytokin/Chemokin Abgabe von unstimulierten und LPS stimulierten Makrophagen. PMA aktivierte U937-Zellen (PMA-U937) und primäre Makrophagen (Mø) wurden für 24 Stunden mit 100ng/ml LPS (E.coli; Ultra Pure 0111:B4) stimuliert. Die Konzentration der angegebenen Zytokine/Chemokine im Medium wurde mittels ELISA bestimmt und mit der Konzentration im Medium unstimulierter Zellen verglichen (n.M = nicht messbar).

Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass unstimulierte Makrophagen unter diesen Kulturbedingungen schon IL-8 und TNF-α abgegeben hatten, während IFN-γ und IL-1β nicht beziehungsweise nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Nach LPS-Stimulation war eine deutlich erhöhte Abgabe von IL-8, TNF-α und IL-1β festzustellen. Eine IFN-γ Abgabe konnte auch nach LPS Stimulation nicht gemessen werden. Da die Zytokinkonzentration im Medium von PMA-U937-Makrophagen und primären Makrophagen vergleichbar war, wurde aufgrund der besseren Verfügbarkeit für alle weiteren Versuch das Medium der PMA-U937-Makrophagen verwendet und wird im Folgenden als Makrophagen-Medium bezeichnet.

4.2.2 Atemwegsepithelzellen reagieren nicht auf Stimulation mit LPS

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der folgenden Versuche durch das im Makrophagen-Medium enthaltene LPS beeinflusst wurden, wurde zunächst die Reaktion der Epithelzellen auf LPS-Stimulation überprüft. Dafür wurden A549- und primäre Atemwegsepithelzellen, unter denselben Bedingungen wie die Makrophagen mit LPS stimuliert und die Konzentration von IL-8, TNF-α, IL-1β und IFN-γ im Medium mittels ELISA gemessen. Dabei zeigte sich, dass weder die A549-Zellen noch die primären Epithelzellen auf die Stimulation mit LPS reagierten (Daten nicht gezeigt). Selbst höhere LPS-Konzentration (1-10µg/ml) führten zu keiner messbaren Veränderung der Zytokinkonzentrationen (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Beeinflussung der Epithelzellen durch das im Makrophagen-Medium enthaltene LPS kommt.

4.2.3 Vorinkubation der Epithelzellen mit Makrophagen-Medium verstärkt die Reaktion auf Grampositive - und Gramnegative Bakterien

Es hat sich gezeigt, dass Makrophagen nach LPS Stimulation große Mengen Zytokine abgeben. In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden ob, sich der in der Kokultur beobachtete aktivierende Effekt auf die Atemwegsepithelzellen durch vermehrte Abgabe dieser Zytokine erklären lässt. Zu diesem Zweck wurden primäre Atemwegsepithelzellen und A549-Zellen mit Medium von LPS stimulierten Makrophagen für 18 Stunden vorinkubiert und im Anschluss für 6 Stunden mit hitzeinaktiviertem *P. aeruginosa* PAO1 bzw. *S. pneumoniae* PN36 stimuliert. Zwischen Vorinkubation und Stimulation wurde das Medium gewechselt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass in den anschließenden ELISA-Messungen nur die von den Epithelzellen abgegebenen Zytokine gemessen wurden. Da in der Kokultur ohne bakterielle Stimulation auch schon eine verstärkte IL-6-Abgabe gemessen werden konnte, wurde der Einfluss der ruhenden Makrophagen auf die Epithelzellen ebenfalls untersucht. Dafür wurden sämtliche Versuche auch mit Medium von nicht LPS stimulierten Makrophagen durchgeführt.

4.2.3.1 Vorinkubation der Epithelzellen mit Makrophagen-Medium verstärkt die Zytokin-/Chemokin-Abgabe nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien

Es zeigte sich, dass die Vorinkubation mit Makrophagen-Medium allein sowohl in den A549 als auch in den primären Atemwegsepithelzellen zu einer gesteigerten Abgabe von IL-8 und IL-6 führte. Der Effekt wurde durch das Medium der LPS stimulierten Makrophagen nochmals verstärkt. Die Stimulation mit *P. aeruginosa* PAO1 hatte ebenfalls eine vermehrte Abgabe von IL-8 und IL-6 zur Folge (Abb. 8A und B). Die Reaktion der Zellen auf *P. aeruginosa* PAO1 konnte durch das Makrophagen-Medium deutlich verbessert werden.

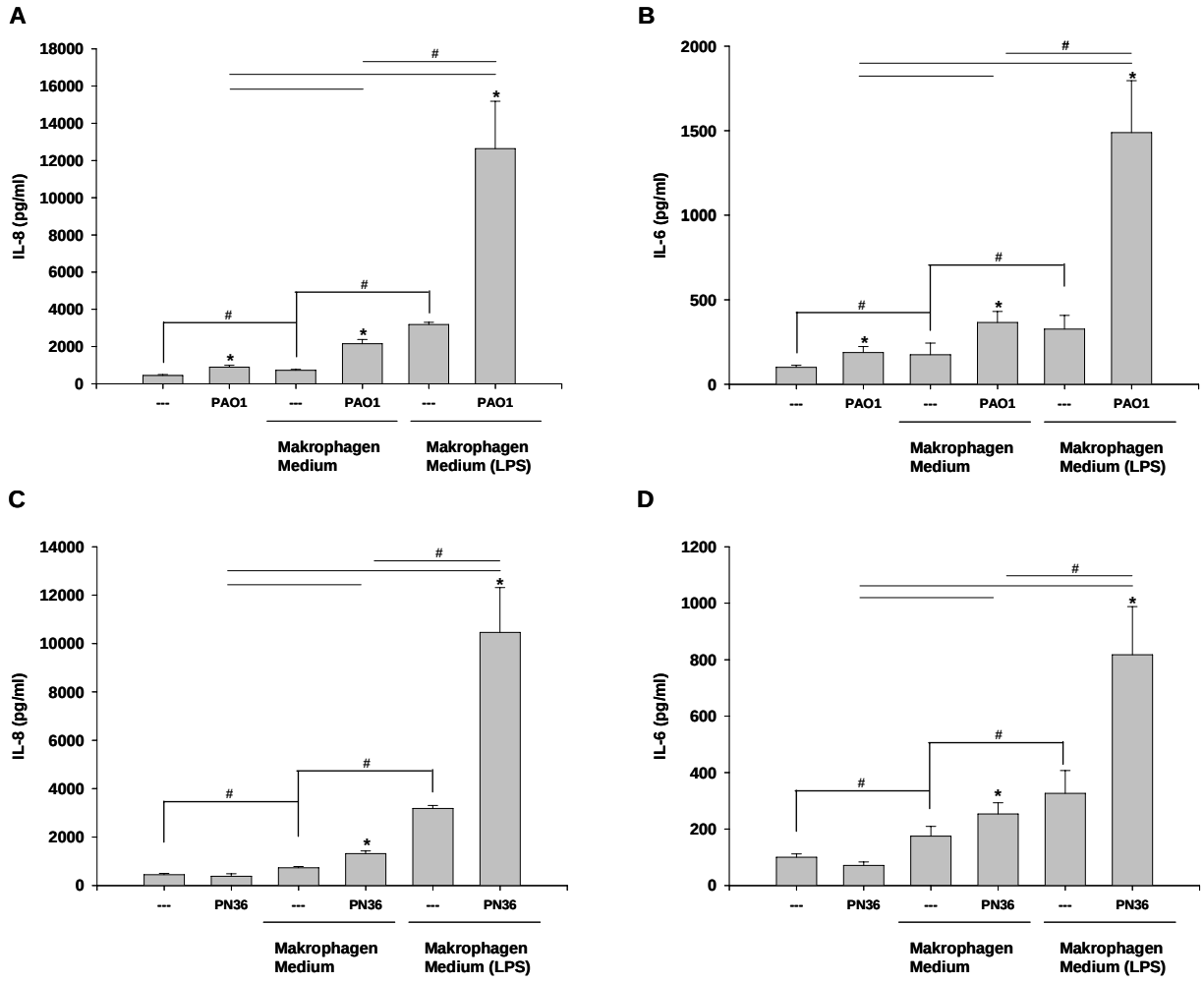

Abb. 8: Vorinkubation mit Makrophagen-Medium verstärkt die Reaktion auf Bakterien. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium oder dem Medium LPS stimulierter Makrophagen (LPS) vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit einer 1:10 Verdünnung von PAO1 (OD_{600} = 0,8) (A, B) bzw. PN36 (OD_{600} = 0,3) (C, D) stimuliert. Die Konzentration von IL-8 (A, C) und IL-6 (B, D) im Medium wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit # markiert. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen nicht stimulierten Kontrolle (---) von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Die Abgabe von IL-8 und IL-6 wurde signifikant verstärkt. Auch dieser Effekt wurde durch das Medium der LPS stimulierten Makrophagen nochmals eindeutig gesteigert. Die nicht mit Makrophagen-Medium vorbehandelten Zellen zeigten erwartungsgemäß keine Reaktion auf die Stimulation mit *S. pneumoniae* PN36. Überraschenderweise reagierten die Zellen nach Vorinkubation mit Makrophagen-Medium auch auf die Stimulation mit *S. pneumoniae* PN36 mit der Abgabe von IL-8 und IL-6 (Abb. 8 C und D). Wiederum zeigte das Medium der LPS stimulierten Makrophagen den größeren Effekt. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse sind in Abbildung 8 nur die Daten für die primären Epithelzellen gezeigt.

4.2.3.2 Die Expression von humanen Beta-Defensinen wird verstärkt

Atemwegsepithelzellen beeinflussen den Verlauf einer bakteriellen Entzündung nicht nur durch die Sekretion von proinflammatorischen Substanzen wie IL-8 und IL-6. Sie sind durch die Abgabe antimikrobieller Peptide (AMP), wie zum Beispiel β-Defensinen, direkt an der Abtötung der schädlichen Keime beteiligt. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die Vorinkubation mit Makrophagen-Medium auch Einfluss auf die Defensin-Expression während einer bakteriellen Infektion hat. Dazu wurde aus den Zellen der zuvor durchgeführten Versuche (siehe 4.2.2.1) die Gesamt-RNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 verglichen. Nach Vorinkubation mit den Makrophagen-Medien konnte eine verstärkte Expression von hBD-2 und hBD-3 gemessen werden (Abb. 9). Dabei zeigte das Medium der LPS stimulierten Makrophagen einen stärkeren Effekt als das Medium der unstimulierten Makrophagen. Durch Stimulation mit *P. aeruginosa* PAO1 allein konnte die Expression von hBD-2 ebenfalls induziert werden (Abb. 9 A). Die Kombination aus Makrophagen-Medien und anschließender Stimulation der Zellen mit *P. aeruginosa* PAO1, führte zu einer deutlich erhöhten Expression von hBD-2. Die hBD-3 Expression konnte durch *P. aeruginosa* PAO1 nicht induziert werden. Auch nach Vorinkubation der Zellen mit Makrophagen-Medium war hBD-3 durch *P. aeruginosa* PAO1 nicht induzierbar (Abb. 9 C). Durch Stimulation mit *S. pneumoniae* PN36 konnte weder die hBD-2- noch die hBD-3-Expression induziert werden (Abb. 9 B). Interessanterweise konnte nach der Vorinkubation mit Makrophagen-Medium sowohl die hBD-2- und hBD-3-Expression durch die Stimulation mit PN36 induziert werden. In allen Fällen zeigte das Medium der LPS stimulierten Makrophagen die größere Effektivität. Für hBD-1 ist bekannt, dass es in der Lunge konstitutiv exprimiert wird und auch während einer bakteriellen Infektion nicht induziert wird. Dementsprechend wurde die Expression von hBD-1 durch

keine der Stimulationsbedingungen beeinflusst (Daten nicht gezeigt) (McCray, Jr. and Bentley, 1997).

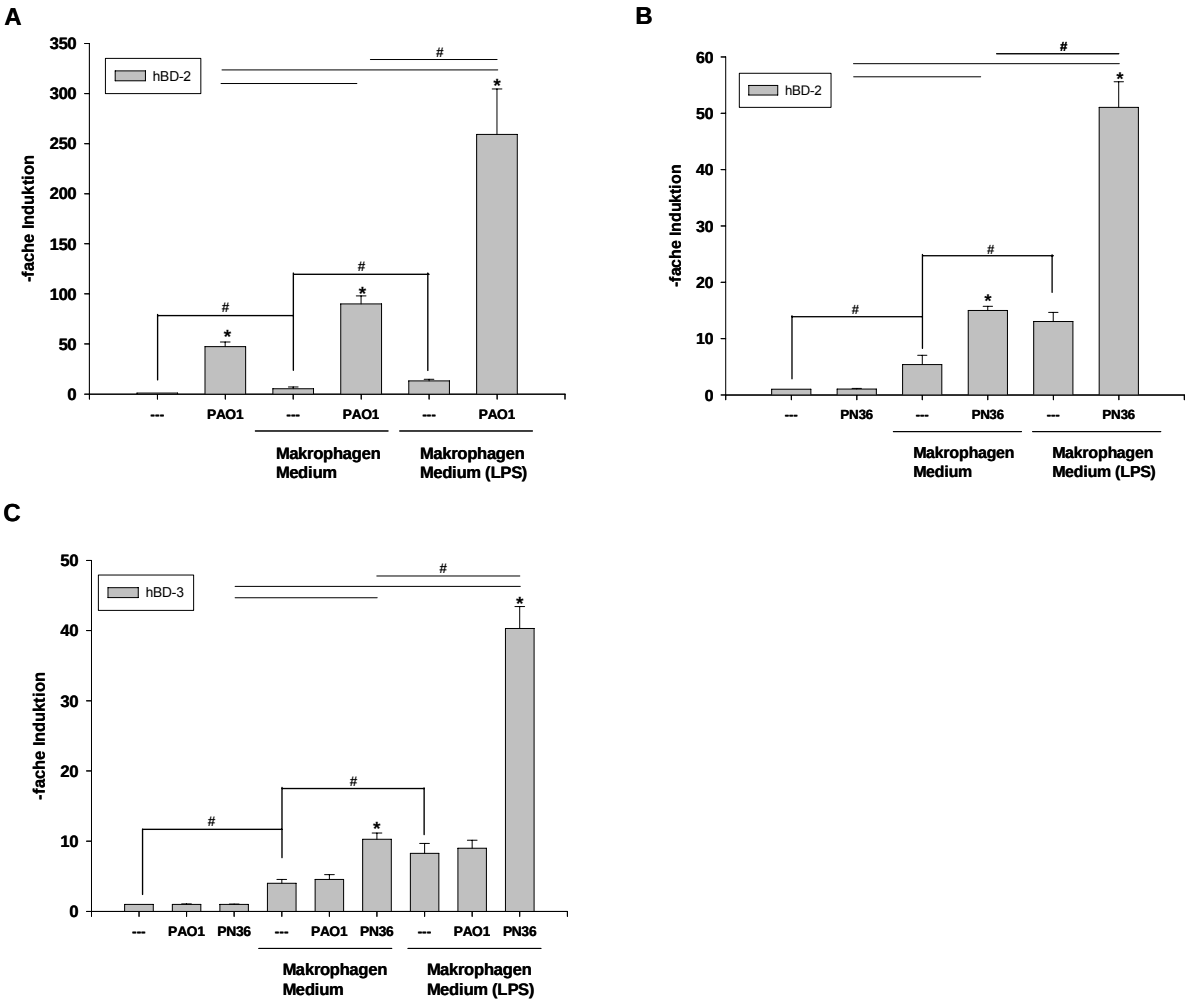

Abb. 9: Vorinkubation mit Makrophagen-Medium verstärkt die durch Bakterien-Stimulation induzierte Defensin-Expression. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium oder dem Medium LPS stimulierter Makrophagen (LPS) vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit einer 1:10 Verdünnung von PAO1 (OD_{600} = 0,8) bzw. PN36 (OD_{600} = 0,3) stimuliert. Die Induktion von hBD-2 (A, B) und hBD-3 (C) gegenüber den nicht stimulierten Referenz-Zellen. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit # markiert. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen nicht stimulierten Kontrolle (---) von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Diese Daten zeigen, dass durch das Makrophagen-Medium die Reaktion der Epithelzellen auf eine bakterielle Infektion verbessert wird. Auffällig war dabei die unterschiedliche Wirksamkeit der beiden verwendeten Makrophagen-Medien.

4.2.4 Die Abwehr einer bakteriellen Infektion wird durch die Vorinkubation der Epithelzellen mit Makrophagen-Medium verstärkt

Die Beobachtung, dass Atemwegsepithelzellen nach der Inkubation mit Makrophagen-Medium mit einer deutlich verstärkten Defensin-Expression auf die Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien reagierten, führte zu der Frage, ob durch das Makrophagen-Medium auch ihre Fähigkeit Bakterien abzutöten verbessert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein antimikrobieller Assay durchgeführt. Dafür wurden ausdifferenzierte primäre Atemwegsepithelzellen in *air liquid Interface* (ALI) Kultur mit Makrophagen-Medium bzw. Medium von LPS stimulierten Makrophagen vorinkubiert und im Anschluss apikal mit lebenden *P. aeruginosa* PAO1 ($5x10^3$) bzw. *S. pneumoniae* PN36 ($5x10^4$) infiziert. Als Kontrolle wurden nicht mit Makrophagen-Medium vorinkubierte ALI-Kulturen mit den Bakterien infiziert. Als zusätzliche Kontrolle wurden ALI-Kulturen mit Medium, das die gleiche Menge LPS enthält wie das Medium der LPS stimulierten Makrophagen, vorinkubiert und mit Bakterien infiziert. Dadurch sollte ein möglicher Einfluss des LPS überprüft werden. Nach 8 Stunden wurde die Anzahl der noch lebenden Bakterien bestimmt. Die Bakterienzahl konnte sowohl bei der PAO1- als auch der PN36-Infektion durch Vorinkubation mit Medium der LPS stimulierten Makrophagen signifikant reduziert werden (Abb. 10).

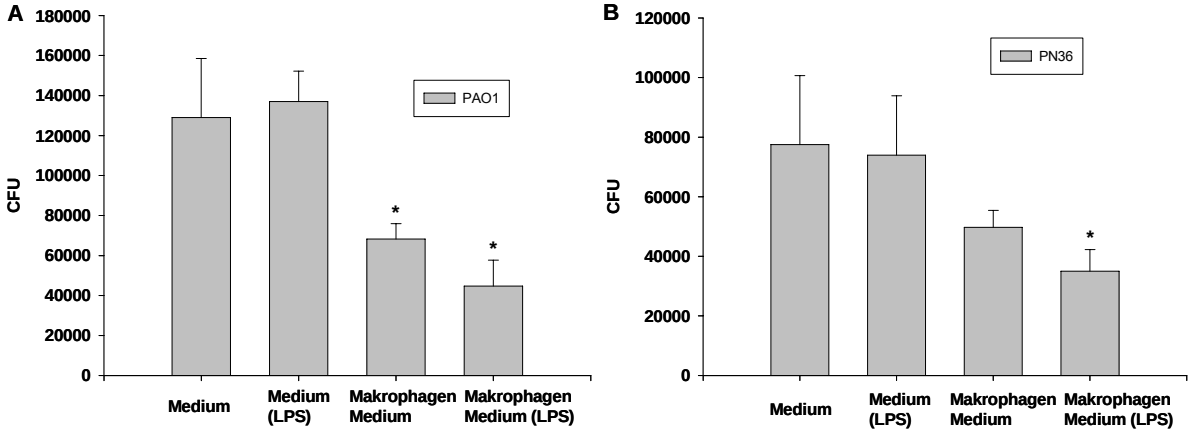

Abb. 10: Makrophagen-Medium verstärkt die antimikrobielle Aktivität der Epithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in *air liquid interface* Kultur wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium vorinkubiert und im Anschluss mit A) P.aeruginosa PAO1 bzw. B) *S. pneumoniae* PN36 infiziert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen von apikal gespült und die Anzahl der noch lebenden Bakterien durch Ausstreichen geeigneter Verdünnungen bestimmt. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * ($p < 0,05$) markiert (n=6).

Die Vorbehandlung mit dem Medium der nicht stimulierten Makrophagen führte zwar auch zu einer Reduktion der Bakterienzahl, der Unterschied war aber nur bei den mit PAO1 infizierten Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Makrophagen-Medium die Fähigkeit des Epithels, eine bakterielle Infektion abzuwehren, verbessert wird.

4.2.5 Vorinkubation mit Makrophagen-Medium sensibilisiert die Epithelzellen für die Erkennung von bakteriellen Komponenten

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Epithelzellen durch Vorinkubation mit Makrophagen-Medium für die Erkennung von Bakterien sensibilisiert werden und, dass ihre Fähigkeit die Bakterien abzutöten verstärkt wird. Atemwegsepithelzellen erkennen Bakterien und andere Mikroorganismen mit Hilfe von Toll-like Rezeptoren (TLR) (siehe 2.1.1). Aus diesem Grund sollte nun getestet werden, ob sich durch Vorstimulation mit Makrophagen-Medium auch eine stärkere Reaktion auf spezifische Liganden der für die Bakterien Erkennung wichtigsten TLR beobachten lässt. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden wie unter 4.2.2 mit Makrophagen-Medium vorinkubiert und im Anschluss mit spezifischen Liganden von TLR2 (PGN), TLR4 (LPS) und TLR5 (Flagellin) stimuliert.

4.2.5.1 Epithelzellen werden durch Makrophagen-Medium nicht für die Erkennung von LPS sensibilisiert

Es wurde zuvor gezeigt, dass Atemwegsepithelzellen nicht auf Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS reagieren (siehe 4.2.2.1). Deshalb sollte zuerst überprüft werden, ob die Vorinkubation mit Makrophagen-Medium Einfluss auf die Sensibilität der Epithelzellen gegenüber LPS hat. Dabei zeigte sich, dass selbst nach Stimulation mit hohen Dosen LPS (10 µg/ml) keine Veränderung der Zytokinkonzentration im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle festgestellt werden konnte. In Abbildung 11 ist dies beispielhaft an IL-8 gezeigt. Die RT-PCR Analyse zeigte, dass die LPS-Stimulation auch auf die Defensin-Expression keinen Einfluss hatte (Daten nicht gezeigt).

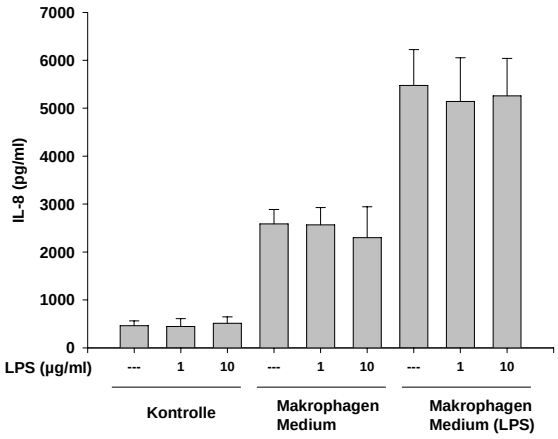

Abb. 11: Epithelzellen reagieren auch nach Vorinkubation mit Makrophagen-Medium nicht auf LPS. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in *air liquid interface* Kultur wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium vorinkubiert und im Anschluss für 6 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen LPS (E.coli; Ultra Pure 0111:B4) stimuliert. Die IL-8-Konzentration im Medium wurde mittels ELISA bestimmt (n=3).

4.2.5.2 Die Epithelzellen reagieren nach Vorinkubation mit Makrophagen-Medium stärker auf Stimulation mit Peptidoglycan

Atemwegsepithelzellen reagieren normalerweise nicht auf die Stimulation mit grampositiven Bakterien. Die zuvor durchgeführten Versuche hatten jedoch gezeigt, dass die Epithelzellen durch Makrophagen-Medium für die Erkennung grampositiver Bakterien sensibilisiert werden. Grampositive Bakterien werden hauptsächlich über TLR2 erkannt. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob die Zellen nach Vorinkubation mit Makrophagen-Medium auch sensitiver auf TLR2 Liganden reagieren. Für die Versuche wurden die Zellen mit dem Peptidoglycan (PGN) von *Staphylococcus aureus* stimuliert. Die Stimulation mit PGN allein zeigte keinen Effekt (Abb. 12). Durch die Vorinkubation mit Makrophagen-Medium konnte die IL-8- und IL6-Abgabe durch Stimulation mit PGN signifikant erhöht werden (Abb. 12 A und B). Wie schon in den Versuchen zuvor zeigte sich das Medium der mit LPS stimulierten Makrophagen deutlich wirksamer im Vergleich zum Medium der unstimulierten Makrophagen.

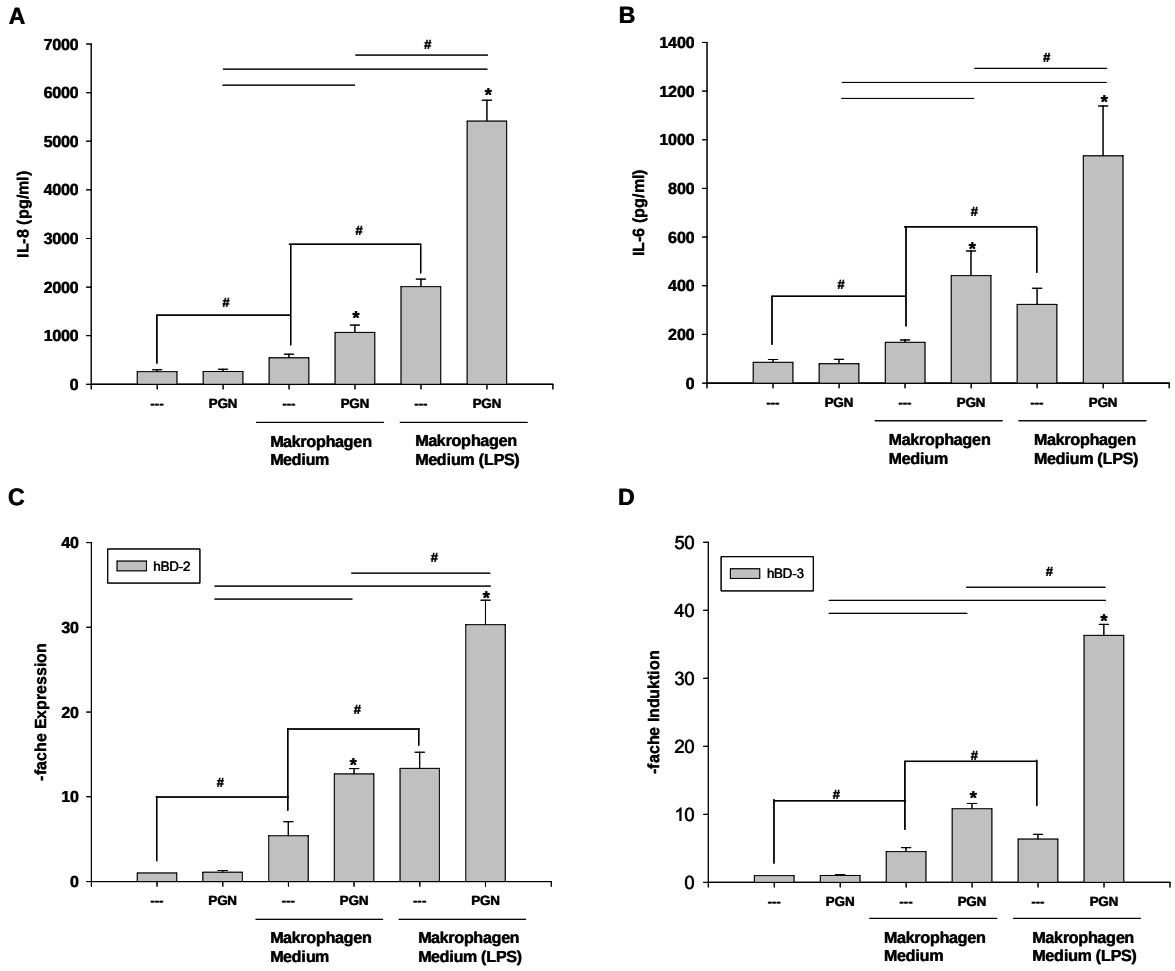

Abb. 12: Inkubation mit Makrophagen-Medium verstärkt die Reaktion der Epithelzellen auf TLR2-Liganden. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium oder dem Medium LPS stimulierter Makrophagen (LPS) vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit 1µg/ml PGN (*S. aureus*) stimuliert. Die Konzentration von A) IL-6 und B) IL-8 im Medium wurde mittels ELISA bestimmt. C) Die Induktion von hBD-2 und D) hBD-3 gegenüber den nicht stimulierten Referenz-Zellen. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit # markiert. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen nicht stimulierten Kontrolle (---) von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Die RT-PCR Analyse der aus den Zellen isolierten Gesamt-RNA zeigte, dass nach Vorinkubation der Zellen mit Makrophagen-Medium die Stimulation mit PGN die Expression von hBD-2 induzierte (Abb. 12 C), während die Stimulation mit den Liganden allein keinen Effekt hatte. Interessanterweise war nach Vorinkubation mit Makrophagen-Medium die Expression von hBD-3 durch Stimulation mit PGN induzierbar (Abb. 12 D). Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass das Medium der LPS stimulierten Makrophagen den größeren Effekt verursacht.

4.2.5.3 Die Epithelzellen reagieren stärker auf Stimulation mit Flagellin

Flagellin ist ein potenter proinflammatorischer Modulator der Immunantwort des Atemwegepithels (Prince, 2006). Deshalb wurde abschließend überprüft, ob sich durch das Makrophagen-Medium die Reaktion der Zellen auf diesen TLR5-Liganden verändert. Die ELISA-Messung der Zytokine im Medium zeigte, dass die Stimulation mit Flagellin alleine zur Sekretion von IL-8 und IL-6 führte (Abb.13 A). Analog dem Ergebnis mit PGN konnte durch die Vorinkubation der Zellen mit Makrophagen-Medium die Reaktion auf Flagellin deutlich verstärkt werden.

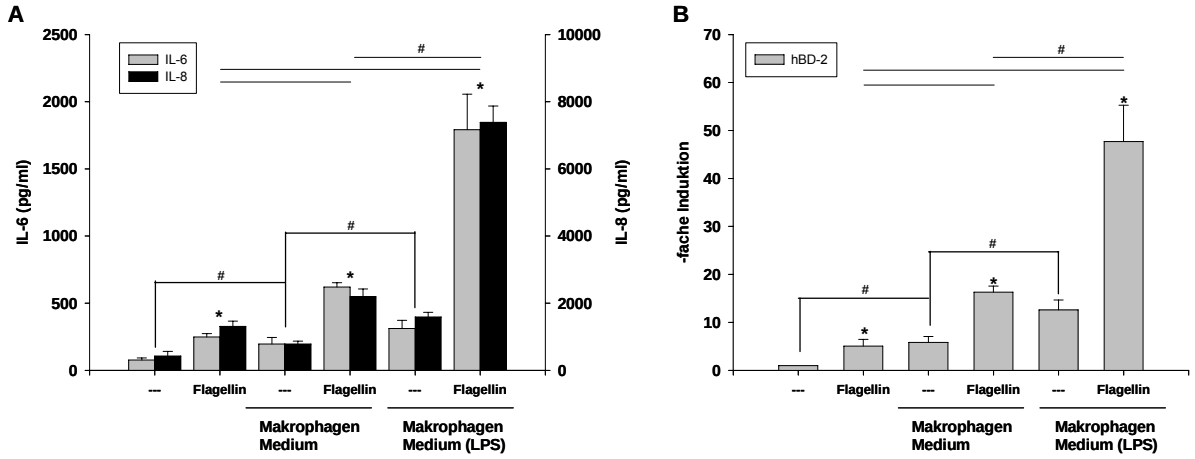

Abb. 13: Inkubation mit Makrophagen-Medium verstärkt die Reaktion der Epithelzellen auf Flagellin. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium oder dem Medium LPS stimulierter Makrophagen (LPS) vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit 100ng/ml Flagellin stimuliert. Die Konzentration von A) IL-6 und IL-8 im Medium wurde mittels ELISA bestimmt. Die Induktion von B) hBD-2 gegenüber den nicht stimulierten Referenz-Zellen. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit # markiert. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen nicht stimulierten Kontrolle (---) von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Die hBD-2-Expression konnte allein durch Stimulation mit Flagellin induziert werden. Diese Expression wurde durch die Vorinkubation der Zellen mit dem Medium der LPS stimulierten Makrophagen nochmals signifikant gesteigert (Abb. 13 B). Die Expression von hBD-3 war durch Flagellin nicht induzierbar und konnte auch nach Vorinkubation mit Makrophagen-Medium nicht induziert werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.5.4 Vorinkubation der Epithelzellen mit Makrophagen-Medium verstärkt die Expression und Oberflächenlokalisation von TLR

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch Vorinkubation mit Makrophagen-Medium nicht nur eine stärkere Reaktion der Epithelzellen auf Bakterien erreicht wird, sondern dass die Epithelzellen nach der Vorinkubation auch deutlich sensitiver auf TLR-Liganden reagieren. Es ist bekannt, dass die Sensitivität von Zellen gegenüber TLR-Liganden vom Expressionslevel des jeweiligen TLR abhängig ist (Nomura et al., 2000; Abreu et al., 2001). Aus diesem Grund stellte sich nun die Frage, ob sich die gesteigerte Sensitivität auf eine verstärkte Expression der Toll-like Rezeptoren zurückführen lässt.

Die Daten der quantitativen RT-PCR zeigen, dass die Stimulation mit PGN und Flagellin allein keinen Einfluss auf die Expression von TLR2 bzw. TLR5 hatte, während durch Inkubation mit Makrophagen-Medium die Expression von TLR2 und TLR5 induziert wurde (Abb. 14).

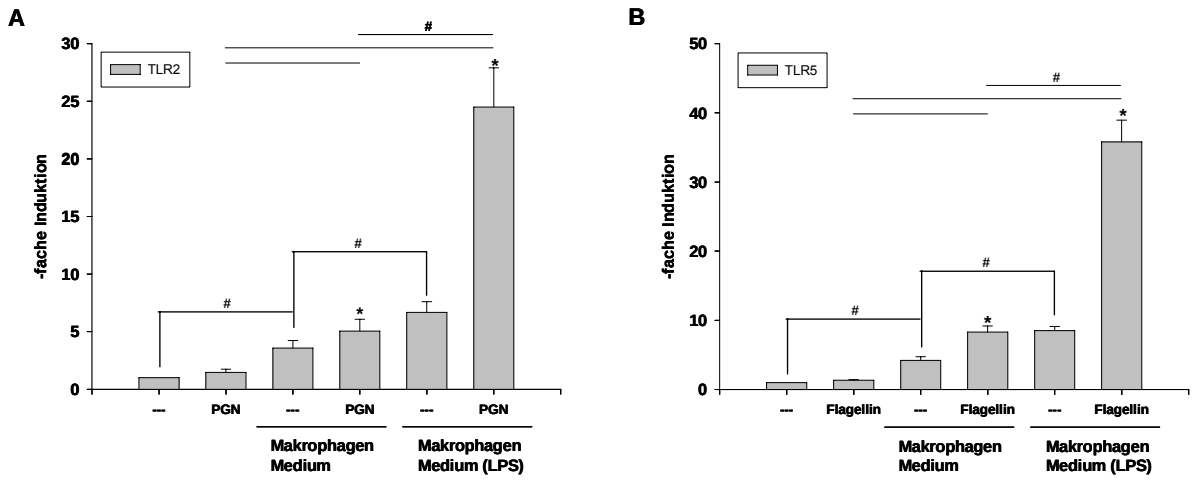

Abb. 14: Inkubation mit Makrophagen-Medium verstärkt die TLR-Expression durch Stimulation mit TLR-Liganden. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden mit Makrophagen-Medium oder dem Medium LPS stimulierter Makrophagen (LPS) vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit A) PGN oder B) 100ng/ml Flagellin stimuliert. Die Induktion von A) TLR2 und B) TLR5 gegenüber den nicht stimulierten Referenz-Zellen. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit # markiert. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen nicht stimulierten Kontrolle (---) von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Den deutlichsten Effekt auf die Expression der Toll-like Rezeptoren hatte die Kombination von Makrophagen-Medium und Stimulation mit PGN oder Flagellin, wobei das Medium der LPS stimulierten Makrophagen den größten Einfluss auf die TLR-Expression hatte. Zusätzlich wurde überprüft, ob die verstärkte Expression auch mit einer gesteigerten Oberflächenlokalisation der entsprechenden TLR korreliert. Dafür wurden die Zellen, wie

zuvor beschrieben (siehe 4.2.3.2 und 4.2.3.3), stimuliert und im Anschluss mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen TLR2 beziehungsweise TLR5 inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die FACS Analyse bestätigte die Ergebnisse der mRNA-Messung (Abb. 15). Nach Inkubation mit Makrophagen-Medium konnte auf der Oberfläche der Zellen mehr TLR2 und TLR5 festgestellt werden, während die Stimulation mit den Liganden alleine nur eine geringfügige Änderung der Oberflächenexpression zeigte. Der stärkste Effekt war, wie schon in den Versuchen zuvor, nach der Vorinkubation mit Medium der LPS stimulierten Makrophagen und anschließender Stimulation mit den entsprechenden Liganden zu erkennen. Daher sind in Abbildung 15 nur diese Daten gezeigt.

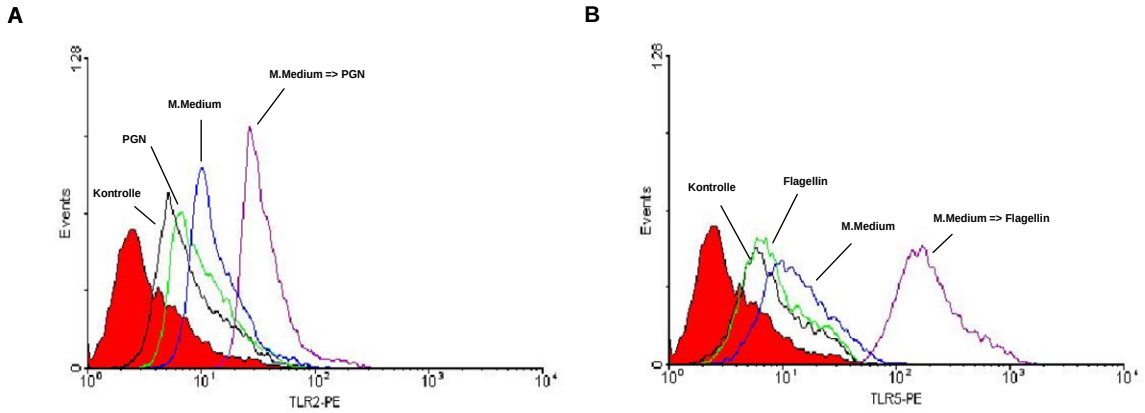

Abb. 15: FACS-Analyse der TLR-Expression. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden dem Medium LPS stimulierter Makrophagen (LPS) vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit A) 1µg/ml PGN B) 100ng/ml Flagellin stimuliert. Die Expression von TLR2 (A) bzw. TLR5 (B) wurde mittels FACS Analyse untersucht. Die ausgefüllte Fläche zeigt die unspezifische Färbung der Isotypkontrolle an. Des Weiteren sind die Peaks für die Kontrolle nur mit Makrophagen-Medium (M. Medium) inkubierte Zellen, nur mit PGN oder Flagellin stimulierte Zellen sowie für die Kombination aus Vorinkubation und Stimulation (M.Medium => Ligand) dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Vorinkubation mit dem Makrophagen-Medium die Reaktion der Epithelzellen auf die Stimulation mit bakteriellen Komponenten in Form von TLR-Liganden deutlich verstärkt wird. Diese verbesserte Reaktionsfähigkeit ist auf eine verstärkte Expression der für die Erkennung notwendigen TLR zurückzuführen.

4.2.6 Die Aktivierung der Epithelzellen durch Makrophagen-Medium ist abhängig von TNF-alpha

Die Ergebnisse der unter 4.2.4 beschriebenen Versuche zeigen einen aktivierenden Einfluss des Makrophagen-Medium auf die Epithelzellen. Wie unter 4.2.1 gezeigt wurde, geben Makrophagen nach LPS-Stimulation verstärkt TNF-α und IL-1β ab. Von beiden Zytokinen ist bekannt, dass sie die hBD-2-Expression in Atemwegsepithelzellen induzieren. Für TNF-α ist zusätzlich noch beschrieben, dass es die Expression von TLR2 auf Atemwegsepithelzellen induziert. Von daher stellte sich die Frage, ob sich die Aktivierung der Epithelzellen ebenfalls auf TNF-α, IL-1β oder der Kombination der beiden Zytokine im Makrophagen-Medium zurückführen lässt. Um diese Frage zu beantworten wurden die Versuche, wie unter 4.4.2 beschrieben, wiederholt, jedoch das Makrophagen-Medium zuvor mit Antikörpern gegen TNF-α oder IL-1β behandelt, um das jeweilige Zytokin im Medium zu neutralisieren. Da in allen vorangegangenen Versuchen das Medium der LPS stimulierten Makrophagen den stärksten Effekt gezeigt hatte, wurde für die folgenden Neutralisationsversuche nur dieses Medium verwendet.

4.2.6.1 Neutralisation von TNF-alpha im Makrophagen-Medium inhibiert die Reaktion der Epithelzellen auf TLR-Liganden

Aufgrund der Hypothese, dass die gesteigerte Reaktion der Epithelzellen auf eine verstärkte Expression der Toll-like Rezeptoren zurückzuführen ist, sollte nun untersucht werden, ob die Neutralisation der Zytokine Einfluss auf die Expression der untersuchten TLR hat. Es zeigte sich, dass durch die Neutralisation von TNF-α die durch das Makrophagen-Medium induzierte Expression von TLR2 und TLR5 aufgehoben werden konnte (Abb. 16 A und B). Die in den Versuchen zuvor beobachtete deutlich verstärkte Expression der TLR durch nachfolgende Stimulation mit den entsprechenden Liganden, wurde in gleicher Weise inhibiert. Die Neutralisation von IL-1β alleine hatte keinen Einfluss auf die Expression der TLR. Ein synergistischer Effekt von TNF-α und IL-1β kann auch ausgeschlossen werden, da durch die gleichzeitige Neutralisation beider Zytokine der Effekt der TNF-α-Inhibition nicht weiter verstärkt wurde. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Neutralisation der Zytokine und die damit verbundene Reduktion der TLR-Expression auch Einfluss auf die Defensin-Expression hat. Aus Abbildung 16 kann man entnehmen, dass durch Inhibition von sowohl TNF-α als auch IL-1β die Fähigkeit des Makrophagen-Medium, die hBD-2 Expression zu induzieren, gehemmt wird, wobei der Effekt durch TNF-α-Neutralisation etwas stärker war

als der durch IL-1β-Neutralisation (Abb. 16 D). Die stärkste Hemmung wurde durch gleichzeitige Neutralisation beider Zytokine erreicht, was auf einen synergistischen Effekt hinweist.

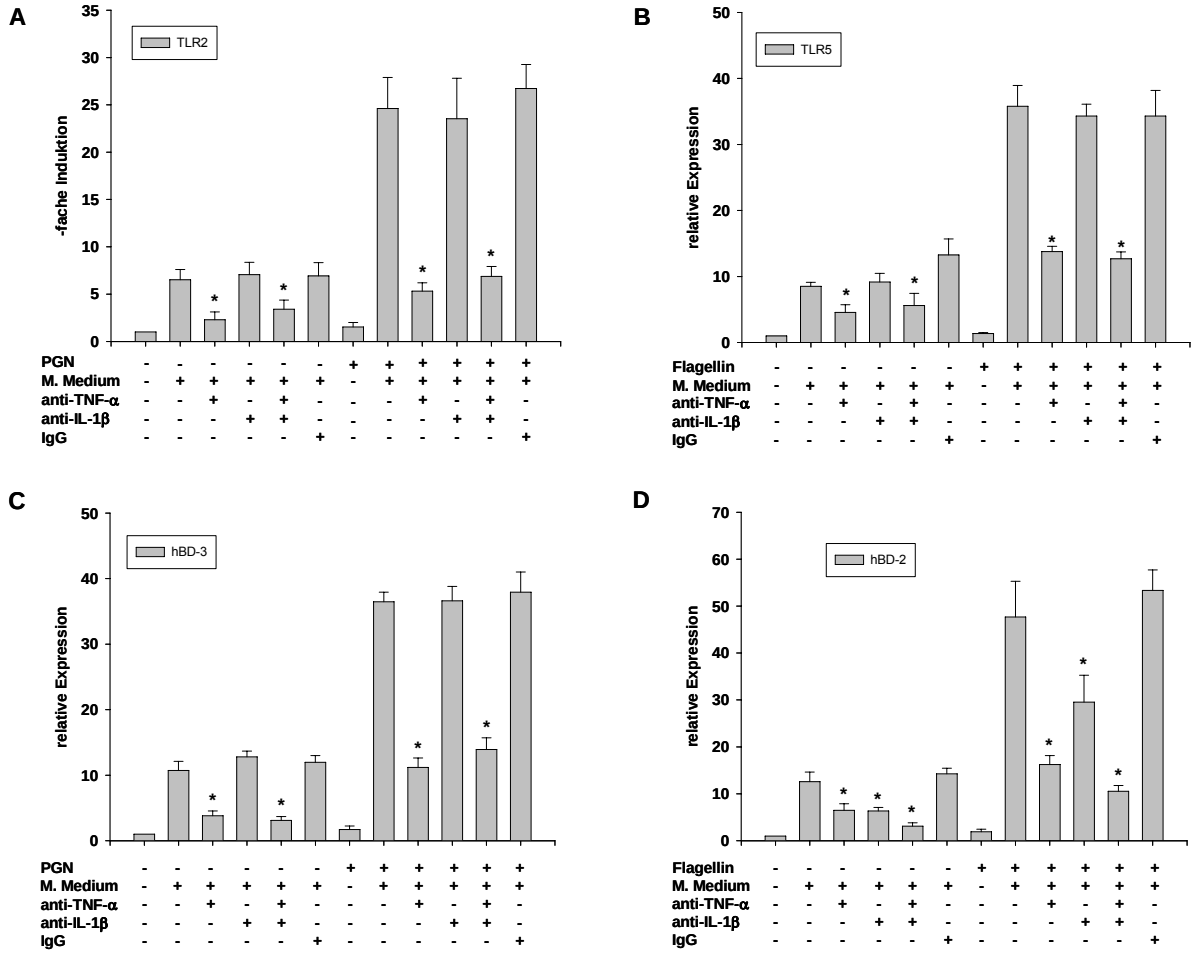

Abb. 16: Neutralisation von TNF-α hebt den Effekt des Makrophagen-Medium wieder auf. Das Medium der LPS stimulierten Makrophagen (M. Medium) wurde für eine Stunde mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-α, IL-1β, einer Kombination der beiden Antikörper oder dem entsprechenden IgG Isotyp Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 18 Stunden mit diesem Medium vorinkubiert und danach für weitere 6 Stunden mit 1µg/ml PGN (A, C) bzw. 100ng/ml Flagellin stimuliert (B, D). Die Induktion von TLR2 (A), TLR5 (B), hBD-3 (C) und hBD-2 (D) gegenüber den nicht stimulierten Referenz-Zellen. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Analog wurde auch die Reaktion auf Flagellin deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu konnte sowohl die durch das Makrophagen-Medium als auch die durch nachfolgende PGN Stimulation induzierte hBD-3-Expression nur durch Neutralisierung von TNF-α signifikant reduziert werden (Abb. 16 C).

4.2.6.2 Neutralisation von TNF-alpha im Makrophagen-Medium schwächt die Entzündungsreaktion der Epithelzellen

Im Anschluss wurde überprüft, wie sich die Neutralisation der Zytokine auf die Reaktion der Epithelzellen auswirkt, wenn diese mit hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert werden. Dabei zeigte sich, dass die durch Stimulation mit *P.aeruginosa* PAO1 induzierte hBD-2 Expression ebenso durch Neutralisation von TNF-α und IL-1β gehemmt wurde, wie das auch bei der Stimulation mit den TLR-Liganden zu beobachten war (Abb. 17 A).

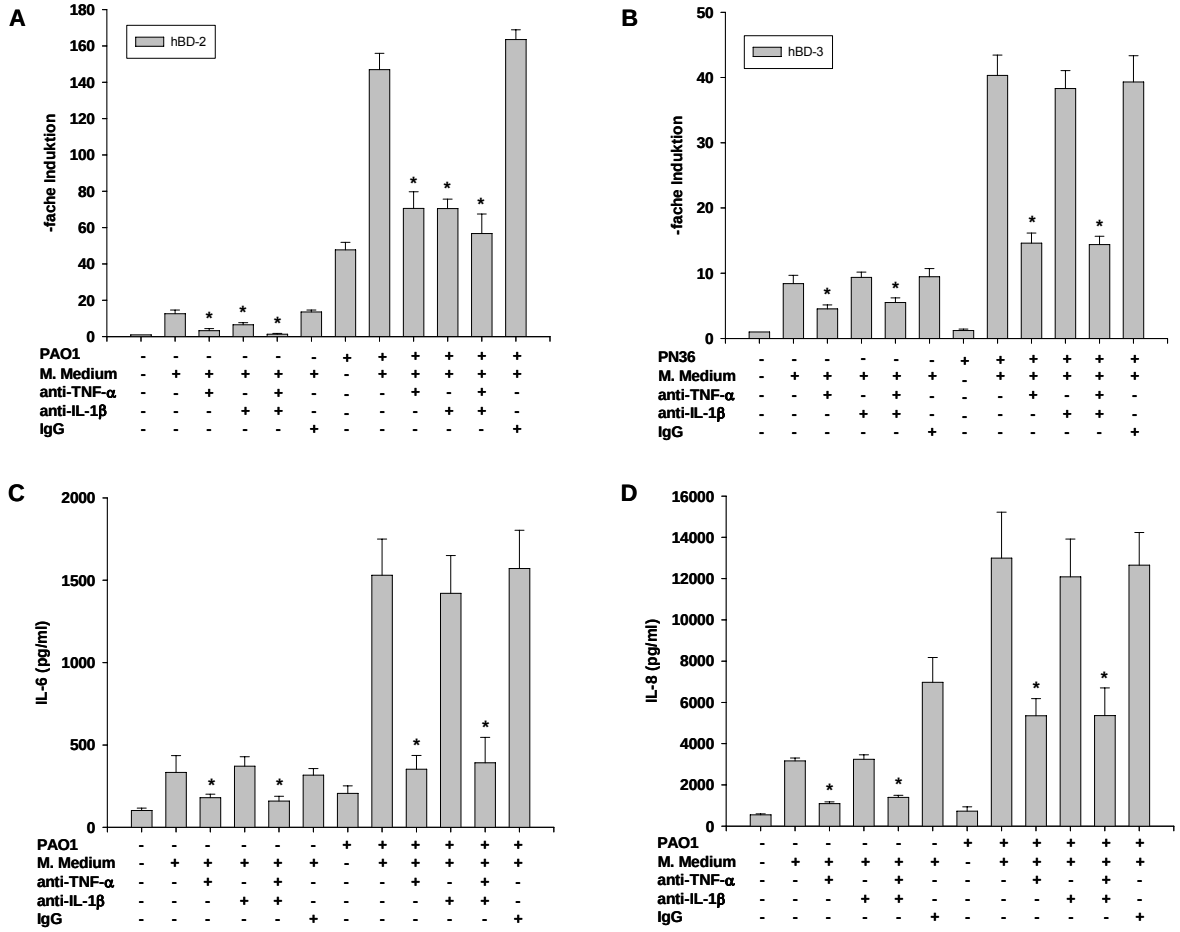

Abb. 17: Neutralisation von TNF-α vermindert die Reaktion der Epithelzellen auf die Stimulation mit Bakterien. Das Medium der LPS stimulierten Makrophagen (M. Medium) wurde für eine Stunde mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-α, IL-1β, einer Kombination der beiden Antikörper oder dem entsprechenden IgG Isotyp Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 18 Stunden mit diesem Medium vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden einer 1:10 Verdünnung von PAO1 (OD_{600} = 0,8) (A, C, D) bzw. PN36 (OD_{600} = 0,3) (B) stimuliert.. Die Induktion hBD-2 (A) und hBD-3 (B) gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen. Die Konzentration von IL-6 (C) IL-8 (D) im Medium. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit * markiert (n=4).

Die durch die Stimulation mit *S. pneumoniae* PN36 hervorgerufene hBD-3 Expression konnte analog zur PGN Stimulation nur durch TNF-α Neutralisation gehemmt werden (Abb. 17 B). Die ELISA Messung zeigte, das die Abgabe von IL-8 und IL-6 ebenfalls durch die Neutralisation von TNF-α reduziert wurde, während die Neutralisation von IL-1β keinen Einfluss hatte. Da der Effekt bei beiden Bakterien in gleicher weise zu sehen war sind in Abbildung 17 (C und D) nur die ELISA Daten für die Stimulation mit PAO1 gezeigt.

4.2.7 Vorstimulation mit TNF-alpha ist ausreichend, um die Epithelzellen für die Erkennung von TLR-Liganden zu sensibilisieren

Die Ergebnisse der Neutralisationsversuche geben Grund zu der Vermutung, dass der aktivierende Einfluss des Makrophagen-Medium auf die Epithelzellen auf das im Medium enthaltene TNF-α zurückzuführen ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit das andere Faktoren im Makrophagen-Medium die Wirkung von TNF-α beeinflussen. Um zu testen, ob der aktivierende Effekt alleine durch TNF-α Stimulation zu erreichen ist, sollte abschließend geprüft werden, ob sich die gleichen Effekte auch durch Vorinkubation der Epithelzellen mit TNF-α reproduzieren lassen. Zu diesem Zweck wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit TNF-α vorinkubiert, im Anschluss mit PGN und Flagellin stimuliert. Die Auswertung der RT-PCR zeigt, dass sowohl durch die Vorinkubation mit TNF-α als auch die Stimulation mit den TLR-Liganden die Defensin und die TLR Expression induziert wurde (Abb. 18). Durch Vorstimulation mit TNF-α und anschließender Stimulation mit den TLR-Liganden konnte sowohl die Defensin als auch die Expression des jeweiligen TLR deutlich verstärkt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass von Makrophagen abgegebenes TNF-α eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Epithelzellen spielt.

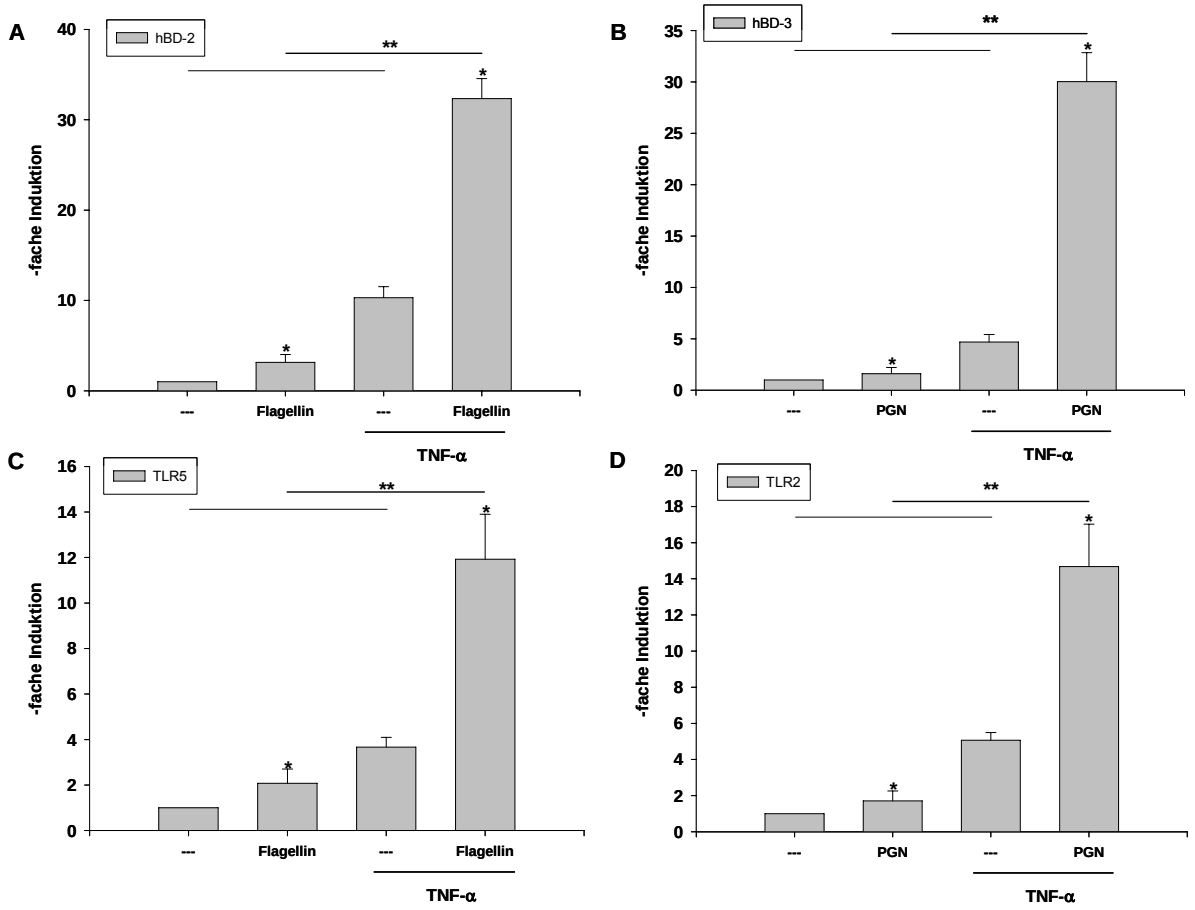

Abb. 18: Vorstimulation der Zellen mit TNF-α verstärkt die Reaktion auf TLR-Liganden. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) wurden für 18 Stunden 10ng/ml TNF-α vorinkubiert und im Anschluss für weitere 6 Stunden mit 100ng/ml Flagellin (A und C) oder 1µg/ml PGN (B und D) stimuliert. Die Induktion von hBD-2 (A), hBD-3 (B), TLR5 (C) und TLR2 (D) gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (---) sind von $p < 0,05$ sind mit * markiert. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ zwischen den mit TNF vorinkubierten Zellen und den unbehandelten Zellen sind mit ** markiert. (n=4).

4.3 Die verminderte Zytokinsekretion von Makrophagen beeinflusst den Verlauf einer bakteriellen Infektion in vivo

Die vorangegangenen Versuche haben deutlich gemacht, dass Makrophagen Einfluss auf die Epithelzellen haben und dass die während einer Infektion stark vermehrte Abgabe von regulatorisch aktiven Zytokinen der Makrophagen eine verstärkte Aktivität der Epithelzellen zur Folge hat. Dies führt dazu, dass die Infektion effektiver bekämpft werden und so die Dauer der Entzündung reduziert werden kann. Deshalb wurde untersucht, ob sich der Einfluss der Makrophagen auf die Atemwegsepithelzellen auch im Tierversuch bestätigen lässt. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der aktivierende Einfluss der Makrophagen hauptsächlich auf TNF-α zurückzuführen ist. Die Expression von TNF-α wird über den Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert. Für die Tierversuche wurden deshalb LysMcre/p65$^{lox/lox}$ und als Kontrollen LysMcre/p65$^{wt/wt}$ Mäuse verwendet. Bei den LysMcre/p65$^{lox/lox}$ wurde mittels des Cre/*loxP* Rekombinationssystems das Gen für die NF-κB Untereinheit p65 selektiv in den myeloischen Zellen entfernt wodurch die Transkription sämtlicher über NF-κB regulierten Gene unterbunden wird (siehe 3.13). Zur besseren Verständlichkeit werden im Folgenden die LysMcre/p65$^{lox/lox}$ Mäuse als p65-KO und die LysMcre/p65$^{wt/wt}$ Mäuse als p65-WT bezeichnet.

4.3.1 Makrophagen von p65-KO Mäusen geben nach Stimulation mit LPS deutlich weniger IL-1 und TNF-alpha ab

Zunächst wurde überprüft, wie sich das Ausschalten von p65 in den Makrophagen auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine auswirkt. Dazu wurden Makrophagen frisch aus der Bauchhöhle von p65-KO Mäusen isoliert und für 24 Stunden mit LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden Makrophagen aus p65-WT Mäusen verwendet. Im Anschluss wurde die Konzentration von TNF-α und IL-1β im Medium gemessen. Aus Abbildung 19 kann man entnehmen, dass die Makrophagen der p65-KO-Mäuse signifikant weniger TNF-α und IL-1β als die Makrophagen der p65-WT Mäuse abgeben. Dies zeigt, dass durch die Deletion von p65 die Fähigkeit der Makrophagen diese Zytokine zu produzieren deutlich eingeschränkt wurde. Somit sollte bei einer Infektion der Einfluss der p65-KO Makrophagen auf die Epithelzellen deutlich geringer ausfallen.

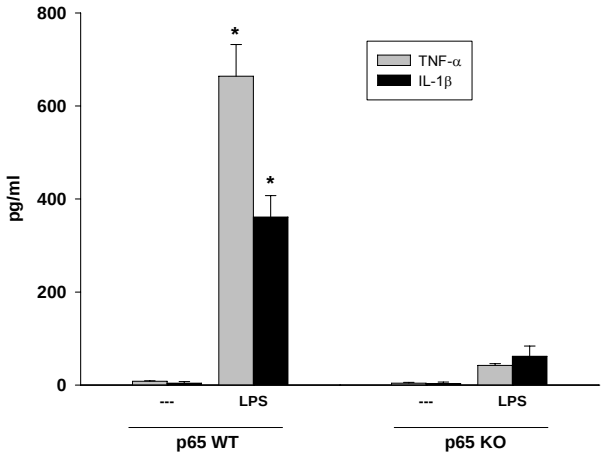

Abb. 19: Vorstimulation der Zellen mit TNF-α verstärkt die Reaktion auf TLR-Liganden. Makrophagen wurden 3 Tage nach Thioglykollat Injektion aus der Bauchhöhle von p65 WT und p65 KO Mäusen isoliert. Die isolierten Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Konzentration von TNF-α und IL-1β im Medium wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen KO und WT Zellen von $p < 0,05$ sind mit * markiert. (n=3).

4.3.2 p65 KO und p65 WT Mäuse zeigen deutliche Unterschiede in der Entzündungsreaktion

WT und KO Mäuse wurden mit $5x10^6$ *P. aeruginosa* PAO1 infiziert. Nach wenigen Stunden waren alle Mäuse erkennbar krank, es konnte aber äußerlich kein Unterschied zwischen WT und KO Mäusen festgestellt werden. Die Bakterien Dosis wurde von allen Tieren überlebt. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Anzahl der noch lebenden Bakterien in ihren Lungen bestimmt. Dabei zeigte sich das die p65-KO Mäuse noch eine große Anzahl Bakterien in der Lunge hatten, während in den Lungen der p65-WT Tiere fast keine mehr vorhanden waren (Abb. 20 A). Die Zahl der in die Lunge eingewanderten Entzündungszellen bei den p65-WT Mäusen deutlich höher als bei den KO-Tieren (Abb. 20 B). Die Differentialzellzählung zeigte keinen Unterschied zwischen den WT- und den KO-Mäusen. Sowohl bei den KO- als auch bei den WT- Tieren war die für eine durch Bakterien ausgelöste Entzündung typische Verteilung der Zelltypen zu finden (Abb. 20 C). Überraschenderweise war trotz der geringeren Gesamtzellzahl die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine in der Lavage der p65-KO Tiere deutlich höher als bei den WT Mäusen (Abb. 20 D).

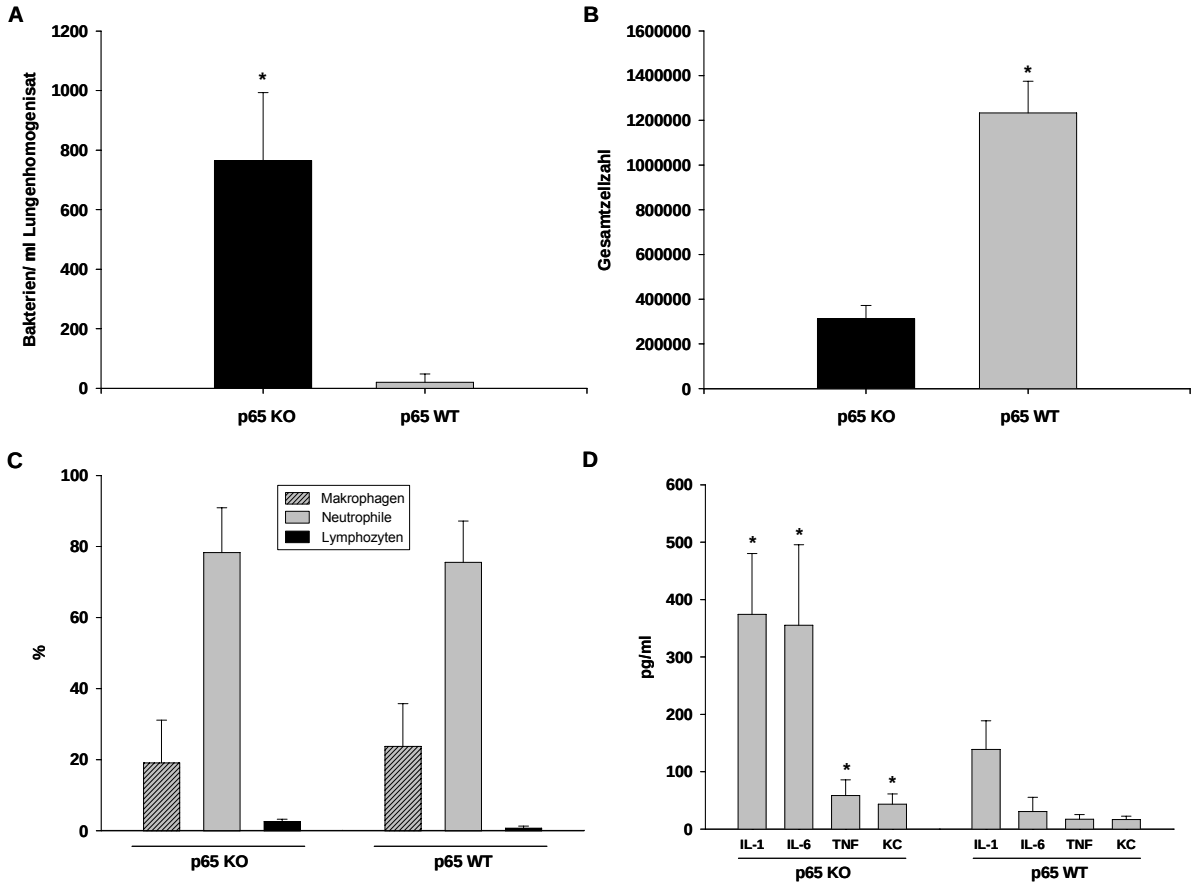

Abb. 20: p65 WT-Mäuse klären die Infektion mit *P. aeruginosa* schneller als die KO-Mäuse KO und WT Mäuse wurden mit 5 x 10^6 *P. aeruginosa* PAO1 infiziert. Nach 24 h wurden die Mäuse lavagiert und die Lungen entnommen. A) die rechten Lungenlappen wurden homogenisiert und die Anzahl an lebenden Bakterien durch Ausstriche geeigneter Verdünnungen bestimmt. B) Gesamtzellzahl der Zellen in der BAL. C) Differentialzellzählung der Zellen in der BAL D) Die Konzentrationen an IL-6, KC und TNF-α in den Lungenhomogenisaten wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen von $P < 0,05$ sind mit * markiert (n = 4).

4.4 Atemwegsepithelzellen reagieren auf die Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*

Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ist der Auslöser verschiedener zum Teil schwerwiegender Infektionen der Atemwege. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig darüber bekannt, in welcher Weise das Atemwegsepithel in der Lage ist auf eine Infektion mit *A. fumigatus* zu reagieren. Aus diesem Grund sollte zu Anfang untersucht werden, ob es durch die Infektion mit *A. fumigatus* zu einer Entzündungsreaktion der Atemwegsepithelzellen kommt.

4.4.1 Konidien induzieren IFN-ß und IP-10 jedoch kein hBD-2, IL-6 und IL-8

Konidien durchlaufen während ihrer Keimung verschiedene Stadien, welche sich morphologisch und physiologisch unterscheiden (Latge, 1999). Zunächst sollte also die Reaktion von primären Atemwegsepithelzellen auf diese verschiedenen Reifungsstadien untersucht werden. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden mit verschiedenen Mengen (10^3-10^7) hitzeinaktivierter Konidien, bzw. Konidien, welche vor der Inaktivierung für drei und sechs Stunden gequollen waren sowie Myzel von *A. fumigatus*, stimuliert. Die Erkennung von pathogenen Mikroorganismen erfolgt in den meisten Fällen über TLR. Die Signaltransduktion der TLR verläuft über zwei unterschiedliche Signalwege, zum einen den Myd88-abhängigen und zum anderen den TRIF-abhängigen Signalweg. Deshalb wurden als Parameter der Myd88 vermittelten Entzündungsreaktion die IL-8 und IL-6 Konzentration im Medium sowie die Expression von hBD-2 und als Parameter der TRIF-abhängigen Reaktion die IFN-β und IP-10 Expression gemessen. Es zeigte sich, dass weder die Stimulation mit Konidien noch mit Myzel zu der mit einer bakteriellen Infektion vergleichbaren Abgabe von Mediatoren aus Epithelzellen führte. Es konnte auch mit großen Mengen Konidien weder eine vermehrte Interleukin Abgabe noch eine Veränderung der hBD-2 Expression gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

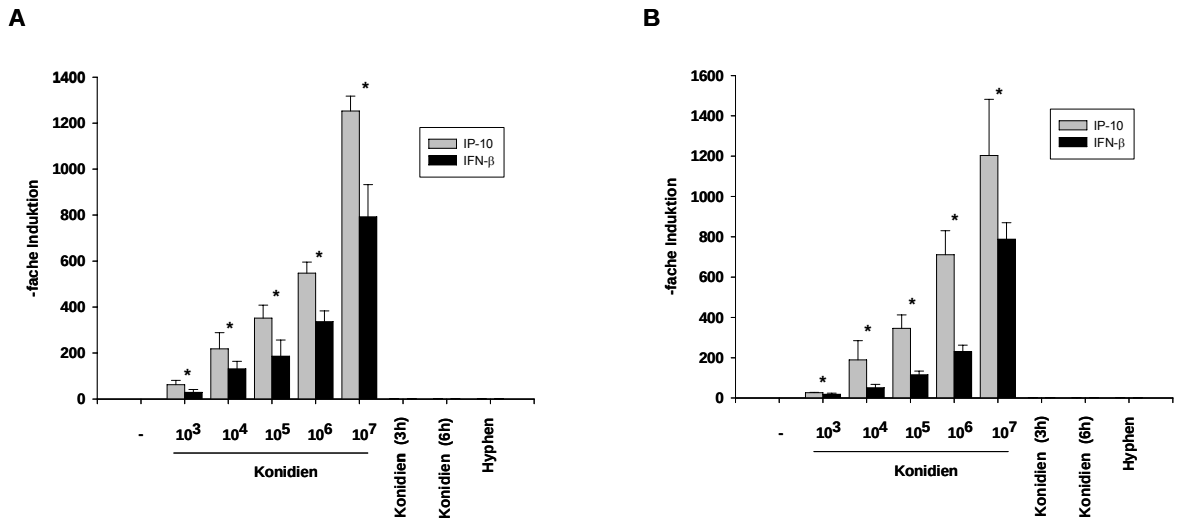

Abb. 21: Stimulation mit Konidien induziert die IFN-β und IP-10 Expression. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in A) Flüssigkultur und B) *air liquid interface* Kultur wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen hitzeinaktivierter Konidien bzw. für 3 und 6 Stunden gequollenen Konidien sowie Hyphen von A. fumigatus stimuliert. Die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede zur nicht stimulierten Kontrolle (-) sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=3).

Interessanterweise wurde durch die Stimulation mit Konidien die Expression von IFN-β und IP-10 induziert. Dieser Effekt war umso stärker je mehr Konidien für die Stimulation verwendet wurden (Abb. 21). Die Stimulation mit den gequollenen Konidien sowie dem Pilzmyzel hatte keinerlei Einfluss auf die Epithelzellen. Um zu überprüfen ob sich dieser Effekt auch auf intaktes Atemwegsepithel übertragen lässt, wurde der Versuch in gleicher Weise mit ausdifferenzierten Atemwegsepithelzellen in *air liquide interface* Kultur durchgeführt (Abb. 21 B). Die Reaktion konnte auch in diesem System reproduziert werden. Als nächstes wurde der Zeitverlauf der Reaktion untersucht. Dabei zeigte sich, dass die IFN-β Expression schon nach 4 Stunden messbar zugenommen hatte, während die IP-10 Expression erst nach mehr als 8 Stunden festzustellen war (Abb. 22).

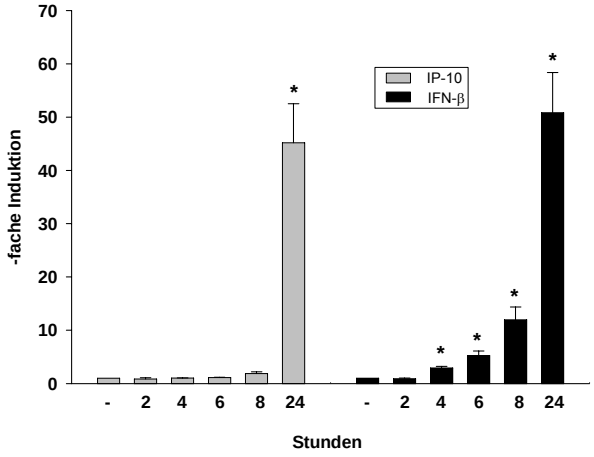

Abb. 22: Zeitverlauf der IFN-β und IP-10 Expression. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in Flüssigkultur wurden mit hitzeinaktivierten Konidien stimuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede zur nicht stimulierten Kontrolle (-) sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=3).

Die Ergebnisse waren für die Zellen in ALI-Kultur vergleichbar deswegen sind in Abbildung 22 nur die Ergebnisse der Zellen in Flüssigkultur gezeigt. Um Sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte nicht auf die Hitzeinaktivierung zurück zuführen sind, wurden die Versuche, mit durch UV Bestrahlung inaktivierten Konidien wiederholt. Die Ergebnisse konnten mit den UV-Inaktivierten Konidien reproduziert werden (Daten nicht gezeigt), sodass davon auszugehen ist, dass die Art und Weise der Inaktivierung keinen Einfluss hat.

4.4.2 Die Aufnahme der Konidien ist für die Erkennung notwendig

Es ist bekannt, dass Atemwegsepithelzellen in der Lage sind Konidien aufzunehmen (Paris et al., 1997; Wasylnka and Moore, 2002). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Aufnahme der Konidien für die zuvor Beobachtete Reaktion notwendig ist. Dafür wurden primäre Atemwegsepithelzellen für eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen des Endocytose-Hemmers Cytochalasin D vorinkubiert und im Anschluss mit Konidien stimuliert. Die durch die Konidien induzierte Expression von IFN-β und IP-10 konnte durch die Inkubation mit Cytochalasin D Dosis-abhängig inhibiert werden (Abb. 23 A).

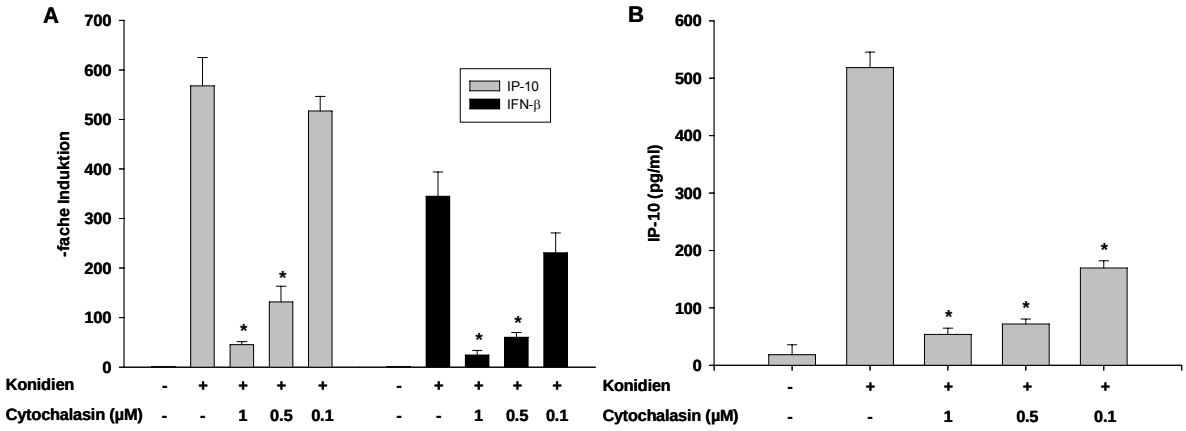

Abb. 23: Hemmung der Endozytose durch Cytochalasin D reduzierte die IFN-β und IP-10 Expression sowie die IP-10 Abgabe. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in Flüssigkultur wurden für eine Stunde mit den angegebenen Konzentrationen Cytochalasin D vorinkubiert und im Anschluss hitzeinaktivierten Konidien stimuliert. A) Die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. B) Die IP-10 Konzentration im Medium wurde mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=4).

Die ELISA Messung der IP-10-Konzentration im Medium zeigte den gleichen Effekt (Abb. 23 B). Der Versuch wurde in gleicher Weise mit ausdifferenzierten Atemwegsepithelzellen in *air liquide interface* Kultur durchgeführt. Auch hier konnte die IFN-β und IP-10 Expression sowie die Abgabe von IP-10 durch Cytochalasin D gehemmt werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.3 Die Induktion der IP-10 Expression ist NF-kB abhängig

Der Transkriptionsfaktor NF-kB ist ein wichtiger Regulator der Entzündungsreaktion. Die Expression fast aller an der Entzündung beteiligten Gene wird über ihn aktiviert. Deshalb sollte zunächst überprüft werden, ob es durch Stimulation mit Konidien zu einer Aktivierung von NF-kB kommt. Primäre Atemwegszellen wurden mit einem 5xNFkB-Luciferase Reporterplasmid transfiziert und im Anschluss mit Konidien stimuliert. Die Lumineszenz Messung zeigte, dass die Stimulation mit den Konidien zu einer deutlichen Aktivierung von NF-kB führt (Abb. 24 A).

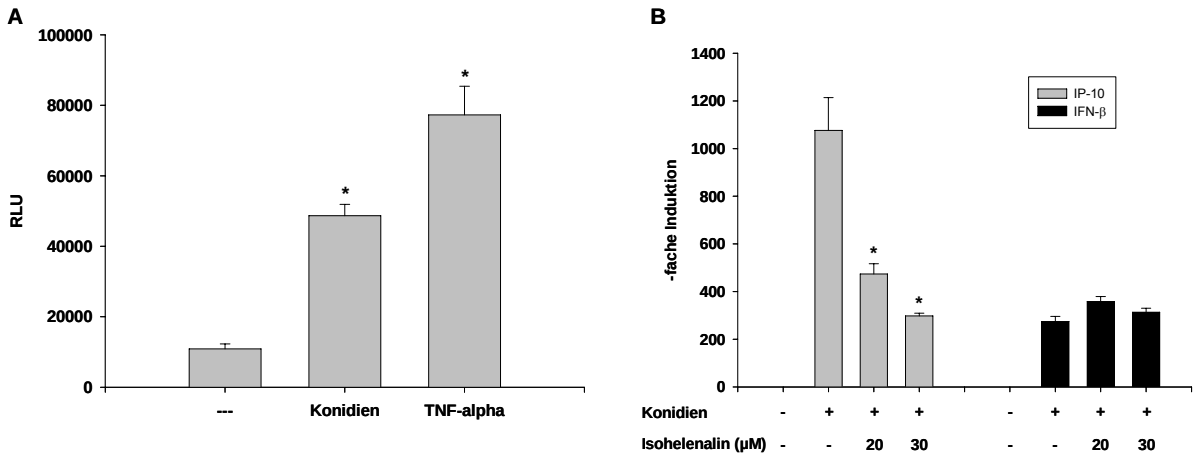

Abb. 24: Die Stimulation mit Konidien aktiviert NF-κB. A) Die Aktivierung von NF-κB wurde mittels Luciferase Reporter-Assay gemessen. B) Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in Flüssigkultur wurden für eine Stunde mit den angegebenen Konzentrationen Isohelenalin vorinkubiert und im Anschluss mit hitzeinaktivierten Konidien stimuliert. Die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=4).

Da IFN-β und IP-10 sowohl NF-kB abhängig als auch –unabhängig reguliert werden können, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob durch Inhibition von NF-kB, die durch Konidien Stimulation induzierte Expression von IFN-β und IP-10 beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass durch Vorinkubation der Epithelzellen mit Isohelenalin die IP-10 Expression deutlich abgeschwächt werden konnte, während die IFN-β Expression davon unbeeinflusst blieb (Abb. 24 B). IFN-β und IP-10 werden also über zwei unterschiedliche Signalwege reguliert.

4.4.4 Atemwegsepithel erkennt doppelsträngige Konidien RNA

Als nächstes sollte untersucht werden, welcher Bestandteil der Konidien die Reaktion auslöst um damit mögliche Rückschlüsse auf den für die Erkennung verantwortlichen Rezeptor ziehen zu können. Die Aktivierung des Interferonsignalweges ist mit der Erkennung von Fremd-RNA assoziiert (Honda et al., 2005). Somit wurde dieses als Hinweis darauf gewertet, dass die Reaktion der Atemwegsepithelzellen auf *A. fumigatus* über die Erkennung von RNA erfolgt. Da sich zuvor gezeigt hatte, dass die Aufnahme der Konidien über Endozytose für die Erkennung notwendig ist (siehe 4.4.2), wurden die Zellen mit Konidien RNA transfiziert. Die RT-PCR Analyse zeigte, dass durch die Transfektion der Zellen mit Konidien RNA die

Expression von IFN-β und IP-10 ähnlich stark wie nach Stimulation mit ganzen Konidien, induziert werden konnte (Abb. 25 A). Nach Zugabe der gleichen Menge RNA in das Medium konnte keine Reaktion der Zellen gemessen werden. Was nochmals die Notwendigkeit der Aufnahme bestätigt.

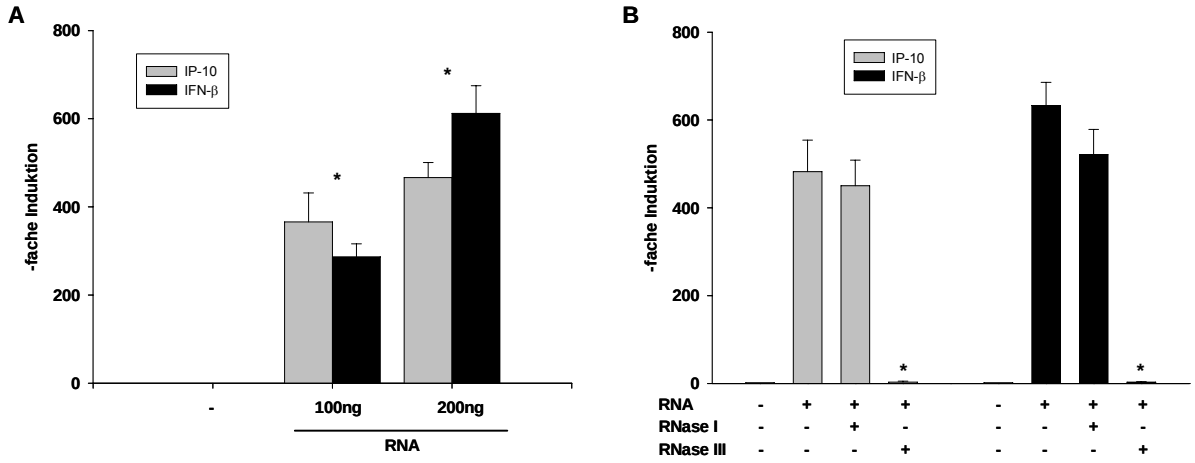

Abb. 25: Stimulation mit Konidien doppelsträngiger Konidien RNA induziert die IFN-β und IP-10 Expression. A) Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in Flüssigkultur wurden mit den angegebenen Mengen Konidien RNA transfiziert B) zusätzlich wurde die RNA vor der Transfektion noch für eine Stunde mit RNase I oder RNase III verdaut Die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht transfizierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=4).

RNA kommt sowohl als einzelsträngiges (ssRNA)- als auch doppelsträngiges (dsRNA) Molekül vor und beide Formen können von Zellen erkannt werden (siehe 2.1.1). Daher stellte sich die Frage, welches der beiden Moleküle für die beobachtete Reaktion verantwortlich ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Gesamt-RNA vor der Transfektion mit spezifischen RNasen verdaut. Durch Verdau der Gesamt-RNA mit der für dsRNA spezifischen RNase III konnte die Induktion der IFN-β und IP-10 Expression komplett verhindert werden. Der Verdau mit der für ssRNA spezifischen RNase I zeigte keinen Effekt (Abb. 25 B). Dies zeigt, dass Atemwegsepithelzellen auf ds RNA aus den *A. fumigatus* Konidien reagieren.

4.4.5 Die IFN-β und IP-10 Induktion ist RIP-1/TBK-1 abhängig

Die zuvor durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die beobachteten Effekte auf die intrazelluläre Erkennung doppelsträngiger RNA zurück zuführen sind. Doppelsträngige RNA kann von Zellen unter anderem über TLR3 erkannt werden. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob TLR3 an der Erkennung der Konidien beteiligt ist. TLR3 unterscheidet sich von anderen Toll-like Rezeptoren dadurch, dass die Signaltransduktion nur Myd88-unabhängig über das Adapterprotein TRIF erfolgt. Dafür wurde der TRIF Signalweg durch Resveratrol inhibiert. Das pflanzliche Polyphenol Resveratrol ist ein selektiver Inhibitor von TBK1 und RIP1 (Youn et al., 2005). Diese beiden Kinasen sind essentielle Bestandteile des TRIF Signalweges. Durch Vorinkubation primärer Atemwegsepithelzellen in konventioneller Flüssig- und *air liquid interface* Kultur mit verschiedenen Konzentrationen Resveratrol konnte sowohl die durch Konidien Stimulation induzierte IFN-β und IP-10 Expression inhibiert als auch die IP-10 Konzentration im Medium dosis-abhängig reduziert werden (Abb. 26). Aufgrund vergleichbarer Ergebnisse sind in Abbildung 26 nur die Daten für die Flüssigkultur gezeigt. Dieses Ergebnis zeigt, das TBK-1 und RIP1 an der Signaltransduktion beteiligt sind.

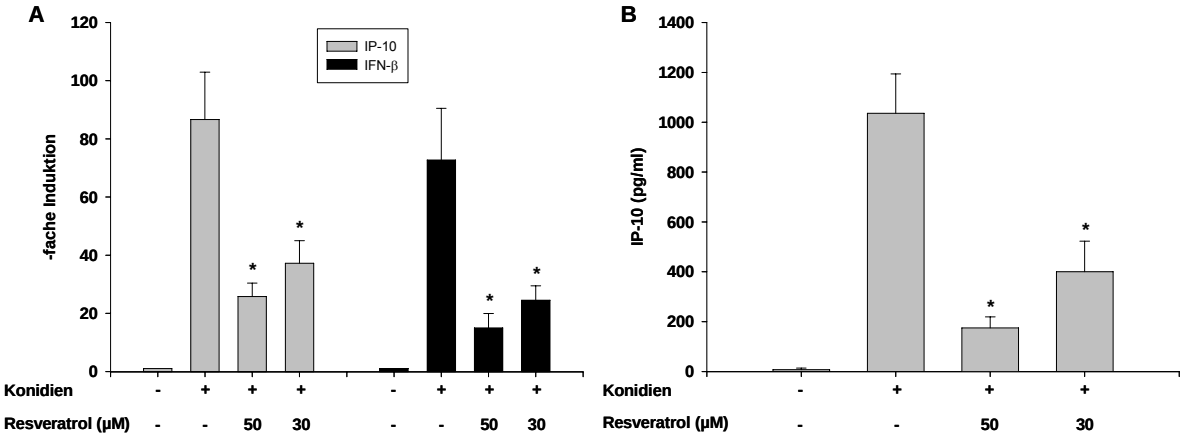

Abb. 26: Inkubation mit der Zellen mit Resveratrol reduzierte die IFN-β und IP-10 Expression sowie die IP-10 Abgabe. Primäre Atemwegsepithelzellen (pHBE) in Flüssigkultur wurden für eine Stunde mit den angegebenen Konzentrationen Resveratrol vorinkubiert und im Anschluss hitzeinaktivierten Konidien stimuliert. A) Die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. B) Die IP-10-Konzentration im Medium wurde mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=3).

4.4.6 Die Konidien RNA wird über TLR3 erkannt

Neueste Daten zeigen, dass TBK-1 und RIP1 nicht nur Bestandteil der TRIF vermittelten RNA Erkennung sind. Sie sind ebenfalls an der Erkennung cytosolischer RNA über MDA-5 und RIG-I beteiligt (Kato et al., 2006). Um zu überprüfen, ob TLR3 an der Erkennung der Konidien RNA beteiligt ist, wurde TLR3 mittels eines hTLR3-Expressionsplasmids in HEK-293 Zellen zur Überexpression gebracht. Stimulation der Zellen mit dem TLR3 Liganden poly I:C zeigte eine deutliche Expression von IFN-β und IP-10. Durch die Stimulation mit der Konidien RNA konnte ebenfalls eine deutliche Induktion der IFN-β und IP-10 Expression erreicht werden. Diese Expression wurde analog zu den Experimenten mit den Epithelzellen durch Verdau der RNA mit RNase I aufgehoben, der Verdau mit RNase III hatte keinen Effekt (Abb. 27).

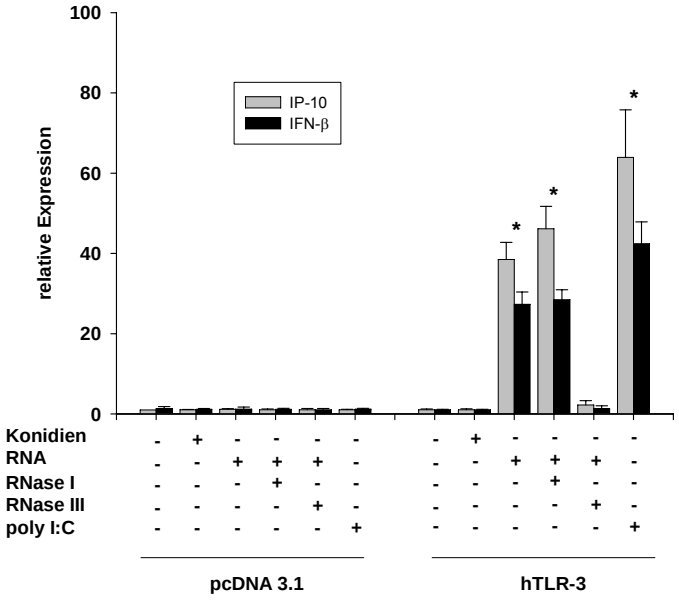

Abb. 27: Doppelsträngige Konidien RNA wird über TLR3 erkannt. HEK-293 Zellen wurden mit einem hTLR3 Expressionsplasmid oder einem leeren Kontrollplasmid transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit hitzeinaktivierten Konidien, Konidien RNA oder mit RNA, welche zuvor mit RNase I bzw. RNase III verdaut wurde, stimuliert. Die Induktion von IFN-β und IP-10 gegenüber den nicht Stimulierten Referenz Zellen wurde mittels real-time RT-PCR, Normierung auf ß-Actin und der ΔΔ CT Methode berechnet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) markiert. (n=3).

Überraschenderweise reagierten die Zellen nicht auf die Stimulation mit den Konidien. Die Zellen, welche mit einem leeren Kontrollplasmid transfiziert wurden, reagierten auf keine der durchgeführten Stimulationen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie die Interaktion von Makrophagen und Atemwegsepithel die Reaktion der Epithelzellen bei einer bakteriellen Infektion beeinflusst. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass Atemwegsepithelzellen in der Lage sind Bakterien bzw. bakterielle Bestandteile zu erkennen und aktiv an der Abwehrreaktion teilnehmen. Es zeigte sich zudem, dass Makrophagen in mehrfacher Hinsicht einen großen Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit der Epithelzellen haben. Zum einen lösen sie durch die Sekretion verschiedener Zytokine eine Entzündungsreaktion des Epithels aus und zum anderen wird durch das von ihnen abgegebene TNF-α die TLR-Expression des Epithels verstärkt. Dies resultiert in einer gesteigerten Sensitivität der Epithelzellen gegenüber bakteriellen Komponenten und führt in direkter Folge zu einer stärkeren Abwehrreaktion des Atemwegsepithels. Die Daten geben somit einen Einblick in das komplexe Netzwerk der Interaktion der an der Immunantwort beteiligten Zellen.

Desweiteren wurde die Reaktion von Atemwegsepithelzellen auf den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* untersucht. Es zeigte sich das die Epithelzellen auf die RNA aus endozytierten Konidien reagieren und das diese Reaktion über TLR3 vermittelt wird. In dieser Arbeit wurde somit zum ersten Mal gezeigt, dass Atemwegsepithelzellen aktiv an der Abwehr von Pilzsporen beteiligt sind.

5.1 Makrophagen modulieren die Entzündungsreaktion des Atemwegsepithels

Der direkte Kontakt mit Makrophagen verstärkt die Reaktion des Epithels auf eine bakterielle Infektion

Während einer Infektion stehen die in das Lumen der Lunge eingewanderten Makrophagen in direktem Kontakt mit dem Atemwegsepithel. Makrophagen sind wichtige Modulatoren der Immunantwort und können die Reaktion benachbarter Zellen beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, wie sich der direkte Kontakt mit den Makrophagen auf die Immunantwort des Atemwegsepithels auswirkt. Zu diesem Zweck wurde ein Kokulturmodell von Epithelzellen und Makrophagen etabliert und die Infektion durch Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien simuliert.

Frühere Studien hatten gezeigt, dass die Kokultur mit Makrophagen zu einer verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine der Atemwegsepithelzellen führt (Krakauer, 2002;

Morris et al., 2006). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In den durchgeführten Versuchen konnte bereits in der Kokultur eine gegenüber der Kontrolle erhöhte IL-6-Konzentration gemessen werden (Abb. 4 & 5). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Kokultur mit den Makrophagen die Reaktion der Epithelzellen auf eine bakterielle Infektion signifikant verstärkt wurde. In allen Versuchen konnte nach der Stimulation mit den Bakterien in der Kokultur die höchste IL-6 Konzentration gemessen werden (Abb. 4 & 5). Der Unterschied in der Abgegebenen IL-6-Menge war dabei in allen Fällen so deutlich, dass ein rein additiver Effekt von Kokultur und Bakterienstimulation auszuschließen ist. Es ist vielmehr davon auszugehen das die Makrophagen die Sensibilität der Epithelzellen gegenüber den Bakterien erhöhen. Diese Daten sind somit der erste *in vitro* Nachweis, dass Makrophagen die Reaktion von Atemwegsepithelzellen auf eine bakterielle Infektion direkt verstärken können.

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass Makrophagen die Reaktion benachbarter Zellen über die Sekretion modulatorisch aktiver Substanzen (Zytokine, Chemokine) beeinflussen können (Liu et al., 2003; Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2003). Die Expression einer Vielzahl dieser Substanzen wird über die Aktivierung von NF-κB reguliert. Durch die Vorinkubation der Makrophagen mit einem NF-κB-Aktivierungs-Inhibitor konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Reaktion der Epithelzellen auf einen NF-κB-abhängigen Prozess, wie z. B. die Zytokinproduktion, in den Makrophagen zurückzuführen ist. Die zuvor beobachtete verstärkte Reaktion der Epithelzellen auf die Bakterien-Exposition konnte durch die Inhibition von NF-κB in den Makrophagen deutlich abgeschwächt werden (Abb. 6). Durch die Inhibition der NF-κB-Aktivierung in den Epithelzellen wurde IL-6-Sekretion dieser Zellen komplett unterbunden. Es konnte auch nach Bakterien-Stimulation keine Veränderung der IL-6-Konzentration in der Kokultur gemessen werden. Dieses Resultat bestätig, dass die in der Kokultur gemessene Änderung der IL-6-Konzentration nur auf die Epithelzellen zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse unterstreichen außerdem die wichtige Rolle von NF-κB bei der Regulation der Immunantwort (Liou, 2002; Caamano and Hunter, 2002; Xiao and Ghosh, 2005).

Makrophagen beeinflussen die Immunantwort der Epithelzellen durch die Abgabe löslicher Faktoren

Die Kokultur hatte gezeigt, dass Makrophagen die Reaktion des Epithels auf eine bakterielle Infektion verstärken. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob für den in der Kokultur beobachteten Effekt der direkte Zell-Zell-Kontakt von Makrophagen und Epithelzellen notwendig ist oder ob er auf die Sekretion modulatorisch aktiver Substanzen der Makrophagen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden die Epithelzellen vor der Bakterien-Exposition mit dem zellfreien Medium kultivierter Makrophagen vorinkubiert. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die mit Makrophagen-Medium vorbehandelten Epithelzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit einer deutlich stärkeren Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 auf die Bakterien Exposition reagierten (Abb. 8). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten einer anderen Studie, die einen gleichartigen Einfluss von Makrophagen-Medium auf ASMC (airway smooth muscle cells) zeigt. Morris et al. konnten nach der Inkubation der Zellen mit Makrophagen-Medium ebenfalls eine deutlich verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine auf die Stimulation mit Bakterien feststellen (Morris et al., 2005).

Die Immunantwort der Atemwegsepithelzellen ist aber nicht auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine beschränkt (Rennard et al., 1994). Durch die Produktion von β-Defensinen leisten die Epithelzellen einen weiteren wichtigen Beitrag zur Klärung der Infektion (McCray, Jr. and Bentley, 1997; Singh et al., 1998). Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss auf die Defensin-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von hBD-2 und hBD-3 durch Inkubation mit Makrophagen-Medium induziert wird (Abb. 9). Die durch Makrophagen-Medium induzierte hBD-2 Expression wurde schon beschrieben (Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2003), für hBD-3 war ein derartiger Effekt von Makrophagen-Medium bis jetzt noch nicht bekannt. Durch quantitative RT-PCR-Analyse konnte darüber hinaus eine signifikant verstärkte Defensin-Expression durch nachfolgende Bakterien-Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 9). Die Infektion von vollständig ausdifferenziertem Atemwegsepithel in ALI-Kultur mit lebenden Bakterien zeigte zudem, dass durch die Vorbehandlung mit Makrophagen-Medium die antimikrobielle Wirksamkeit des Epithels sichtbar verstärkt wurde. Auf dem vorbehandelten Epithel konnte eine gegenüber dem unbehandelten Epithel signifikant reduzierte Zahl lebender Bakterien nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde dabei sowohl für die Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 als auch für *S. pneumoniae* PN36 beobachtet (Abb. 10). Aus früheren Versuchen ist bekannt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Defensin-Expression und der antimikrobiellen Wirkung

des Atemwegsepithels besteht (Beisswenger et al., 2006). Diese Ergebnisse sind somit der Nachweis, dass durch das Makrophagen-Medium in direkter Folge die antimikrobielle Potenz des Atemwegsepithels gesteigert wird.

Die Daten der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass Makrophagen durch die Sekretion löslicher Faktoren in der Lage sind, die Epithelzellen zu aktivieren und als Folge dieser Aktivierung die Reaktion der Zellen auf eine bakterielle Infektion deutlich verstärkt wird. Dies betrifft sowohl Fähigkeit die Entzündung über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu modulieren als auch die direkte Abwehr der Bakterien durch die Produktion von β-Defensinen. Ob die Produktion anderer antimikrobieller Substanzen von diesem Effekt auch betroffen ist wurde nicht untersucht.

Makrophagen sensibilisieren die Epithelzellen für die Erkennung bakterieller Komponenten und beeinflussen die TLR-Expression

Die Zellen des Atemwegsepithels exprimieren ebenso wie die Zellen des angeborenen Immunsystems Toll-like Rezeptoren und sind dadurch in der Lage Bakterien und andere Mirkoorganismen zu erkennen (Muir et al., 2004; Greene et al., 2005; Greene and McElvaney, 2005). Die verstärkte Reaktion auf einen Reiz ist mit der besseren Erkennung dieses Reizes durch die dafür verantwortlichen Strukturen assoziiert. Deshalb wurde untersucht, ob durch Makrophagen oder besser gesagt den von ihnen abgegebenen Substanzen auch die Reaktion der Epithelzellen auf spezifische für die Bakterienerkennung wichtige TLR-Liganden beeinflusst wird. Da dies auf eine Beteiligung der TLR hindeuten und somit eine Erklärung für erhöhte Sensibilität der Epithelzellen gegenüber den Bakterien bieten würde.

Die Inkubation mit Makrophagen-Medium verstärkt die Reaktion auf die Stimulation mit den Peptidoglycan (TLR2) sowie Flagellin (TLR5) (Abb. 12 und 13). Der gleiche Effekt von Makrophagen-Medium wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie schon für die Reaktion der Epithelzellen auf den TLR3 Liganden poly I:C beschrieben (Morris et al., 2006). Die in dieser Studie ebenfalls beobachtete verstärkte Reaktion der Epithelzellen auf die LPS Stimulation, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Selbst auf hohe Dosen LPS konnte weder vor noch nach der Inkubation mit Makrophagen-Medium eine Reaktion der Zellen festgestellt werden. Morris et al. verwendeten für ihre Versuche jedoch die LPS sensitive Atemwegsepithelzelllinie BEAS-2B (Koyama et al., 1999), während für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Atemwegsepithelzellen schon zuvor gezeigt

wurde, dass sie durch LPS nicht stimulierbar sind. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bieten.

Die Sensitivität von Zellen gegenüber TLR-Liganden steht im direkten Zusammenhang mit der Stärke der Expression des jeweiligen Rezeptors (Nomura et al., 2000; Abreu et al., 2001). Dementsprechend konnte nach der Inkubation mit dem Makrophagen-Medium eine verstärkte Expression von TLR2 (5-8 fache Induktion) und TLR5 (5-10 fache Induktion) nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde die Expression durch die nachfolgende Stimulation mit den Liganden nochmals signifikant erhöht. Von einigen TLR ist bekannt, dass die Expression durch die Stimulation mit dem jeweiligen Liganden verstärkt wird (Matsumoto et al., 2003; Hadley et al., 2005). Somit könnte sich die nochmalige Verstärkung der TLR-Expression durch folgenden Mechanismus erklären lassen. Durch das Makrophagen-Medium wird die Expression der TLR induziert, worauf hin die Zellen die entsprechenden Liganden besser erkennen können, was wiederum eine weitere Verstärkung der TLR Expression zur Folge hat.

Die Resultate dieser Arbeit belegen, dass Makrophagen die TLR-Expression der Epithelzellen beeinflussen. Dies hat direkte Auswirkungen auf die Reaktion des Atemwegsepithels. Atemwegsepithelzellen sind hyposensitiv gegenüber grampositiven Bakterien (Sha et al., 2004). Eine Reaktion auf diese Keime ist normalerweise nur durch Stimulation mit sehr hohen Dosen zu erreichen. Dadurch wird verhindert, dass schon der Kontakt mit einer geringen Anzahl Keime, welcher das Epithel ständig ausgesetzt ist, eine Entzündungsreaktion des Atemwegsepithels auslöst. Als ausschlaggebend für die mangelnde Sensitivität wird die geringe Expression von TLR2 postuliert (Greene and McElvaney, 2005). Am Beispiel von *Streptococcus pneumoniae* bzw. dem TLR2-Liganden Peptidoglycan (PGN) konnte gezeigt werden, dass die Epithelzellen in Folge der gesteigerten TLR2-Expression in die Lage versetzt werden auch auf suboptimale Dosen dieser Stimuli zu reagieren.

Dieses System ermöglicht eine Anpassung der epithelialen Abwehr an die jeweils erforderlichen Gegebenheiten. Wie zuvor erwähnt stehen die Atemwegsepithelzellen in den oberen Atemwegen in ständigem Kontakt mit Bakterien. Durch die Abgabe antimikrobieller Substanzen werden diese Erreger abgetötet. Sollte diese erste Abwehr nicht ausreichen eine Infektion zu verhindern, werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine in das Gewebe abgegeben, die Immunzellen wie z.B. Makrophagen zum Infektionsherd rekrutieren. Die Makrophagen bekämpfen nun einerseits selbst die Infektion auf der anderen Seite verstärken sie die TLR-Expression der Epithelzellen. Daraus resultiert eine erhöhte Sensitivität des Epithels gegenüber den Bakterien, was eine stärkere Immunantwort des

Epithels zur Folge hat. Dies wiederum trägt zu einer schnelleren Klärung der Infektion bei. Somit wird eine Entzündungsreaktion erst dann ausgelöst, wenn es unbedingt notwendig ist. Im Alveolarraum erfüllt dieses System einen anderen Zweck. In den Alveolen müssen selbst wenige Bakterien schnell und effektiv bekämpft werden, da eine länger anhaltende Infektion mit der einhergehenden Entzündung fatale Folgen für das Alveolargewebe haben würde. Ständig anwesende Alveolarmakrophagen ermöglichen eine zügige Reaktion auf die eingedrungenen Erreger und gewährleisten zusätzlich eine schnelle Aktivierung und der damit verbesserten Immunantwort der Epithelzellen.

Die Ergebnisse anderer Studien lassen den Schluss zu, dass es sich bei der hier gezeigten Steigerung der TLR-Expression um einen generellen Mechanismus handelt, durch den Makrophagen die Sensitivität anderer Zellen gegenüber mikrobiellen Bestandteilen beeinflussen (Homma et al., 2004; Morris et al., 2005; Morris et al., 2006).

Die selektive Verstärkung der TLR2- und TLR5-Expression ist zudem ein Hinweis darauf, dass diese TLR bzw. ihre Liganden für das Atemwegsepithel von herausragender Rolle bei der Bakterienerkennung sind. Die Bedeutung von TLR2 als wichtiger epithelialer Rezeptor für die Erkennung grampositiver Bakterien ist unbestritten (Kirschning and Schumann, 2002; Dziarski and Gupta, 2005; Shuto et al., 2006). Die gesteigerte TLR5-Expression bestätigt die Annahme, dass der TLR5 Ligand Flagellin für das Atemwegsepithel den wichtigsten Reiz bei der Erkennung gramnegativer Bakterien, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, darstellt (Zhang et al., 2005; Lopez-Boado et al., 2005; Prince, 2006). Diese Hypothese wird zudem durch die auch in dieser Arbeit demonstrierte Insensitivität des Epithels gegenüber LPS unterstützt.

Die Stimulation mit *S. pneumoniae* PN36 und PGN zeigt zudem, dass die hBD-3-Expression über TLR2 induziert wird. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten einer erst kürzlich publizierten Arbeit. Menzies et al. konnten durch Stimulation von Keratinozyten mit *Staphylococcus aureus* ebenfalls eine über TLR2 vermittelte hBD-3 Expression zeigen (Menzies and Kenoyer, 2006). Von besonderer Bedeutung ist dabei, das hBD-3 von allen β-Defensinen die größte antimikrobielle Wirkung gegen grampositive Bakterien aufweist (Schibli et al., 2002; Midorikawa et al., 2003). Diese Daten verdeutlichen, dass Atemwegsepithelzellen durch die TLR in der Lage sind Bakterien gezielt zu erkennen und eine der Situation angepasste Abwehrreaktion auszulösen.

Makrophagen aktivieren das Atemwegsepithel durch die Sekretion von TNF-α

Makrophagen töten und phagozytieren eingedrungene Bakterien und andere Krankheitserreger und verhindern so eine weitere Ausbreitung der Infektion. Durch den Kontakt mit diesen Pathogenen werden sie aktiviert und reagieren mit der Abgabe verschiedener Chemokine und Zytokine (Fujiwara and Kobayashi, 2005). Die Stimulation mit LPS zeigt, dass durch die Bakterien-Exposition insbesondere die Sekretion von TNF-α und IL-1β verstärkt wird (Tab. 4 und Abb. 19). Beide Zytokine haben große modulatorische Aktivität und können die Reaktion anderer Zellen u. a. Atemwegsepithelzellen beeinflussen. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass sowohl IL-1β als auch TNF-α die TLR-Expression (Wolfs et al., 2002; Homma et al., 2004) beeinflussen und die Produktion von β-Defensinen induzieren können (Harder et al., 2000; Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2003). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die bisher beobachteten Effekte ebenfalls auf diese beiden Zytokine zurückzuführen sind. Durch den Einsatz neutralisierender Antikörper konnte die beschriebene Wirkung von IL-1β und TNF-α auf die Defensin-Expression bestätigt werden wobei hervorgehoben werden sollte, dass die hBD-3 Expression ausschließlich durch TNF-α beeinflusst wird. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Einfluss von TNF-α auf die hBD-3-Expression war allerdings äußerst gering (3-5-fache Induktion; Abb. 18) Zusätzlich konnte TNF-α als Auslöser der verstärkten TLR-Expression identifiziert werden. Die unterschiedliche Wirksamkeit der für die Vorinkubation verwendeten Makrophagen-Medien (mit und ohne LPS-Stimulation der Makrophagen) kann somit durch den Unterschied in der TNF-α-Konzentration erklärt werden (siehe Tab. 4).

Aus den hier vorgestellten Daten lässt sich folgende Wirkung der Makrophagen auf die Epithelzellen zusammenfassen. Die Makrophagen sezernieren während einer Infektion u.a. IL-1β und TNF-α, diese Zytokine induzieren in den Epithelzellen die Abgabe proinflammatorischer Substanzen und die Defensin-Expression. Zudem wird durch das TNF-α die TLR-Expression der Epithelzellen verstärkt. Daraus resultiert eine höhere Sensitivität der Zellen gegenüber den Bakterien was in direkter Folge die Immunantwort des Epithels nochmals verstärkt.

Verminderte Zytokin Sekretion der Makrophagen beeinflusst die Entzündung im Tiermodel

Die Daten der vorliegenden Studie haben deutlich gemacht, dass Makrophagen über die Sekretion verschiedener Zytokine, insbesondere TNF-α, die Reaktion des Atemwegsepithels auf eine bakterielle Infektion sichtbar verstärken. Der Einfluss der Makrophagen wirkt sich dabei sowohl auf die Fähigkeit der Epithelzellen durch die Sekretion chemotaktischer Substanzen Immunzellen zum Ort der Infektion zu rekrutieren, als auch auf die direkte Abwehr der Bakterien durch die Produktion antimikrobieller Substanzen aus. Abschließend wurde im *in vivo* Model untersucht, ob eine reduzierte Zytokinabgabe der Makrophagen und die damit abgeschwächte bzw. ganz ausbleibende Aktivierung des Atemwegsepithels Einfluss auf den Verlauf einer bakteriellen Infektion hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte Zytokinabgabe der Makrophagen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der Infektion hat. Die Anzahl der in die Lunge der p65-KO Mäuse eingewanderten Immunzellen war gegenüber den p65-WT Mäusen stark reduziert. Zusätzlich konnte noch 24 Stunden nach der Infektion eine erhöhte Bakterienzahl in der Lunge der KO Tiere festgestellt werden, während die WT Tiere die Infektion fast vollständig geklärt hatten. Die Beobachtung, dass trotz der geringeren Gesamtzellzahl, in den BAL der p65-KO Mäuse deutliche höhere Zytokinkonzentrationen als bei den WT Mäusen gemessen wurden, lässt sich durch die effektivere Klärung der Infektion der WT Mäuse und die dadurch reduzierten bakteriellen Stimuli erklären.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, die im Infektionsversuch mit Makrophagen-depletierten Mäusen ebenfalls eine deutlich erhöhte Keimzahl sowie einen reduzierten Einstrom von Immunzellen in die Lunge beobachten konnten (Kooguchi et al., 1998; Maus et al., 2002). Diese Studien zeigten darüber hinaus eine sichtbar reduzierte Zytokinsekretion des Atemwegsepithels. Die hier vorgestellten Daten könnten somit eine Erklärung für den in diesen Studien beobachteten Infektionsverlauf bieten.

Es muss allerdings bedacht werden, dass Makrophagen selbst eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung weiterer Immunzellen sowie der Bekämpfung der Bakterien haben und, dass zumindest ersteres durch die in diesem Versuch vorhandene Inhibition der NF-κB-Aktivierung deutlich eingeschränkt wurde. Zudem konnte Aufgrund des Versuchsdesign keine Aussage über die Entzündungsreaktion des Epithels gemacht werden. Somit besteht durchaus die Möglichkeit, dass die reduzierte Zellzahl sowie die schlechtere Klärung der Infektion nur auf die verminderte Aktivität der Makrophagen zurückzuführen ist. Die zuvor

gezeigten *in vitro* Daten machen aber eine schwächere Reaktion des Atemwegsepithels als Mitursache für den beobachteten Infektionsverlauf mehr als wahrscheinlich. Dies muss aber durch weitere Versuche bestätigt werden. Dabei sollte inbesondere die Auswirkung auf die Entzündungsreaktion des Atemwegsepithels genauer untersucht werden.

5.2 Die Reaktion von Atemwegsepithelzellen auf den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*

Das Atemwegsepithel erkennt Konidien von *A. fumigatus*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Atemwegsepithelzellen auf den Kontakt mit Konidien (Überdauerrungsstadium) von *A. fumigatus* reagieren, während die Exposition mit anderen Keimstadien (auskeimende Konidien, Pilzhyphen) keine Reaktion verursacht. Die Reaktion auf die Konidien ist gekennzeichnet durch die eine starke Induktion der IFN-β Expression (Abb. 21). Die Reaktion auf die Konidien unterscheidet sich somit deutlich von einer bakteriellen Entzündungsreaktion.

Pilzsporen insbesondere die Konidien von *A. fumigatus* sind potente Allergene und stehen mit verschiedenen chronischen und allergischen Atemwegserkrankung, wie z. B. Asthma, in Verbindung (Hogaboam et al., 2005). Neben seiner Funktion bei der Virusabwehr spielt IFN-β eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung und Aktivierung verschiedenster Effektorzellen (Dendritische Zellen, T-Zellen, usw) des adaptiven Immunsystems (Biron, 2001; Hertzog et al., 2003). So verhindert IFN-β die Apoptose von T-Zellen was einen positiven Effekt auf die Lebensdauer dieser Zellen hat (Tough et al., 1996; Akbar et al., 2000). Desweiteren bewirkt es die verstärkte Expression kostimulatorischer Faktoren wie CD40 und CD86 auf Dendritischen Zellen (Hoebe et al., 2003). Somit könnte die durch den Kontakt mit den Konidien verursachte IFN-β Expression eine wichtige Funktion bei die Initiierung bzw. Aufrechterhaltung einer allergischen Entzündungsreaktion haben.

IFN-β hat eine weitere Eigenschaft, die es zu einem wichigen Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem macht (Le and Tough, 2002). Durch Stimulation mit IFN-β wird die Expression einer Gruppe von Genen, den so genannten IRG (interferon response genes), induziert. Zu den IRG gehören z. B. Interferon-inducible protein 10 (IP-10), monocyte chemotactic protein 5 (MCP-5) oder RANTES (Takaoka and Yanai, 2006). Diese Substanzen sind chemotaktisch für einen Großteil der Zellen des angeborenen Immunsystems.

Anhand von IP-10 konnte nachgewiesen werden, dass der Kontakt mit den Konidien auch die Expression von IRG induziert. Der unterschiedliche Zeitverlauf der Expression von IFN-β und IP-10 gibt zudem Grund zu der Vermutung, dass die IP-10 Expression IFN-β-abhängig erfolgt. Die Expression anderer IRG wurde zwar nicht überprüft, da aber alle IRG über den gleichen Mechanismus reguliert werden, ist eine Abgabe dieser Chemokine wahrscheinlich. Durch die Sekretion dieser Substanzen rekrutiert das Epithel Immunzellen, u.a. Makrophagen, in die Lunge, welche dort einen effektiven Schutz gegen eine Pilzinfektion bieten. Makrophagen haben von allen Immunzellen die größte Effektivität gegen Konidien (Ibrahim-Granet et al., 2003). Durch die Phagozytose der Sporen unterbinden sie das Auskeimen und eine Infektion wird im Ansatz verhindert. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass das Atemwegsepithel eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pilzinfektionen hat.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass Atemwegsepithelzellen in der Lage sind Konidien aufzunehmen (Paris et al., 1997; Wasylnka and Moore, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass für die zuvor beschriebene Reaktion der Epithelzellen die Aufnahme der Konidien notwendig ist. Durch die Inkubation mit dem Endozytosehemmer Cytochalasin D wurde sowohl die IFN-β als auch die IP-10 Expression unterbunden (Abb. 23). Dies bietet eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass Epithelzellen nur auf ruhende Konidien und nicht auf die anderen Keimstadien reagieren können. Auskeimende Konidien verfünffachen in relativ kurzer Zeit ihr Volumen (Raper and Fennell, 1965). Sie erreichen dadurch ebenso wie die Pilzhyphen eine Größe, die von Epithelzellen nicht mehr aufgenommen werden kann (Wasylnka et al., 2005). Eine andere Erklärung könnte in dem Umstand liegen, dass Atemwegsepithelzellen kein Dectin-1 exprimieren (Willment et al., 2005). Dieser Rezeptor ermöglicht Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine extrazelluläre Erkennung von auskeimenden Konidien und Hyphen (Gersuk et al., 2006).

Die Epithelzellen reagieren auf doppelsträngige RNA von *A. fumigatus*

Die Aktivierung des Interferonsignalweges ist mit der Erkennung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) assoziiert (Honda et al., 2005). Es wird aber auch eine LPS induzierte Interferon-Expression berichtet (Toshchakov et al., 2002). Dieser Weg der Aktivierung ist in diesem Fall jedoch auszuschließen, da durch die Stimulation von primären Atemwegsepithelzellen mit LPS keine messbare Änderung der IFN-β-Expression gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die zuvor beschriebene Reaktion der Epithelzellen auf die Erkennung von RNA zurückzuführen ist. Die Transfektion der Zellen mit Konidien-RNA führte zu einer Konzentrationsabhängigen Expression von IFN-β und IP-10 (Abb. 25A). Durch den Verdau mit spezifischen RNAsen konnte doppelsträngige RNA (dsRNA) als Auslöser der Reaktion identifiziert werden (Abb. 25B). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die das Vorkommen von doppelsträngiger RNA in den Konidien erklären können. Genomanalysen geben Anlass zu der Vermutung, dass Pilze sämtliche für die RNAi (RNA interference) benötigten Proteine exprimieren (Nakayashiki et al., 2006). Bei diesem posttranskriptionellen Mechanismus wird die Expression unerwünschter Gene durch doppelsträngige RNA unterbunden (Sijen and Plasterk, 2003). Es zwar nicht bekannt ob Aspergillus fumigatus über einen derartigen RNA-Prozessierungsmechanismus verfügt. Aber die erfolgreiche Inhibtion der posttranskriptionellen Genexpression, durch die Verwendung von exogener dsRNA, lässt den Schluss zu, dass Aspergillus über einen aktiven RNAi-Mechanismus verfügt (Yamada et al., 2007). Eine weitere Quelle könnten natürliche zelluläre RNA-Komponenten, wie z. B. ribosomale RNA, heterogene Kern-RNA oder tRNA´s sein. Alle diese RNA´s können als doppelsträngige Strukturen vorliegen und somit als Auslöser der epithelialen Reaktion fungieren. Diese Daten sind somit der erste Nachweis einer Aktivierung von Atemwegsepithelzellen durch nicht virale dsRNA.

Atemwegsepithelzellen erkennen *A. fumigatus*-RNA über TLR3

In der Literatur werden mehrere Mechanismen beschrieben, die es Zellen ermöglichen doppelsträngige RNA zu erkennen. Der bekannteste ist die über TLR3 vermittelte RNA-Erkennung (Sen and Sarkar, 2005). TLR3 ist primär in der Membran der Endosomen lokalisiert und gewährleistet dort die Erkennung endozytierter dsRNA. Die Erkennung von im Zytosol befindlicher dsRNA erfolgt hauptsächlich TLR-unabhängig über dort lokalisierte Proteine. Zu diesen Proteinen gehören zum einen die Proteinkinase R (PKR) (Silva et al., 2004) und zum anderen die beiden RNA-Helikasen RIG-I (Yoneyama et al., 2004)und mda-5 (Kang et al., 2002).

Aufgrund der Beobachtung, dass durch die Inkubation der Zellen mit Reveratrol die IFN-β und IP-10 Expression inhibiert werden konnte, kann eine über PKR vermittelte RNA-Erkennung in diesem Fall ausgeschlossen werden. Das pflanzliche Polyphenol Resveratrol inhibiert selektiv die Aktivierung von RIP1 und TBK1 (Youn et al., 2005). Diese beiden Kinasen sind nur an der Signaltransduktion von TLR3 und RIG-I/mda-5 beteiligt (Meylan and

Tschopp, 2006). Diese Kinasen bilden ein weiteres regulatorisches Element in der über sie vermittelten Signaltransduktion. Durch die Aktivierung von TBK1 wird die Expression von IRF3 regulierten Genen (z. B. IFN-β) induziert, während die Phosporilierung von RIP1 im weiteren Verlauf zur zeitverzögerten Aktivierung von NF-κB führt (siehe Abb. 1). Dieses System bietet auch eine Erklärung für die NF-κB-abhängigkeit der IP-10 Expression (Abb. 24). Interessanterweise konnte die IP-10 Expression auch mit sehr hohen Dosen des NF-κB-Inhibitors Isohelenalin nicht komplett unterbunden werden (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte in der Überlagerung zweier Effekte liegen. Zum einem der NF-κB-unabhängigen Aktivierung über IFN-β und zum anderen der Aktivierung über die verzögerte NF-κB-Aktivierung. Beides steht im Einklang mit dem unterschiedlichen Zeitverlauf der IFN-β- und IP-10-Expression.

Die zuvor durchgeführten Versuche hatten gezeigt, dass für die Reaktion die aktive Aufnahme durch Endocytose notwendig ist, was die Vermutung nahe legt, dass der in den Endosomen lokalisierte TLR3 an der Konidien-RNA-Erkennung beteiligt ist. Diese Vermutung wurde durch die Transfektion von HEK293-Zellen bestätigt. Durch die Stimulation von transient mit TLR3 transfizierten HEK293-Zellen mit der Konidien-RNA wurde die IFN-β und IP-10 Expression in diesen Zellen induziert. Die Stimulation dieser Zellen mit Konidien führte überraschenderweise zu keiner Reaktion. Eine mögliche Erklärung dafür konnte sein, dass die HEK-Zellen aufgrund ihrer geringen Größe nicht in der Lage sind die Konidien aufzunehmen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen somit deutlich, dass Atemwegsepithelzellen auf die dsRNA aus *Aspergillus fumigatus* Konidien reagieren und, dass diese Reaktion TLR3 abhängig ist. Sie bestätigen darüber hinaus die Daten von Aksoy et al. , die zeigen konnten das TLR3 auch durch extrazelluläre Pathogene aktiviert werden kann und nicht nur virale dsRNA erkennt (Aksoy et al., 2005). Die Erkennung von *A. fumigatus* über dsRNA macht es zudem wahrscheinlich, dass Atemwegsepithelzellen auch andere Pilzsporen über diesen Weg erkennen können. Grundvoraussetzung dafür ist, dass die Sporen von den Epithelzellen aufgenommen werden können und dass die dsRNA im Endosom freigesetzt wird.

Schlussbemerkung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen, dass Atemwegsepithelzellen in der Lage sind bakterielle Bestandteile zu erkennen und aktiv an der Abwehr einer Infektion teilnehmen. Die Resultate zeigen zudem, dass Makrophagen durch die Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen die Fähigkeit des Epithels auf eine bakterielle Infektion zu reagieren verbessern. Von Makrophagen sezerniertes TNF-α führt zu einer verstärkten TLR-Expression. Dadurch wird das Atemwegsepithel, welches unter normalen Bedingungen nur sehr schwach auf den Kontakt mit Bakterien reagiert, für deren Erkennung sensibilisiert was wiederum eine deutliche Verstärkung der Entzündungsreaktion zu Folge. Dieses System verhindert, dass jeder Kontakt des Epithels mit Bakterien zu einer Entzündungsreaktion führt gewährleistet jedoch im Gegenzug, dass eine Infektion im Ernstfall schnell und effektiv bekämpft werden kann. Berücksichtig man die Daten anderer Studien, die einen gleichartigen Einfluss der Makrophagen auch auf andere Zellen (Morris et al., 2005; Morris et al., 2006) sowie eine Regulation der Makrophagenaktivierung durch das Atemwegsepithel beschreiben (Takabayshi et al., 2006). So erhält man Einblick in die komplexe Interaktion von Immun- und Gewebezellen sowie das Netzwerk der an der Immunantwort beteiligten Zellen.

Die Reaktion der Atemwegsepithelzellen auf die Konidien Exposition verdeutlichen nochmals die Relevanz des Epithels als physikalische Barriere. Die Resultate zeigen zudem, das dass Atemwegsepithel auch gegen komplexere Pathogene wie Pilzsporen einen effektiven Schutz bietet und darüber hinaus aktiv an deren Erkennung beteiligt ist.

Literatur

1. Abreu,M.T., Vora,P., Faure,E., Thomas,L.S., Arnold,E.T., and Arditi,M. (2001). Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. *167*, 1609-1616.

2. Adamo,R., Sokol,S., Soong,G., Gomez,M.I., and Prince,A. (2004). Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *30*, 627-634.

3. Akbar,A.N., Lord,J.M., and Salmon,M. (2000). IFN-alpha and IFN-beta: a link between immune memory and chronic inflammation. Immunol. Today *21*, 337-342.

4. Akira,S. (2003). Toll-like receptor signaling. J. Biol. Chem. *278*, 38105-38108.

5. Akira,S. and Sato,S. (2003). Toll-like receptors and their signaling mechanisms. Scand. J. Infect. Dis. *35*, 555-562.

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

7. Aksoy,E., Zouain,C.S., Vanhoutte,F., Fontaine,J., Pavelka,N., Thieblemont,N., Willems,F., Ricciardi-Castagnoli,P., Goldman,M., Capron,M., Ryffel,B., and Trottein,F. (2005). Double-stranded RNAs from the helminth parasite Schistosoma activate TLR3 in dendritic cells. J. Biol. Chem. *280*, 277-283.

8. Allen,M.J., Harbeck,R., Smith,B., Voelker,D.R., and Mason,R.J. (1999). Binding of rat and human surfactant proteins A and D to Aspergillus fumigatus conidia. Infect. Immun. *67*, 4563-4569.

9. Balloy,V., Si-Tahar,M., Takeuchi,O., Philippe,B., Nahori,M.A., Tanguy,M., Huerre,M., Akira,S., Latge,J.P., and Chignard,M. (2005). Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. Infect. Immun. *73*, 5420-5425.

10. Bals,R. and Hiemstra,P.S. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. Eur. Respir. J. *23*, 327-333.

11. Barton,G.M. and Medzhitov,R. (2002). Toll-like receptors and their ligands. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *270*, 81-92.

12. Basich,J.E., Graves,T.S., and Baz,M.N. (1981). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics. J. Allergy Clin. Immunol. *68*, 98-102.

13. Beisswenger,C. and Bals,R. (2005). Antimicrobial peptides in lung inflammation. Chem. Immunol. Allergy *86*, 55-71.

14. Beisswenger,C., Kandler,K., Hess,C., Garn,H., Felgentreff,K., Wegmann,M., Renz,H., Vogelmeier,C., and Bals,R. (2006). Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. J. Immunol. *177*, 1833-1837.

15. Bell,J.K., Mullen,G.E., Leifer,C.A., Mazzoni,A., Davies,D.R., and Segal,D.M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. Trends Immunol. *24*, 528-533.

16. Bellocchio,S., Moretti,S., Perruccio,K., Fallarino,F., Bozza,S., Montagnoli,C., Mosci,P., Lipford,G.B., Pitzurra,L., and Romani,L. (2004). TLRs Govern Neutrophil Activity in Aspergillosis. J. Immunol. *173*, 7406-7415.

17. Binder,R.E., Faling,L.J., and Pugatch,R.D. (2006). Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis:a discrete clinical entity. Medicine *61*, 109-124.

18. Bingle,C.D. and Craven,C.J. (2002). PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. Hum. Mol. Genet. *11*, 937-943.

19. Biron,C.A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. Immunity. *14*, 661-664.

20. Bodey,G.P. and Vartivarian,S. (1989). Aspergillosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *8*, 413-437.

21. Boon,A.P., Adams,D.H., Buckels,J., and McMaster,P. (1990). Cerebral aspergillosis in liver transplantation. J. Clin. Pathol. *43*, 114-118.

22. Brinkmann,V., Reichard,U., Goosmann,C., Fauler,B., Uhlemann,Y., Weiss,D.S., Weinrauch,Y., and Zychlinski,A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 1532-1535.

23. Brown,G.D. and Gordon,S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. Nature *413*, 36-37.

24. Brown,G.D., Herre,J., Williams,D.L., Willment,J.A., Marshall,A.S., and Gordon,S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. J. Exp. Med. *197*, 1119-1124.

25. Caamano,J. and Hunter,C.A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. Clin. Microbiol. Rev. *15*, 414-429.

26. Cerri,C., Chimenti,D., Conti,I., Neri,T., Paggiaro,P., and Celi,A. (2006). Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. J. Immunol. *177*, 1975-1980.

27. Chazalet,V., Debeaupuis,J.P., Sarfati,J., Lortholary,J., Ribaud,P., Shah,P., Cornet,M., Vu,T.H., Gluckman,E., Brucker,G., and Latge,J.P. (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings. J. Clin. Microbiol. *36*, 1494-1500.

28. Clausen,B.E., Burkhardt,C., Reith,W., Renkawitz,R., and Förster,I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. Transgenic Research *8*, 265-277.

29. Cockrill,B.A. and Hales,C.A. (1999). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Annu. Rev. Med. *50*, 303-316.

30. Cohen,J., Denning,D.W., and Viviani,M.A. (1993). Epidemiology of invasive aspergillosis in European cancer centres. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *12*, 392-393.

31. Cowland,J.B., Johnsen,A.H., and Borregaard,N. (1995). hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. FEBS Lett. *368*, 173-176.

32. Csekeo,A., Agocs,L., and Egervary,M. (1997). [Surgical management of pulmonary aspergilloma]. Orv. Hetil. *138*, 2219-2221.

33. Curtis,J.L. (2005). Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. Proc. Am. Thorac. Soc. *2*, 412-416.

34. DeHart,D.J., Agwu,D.E., Julian,N.C., and Washburn,R.G. (1997). Binding and germination of Aspergillus fumigatus conidia on cultured A549 pneumocytes. J. Infect. Dis. *175*, 146-150.

35. Denning,D.W. (1994). Treatment of invasive aspergillosis. J. Infect. *28 Suppl 1*, 25-33.

36. Denning,D.W. (1996). Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. Clin. Infect. Dis. *23*, 608-615.

37. Denning,D.W. (1998). Invasive aspergillosis. Clin. Infect. Dis. *26*, 781-803.

38. Diamond,G., Legarda,D., and Ryan,L.K. (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. Immunol. Rev. *173*, 27-38.

39. Diamond,R.D., Krzesicki,R., Epstein,B., and Jao,W. (1978). Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro: a possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. Am. J. Pathol. *91*, 313-328.

40. Dixon,D.M., McNeil,M.M., Cohen,M.L., Gellin,B.G., and La,M., Jr. (1996). Fungal infections: a growing threat. Public Health Rep. *111*, 226-235.

41. Dixon,D.M. and Walsh,T.J. (1992). Human pathogenesis. Biotechnology *23*, 249-267.

42. Dziarski,R. and Gupta,D. (2005). Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. Infect. Immun. *73*, 5212-5216.

43. Felgentreff,K., Beisswenger,C., Griese,M., Gulder,T., Bringmann,G., and Bals,R. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus. Peptides *27*, 3100-3106.

44. Fitzgerald,K.A., McWhirter,S.M., Faia,K.L., Rowe,D.C., Latz,E., Golenbock,D.T., Coyle,A.J., Liao,S.M., and Maniatis,T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. Nat. Immunol. *4*, 491-496.

45. Fujiwara,N. and Kobayashi,K. (2005). Macrophages in inflammation. Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy 281-286.

46. Gantner,B.N., Simmons,R.M., Canavera,S.J., Akira,S., and Underhill,D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. J. Exp. Med. *197*, 1107-1117.

47. Garcia,J.R., Krause,A., Schulz,S., Rodriguez-Jimenez,F.J., Kluver,E., Adermann,K., Forssmann,U., Frimpong-Boateng,A., Bals,R., and Forssmann,W.G. (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. FASEB J. *15*, 1819-1821.

48. Gay,N.J. and Keith,F.J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature *351*, 355-356.

49. Gersuk,G.M., Underhill,D.M., Zhu,L., and Marr,K.A. (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different Aspergillus fumigatus cellular states. J. Immunol. *176*, 3717-3724.

50. Greene,C.M., Carroll,T.P., Smith,S.G., Taggart,C.C., Devaney,J., Griffin,S., O'Neill,S.J., and McElvaney,N.G. (2005). TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. J. Immunol. *174*, 1638-1646.

51. Greene,C.M. and McElvaney,N.G. (2005). Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) *53*, 418-427.

52. Groll,A.H., Shah,P.M., Mentzel,C., Schneider,M., Just-Nuebling,G., and Huebner,K. (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. J. Infect. *33*, 23-32.

53. Guillot,L., Medjane,S., Le-Barillec,K., Balloy,V., Danel,C., Chignard,M., and Si-Tahar,M. (2004). Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. J. Biol. Chem. *279*, 2712-2718.

54. Hadley,J.S., Wang,J.E., Foster,S.J., Thiemermann,C., and Hinds,C.J. (2005). Peptidoglycan of Staphylococcus aureus upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. Infect. Immun. *73*, 7613-7619.

55. Harder,J., Bartels,J., Christophers,E., and Schroder,J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J. Biol. Chem. *276*, 5707-5713.

56. Harder,J., Meyer-Hoffert,U., Teran,L.M., Schwichtenberg,L., Bartels,J., Maune,S., and Schroder,J.M. (2000). Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *22*, 714-721.

57. Heid,C.A., Stevens,J., Livak,K.J., and Williams,P.M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Res. *6*, 986-994.

58. Heller,W.T., Waring,A.J., Lehrer,R.I., Harroun,T.A., Weiss,T.M., Yang,L., and Huang,H.W. (2000). Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. Biochemistry *39*, 139-145.

59. Hertz,C.J., Wu,Q., Porter,E.M., Zhang,Y.J., Weismuller,K.H., Godowski,P.J., Ganz,T., Randell,S.H., and Modlin,R.L. (2003). Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. J. Immunol. *171*, 6820-6826.

60. Hertzog,P.J., O'Neill,L.A., and Hamilton,J.A. (2003). The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. Trends Immunol. *24*, 534-539.

61. Hiemstra,P.S. (2001). Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation. Paediatr. Respir. Rev. *2*, 306-310.

62. Hoebe,K., Janssen,E.M., Kim,S.O., Alexopoulou,L., Flavell,R.A., Han,J., and Beutler,B. (2003). Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. Nat. Immunol. *4*, 1223-1229.

63. Hogaboam,C.M., Carpenter,K.J., Schuh,J.M., and Buckland,K.F. (2005). Aspergillus and asthma--any link? Med. Mycol. *43 Suppl 1*, S197-S202.

64. Hohl,T.M., Van Epps,H.L., Rivera,A., Morgan,L.A., Chen,P.L., Feldmesser,M., and Pamer,E.G. (2005). Aspergillus fumigatus triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. PLoS. Pathog. *1*, e30.

65. Homma,T., Kato,A., Hashimoto,N., Batchelor,J., Yoshikawa,M., Imai,S., Wakiguchi,H., Saito,H., and Matsumoto,K. (2004). Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *31*, 463-469.

66. Honda,K., Yanai,H., Takaoka,A., and Taniguchi,T. (2005). Regulation of the type I IFN induction: a current view. Int. Immunol. *17*, 1367-1378.

67. Ibrahim-Granet,O., Philippe,B., Boleti,H., Boisvieux-Ulrich,E., Grenet,D., Stern,M., and Latge,J.P. (2003). Phagocytosis and intracellular fate of Aspergillus fumigatus conidia in alveolar macrophages. Infect. Immun. *71*, 891-903.

68. Israel,H.L., Lenchner,G.S., and Atkinson,G.W. (1982). Sarcoidosis and aspergilloma. The role of surgery. Chest *82*, 430-432.

69. Jacquot,J., Hayem,A., and Galabert,C. (1992). Functions of proteins and lipids in airway secretions. Eur. Respir. J. 343-358.

70. Jin,M., Opalek,J.M., Marsh,C.B., and Wu,H.M. (2004). Proteome comparison of alveolar macrophages with monocytes reveals distinct protein characteristics. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 322-329.

71. Kang,D.C., Gopalkrishnan,R.V., Wu,Q., Jankowsky,E., Pyle,A.M., and Fisher,P.B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *99*, 637-642.

72. Kato,H., Takeuchi,O., Sato,S., Yoneyama,M., Yamamoto,M., Matsui,K., Uematsu,S., Jung,A., Kawai,T., Ishii,K.J., Yamaguchi,O., Otsu,K., Tsujimura,T., Koh,C.S., Reis e Sousa, Matsuura,Y., Fujita,T., and Akira,S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature *441*, 101-105.

73. Kirschning,C.J. and Schumann,R.R. (2002). TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *270*, 121-144.

74. Kooguchi,K., Hashimoto,S., Kobayashi,A., Kitamura,Y., Kudoh,I., Wiener-Kronish,J., and Sawa,T. (1998). Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Infect. Immun. *66*, 3164-3169.

75. Koyama,S., Sato,E., Nomura,H., Kubo,K., Miura,M., Yamashita,T., Nagai,S., and Izumi,T. (1999). The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. Eur. Respir. J. *14*, 545-552.

76. Krakauer,T. (2002). Stimulant-Dependent Modulation of Cytokines and Chemokines by Airway Epithelial Cells: Cross Talk between Pulmonary Epithelial and Peripheral Blood Mononuclear Cells. Clin. Diagn. Lab. Immunol. *9*, 126-131.

77. Kuhn,R., Schwenk,F., Aguet,M., and Rajewsky,K. (1995). Inducible gene targeting in mice. Science *269*, 1427-1429.

78. Kwon-Chung,K.J. and Bennett,J.E. (1992). Medical mycology. (Philadelphia: Lea&Febiger).

79. Latge,J.P. (1999). Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. *12*, 310-350.

80. Lavigne,L.M., Albina,J.E., and Reichner,J.S. (2006). ß-Glucan is a fungal Determinant for Adhesion-Dependant Human Neutrophil functions. J. Immunol. *177*, 8667-8675.

81. Le,B.A. and Tough,D.F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. Curr. Opin. Immunol. *14*, 432-436.

82. Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell *86*, 973-983.

83. Lillehoj,E.R. and Kim,K.C. (2002). Airway mucus: its components and function. Arch. Pharm. Res. 770-780.

84. Liou,H.C. (2002). Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. J. Biochem. Mol. Biol. *35*, 537-546.

85. Liu,L., Roberts,A.A., and Ganz,T. (2003). By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. J. Immunol. *170*, 575-580.

86. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delte C(T)) Method. Methods *25*, 402-408.

87. Lopez-Boado,Y.S., Cobb,L.M., and Deora,R. (2005). Bordetella bronchiseptica flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. Infect. Immun. *73*, 7525-7534.

88. Madan,T., Eggleton,P., Kishore,U., Strong,P., Aggrawal,S.S., Sarma,P.U., and Reid,K.B. (1997). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to Aspergillus fumigatus conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. Infect. Immun. *65*, 3171-3179.

89. Madan,T., Kaur,S., Saxena,S., Singh,M., Kishore,U., Thiel,S., Reid,K.B., and Sarma,P.U. (2005). Role of collectins in innate immunity against aspergillosis. Med. Mycol. *43 Suppl 1*, S155-S163.

90. Mambula,S.S., Sau,K., Henneke,P., Golenbock,D.T., and Levitz,S.M. (2002). Toll-like receptor (TLR) signaling in response to Aspergillus fumigatus. J. Biol. Chem. *277*, 39320-39326.

91. Marr,K.A., Balajee,S.A., Hawn,T.R., Ozinsky,A., Pham,U., Akira,S., Aderem,A., and Liles,W.C. (2003). Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. Infect. Immun. *71*, 5280-5286.

92. Marr,K.A., Patterson,T., and Denning,D.W. (2002). Aspergillosis: pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. Infect. Dis. Clin. North Am. *16*, 875.

93. Matsumoto,M., Funami,K., Tanabe,M., Oshiumi,H., Shingai,M., Seto,Y., Yamamoto,A., and Seya,T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J. Immunol. *171*, 3154-3162.

94. Mattoli,S., Colotta,F., Fincato,G., Mezzetti,M., Mantovani,A., Patalano,F., and Fasoli,A. (1991). Time course of IL1 and IL6 synthesis and release in human bronchial epithelial cell cultures exposed to toluene diisocyanate. J. Cell Physiol *149*, 260-268.

95. Maus,U.A., Koay,M.A., Delbeck,T., Mack,M., Ermert,M., Ermert,L., Blackwell,T.S., Christman,J.W., Schlondorff,D., Seeger,W., and Lohmeyer,J. (2002). Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol *282*, L1245-L1252.

96. McCray,P.B., Jr. and Bentley,L. (1997). Human airway epithelia express a beta-defensin. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *16*, 343-349.

97. Meier,A., Kirschning,C.J., Nikolaus,T., Wagner,H., Heesemann,J., and Ebel,F. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for Aspergillus-induced activation of murine macrophages. Cell Microbiol. *5*, 561-570.

98. Menzies,B.E. and Kenoyer,A. (2006). Signal transduction and nuclear responses in Staphylococcus aureus-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. Infect. Immun. *74*, 6847-6854.

99. Meylan,E. and Tschopp,J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell *22*, 561-569.

100. Midorikawa,K., Ouhara,K., Komatsuzawa,H., Kawai,T., Yamada,S., Fujiwara,T., Yamazaki,K., Sayama,K., Taubman,M.A., Kurihara,H., Hashimoto,K., and Sugai,M. (2003). Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. Infect. Immun. *71*, 3730-3739.

101. Morris,G.E., Parker,L.C., Ward,J.R., Jones,E.C., Whyte,M.K., Brightling,C.E., Bradding,P., Dower,S.K., and Sabroe,I. (2006). Cooperative molecular and cellular networks regulate Toll-like receptor-dependent inflammatory responses. FASEB J. *20*, 2153-2155.

102. Morris,G.E., Whyte,M.K., Martin,G.F., Jose,P.J., Dower,S.K., and Sabroe,I. (2005). Agonists of toll-like receptors 2 and 4 activate airway smooth muscle via mononuclear leukocytes. Am. J. Respir. Crit Care Med. *171*, 814-822.

103. Mroueh,S. and Spock,A. (1994). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. Chest *105*, 32-36.

104. Muir,A., Soong,G., Sokol,S., Reddy,B., Gomez,M.I., Van,H.A., and Prince,A. (2004). Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *30*, 777-783.

105. Nakamura,H., Yoshimura,K., Jaffe,H.A., and Crystal,R.G. (1991). Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. J. Biol. Chem. *266*, 19611-19617.

106. Nakayashiki,H., Kadotani,N., and Mayama,S. (2006). Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. J. Mol. Evol. *63*, 127-135.

107. Netea,M.G., Warris,A., van der Meer,J.W., Fenton,M.J., Verver-Janssen,T.J., Jacobs,L.E., Andresen,T., Verweij,P.E., and Kullberg,B.J. (2003). Aspergillus fumigatus evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. J. Infect. Dis. *188*, 320-326.

108. Niroumand,M. and Grossman,R.F. (1998). Airway infection. Infect. Dis. Clin. North Am. *12*, 671-688.

109. Nomura,F., Akashi,S., Sakao,Y., Sato,S., Kawai,T., Matsumoto,M., Nakanishi,K., Kimoto,M., Miyake,K., Takeda,K., and Akira,S. (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J. Immunol. *164*, 3476-3479.

110. O'Neill,L.A. (2002). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *270*, 47-61.

111. Paris,S., Boisvieux-Ulrich,E., Crestani,B., Houcine,O., Taramelli,D., Lombardi,L., and Latge,J.P. (1997). Internalization of Aspergillus fumigatus conidia by epithelial and endothelial cells. Infect. Immun. *65*, 1510-1514.

112. Paris,S., Debeaupuis,J.P., Crameri,R., Carey,M., and Charles,F. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 1581-1588.

113. Pastor,A., Gafa,V., Boutonnat,J., Grillot,R., Ambroise-Thomas,P., and Aldebert,D. (2005). Intracellular oxidative response of human monocytes and granulocytes to different strains of *Aspergillus fumigatus*. Mycoses *49*, 73-79.

114. Philippe,B., Ibrahim-Granet,O., Prevost,M.C., Gougerot-Pocidalo,M.A., Sanchez,P.M., Van der,M.A., and Latge,J.P. (2003). Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect. Immun. *71*, 3034-3042.

115. Prescott,R.J., Harris,M., and Banerjee,S.S. (1992). Fungal infections of the small and large intestine. J. Clin. Pathol. *45*, 806-811.

116. Prince,A. (2006). Flagellar activation of epithelial signaling. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *34*, 548-551.

117. Rajewsky,K., Gu,H., Kuhn,R., Betz,U.A., Muller,W., Roes,J., and Schwenk,F. (1996). Conditional gene targeting. J. Clin. Invest *98*, 600-603.

118. Raper,K.B. and Fennell,D.I. (1965). *Aspergillus fumigatus* group. In The genus *Aspergillus*, K.B.Raper and D.I.Fennell, eds. (Baltimore: William&Wilkins), pp. 238-268.

119. Rennard,S.I., Romberger,D.J., Sisson,J.H., Von Essen,S.G., Rubinstein,I., Robbins,R.A., and Spurzem,J.R. (1994). Airway epithelial cells: functional roles in airway disease. Am. J. Respir. Crit Care Med. *150*, S27-S30.

120. Rogers,T.R. (1995). Epidemiology and control of nosocomial fungal infections. Curr. Opin. Infect. Dis. *8*, 287-290.

121. Satta,N., Toti,F., Feugeas,O., Bohbot,A., chary-Prigent,J., Eschwege,V., Hedman,H., and Freyssinet,J.M. (1994). Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. J. Immunol. *153*, 3245-3255.

122. Schaffner,A., Douglas,H., and Braude,A. (1982). Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to Aspergillus. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. J. Clin. Invest *69*, 617-631.

123. Schibli,D.J., Hunter,H.N., Aseyev,V., Starner,T.D., Wiencek,J.M., McCray,P.B., Jr., Tack,B.F., and Vogel,H.J. (2002). The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus. J. Biol. Chem. *277*, 8279-8289.

124. Schneider,J.J., Unholzer,A., Schaller,M., Schafer-Korting,M., and Korting,H.C. (2005). Human defensins. J. Mol. Med. *83*, 587-595.

125. Schutte,B.C. and McCray,P.B., Jr. (2002). [beta]-defensins in lung host defense. Annu. Rev. Physiol *64*, 709-748.

126. Sen,G.C. and Sarkar,S.N. (2005). Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. Cytokine Growth Factor Rev. *16*, 1-14.

127. Sha,Q., Truong-Tran,A.Q., Plitt,J.R., Beck,L.A., and Schleimer,R.P. (2004). Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *31*, 358-364.

128. Shapiro,K. and Tabaddor,K. (1975). Cerebral aspergillosis. Surg. Neurol. *4*, 465-471.

129. Shuto,T., Furuta,T., Oba,M., Xu,H., Li,J.D., Cheung,J., Gruenert,D.C., Uehara,A., Suico,M.A., Okiyoneda,T., and Kai,H. (2006). Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. FASEB J. *20*, 782-784.

130. Sijen,T. and Plasterk,R.H. (2003). Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi. Nature *426*, 310-314.

131. Silva,A.M., Whitmore,M., Xu,Z., Jiang,Z., Li,X., and Williams,B.R. (2004). Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. J. Biol. Chem. *279*, 37670-37676.

132. Singh,P.K., Jia,H.P., Wiles,K., Hesselberth,J., Liu,L., Conway,B.A., Greenberg,E.P., Valore,E.V., Welsh,M.J., Ganz,T., Tack,B.F., and McCray,P.B., Jr. (1998). Production of beta-defensins by human airway epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95*, 14961-14966.

133. Smith,K.D. and Ozinsky,A. (2002). Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *270*, 93-108.

134. Smith,S.M., Lee,D.K., Lacy,J., and Coleman,D.L. (1990). Rat tracheal epithelial cells produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *2*, 59-68.

135. Soubani,A.O. and Chandrasekar,P.H. (2002). The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Chest *121*, 1988-1999.

136. Steele,C., Rapaka,R.R., Metz,A., Pop,S.M., Williams,D.L., Gordon,S., Kolls,J.K., and Brown,G.D. (2005). The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of Aspergillus fumigatus. PLoS. Pathog. *1*, e42.

137. Suzuki,N., Suzuki,S., Duncan,G.S., Millar,D.G., Wada,T., Mirtsos,C., Takada,H., Wakeham,A., Itie,A., Li,S., Penninger,J.M., Wesche,H., Ohashi,P.S., Mak,T.W., and Yeh,W.C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. Nature *416*, 750-756.

138. Tak,P.P. and Firestein,G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J. Clin. Invest *107*, 7-11.

139. Takabayshi,K., Corr,M., Hayashi,T., Redecke,V., Beck,L., Guiney,D., Sheppard,D., and Raz,E. (2006). Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. Immunity. *24*, 475-487.

140. Takaoka,A. and Yanai,H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. Cell Microbiol. *8*, 907-922.

141. Takeda,K. and Akira,S. (2004). TLR signaling pathways. Semin. Immunol. *16*, 3-9.

142. Takeuchi,O. and Akira,S. (2002). MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *270*, 155-167.

143. Tomee,J.F., van der Werf,T.S., and Latge,J.P. (1995). Serologic monitoring of disease and treatment in a patient with pulmonary aspergilloma. Am. J. Respir. Crit Care Med. *151*, 199-204.

144. Toshchakov,V., Jones,B.W., Perera,P.Y., Thomas,K., Cody,M.J., Zhang,S., Williams,B.R., Major,J., Hamilton,T.A., Fenton,M.J., and Vogel,S.N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. Nat. Immunol. *3*, 392-398.

145. Tough,D.F., Borrow,P., and Sprent,J. (1996). Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. Science *272*, 1947-1950.

146. Tsutsumi-Ishii,Y. and Nagaoka,I. (2003). Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. J. Immunol. *170*, 4226-4236.

147. Wang,J.L., Patterson,R., and Rosenberg,M. (1978). Serum IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* as a diagnostic aid in allergic bronchopulmonary aspergillosis. Am. Rev. Respir. Dis. *117*, 917-927.

148. Warris,A. and Verweij,P.E. (2005). Clinical implications of environmental sources for Aspergillus. Med. Mycol. *43 Suppl 1*, S59-S65.

149. Wasylnka,J.A., Hissen,A.H., Wan,A.N., and Moore,M.M. (2005). Intracellular and extracellular growth of Aspergillus fumigatus. Med. Mycol. *43 Suppl 1*, S27-S30.

150. Wasylnka,J.A. and Moore,M.M. (2003). Aspergillus fumigatus conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. J. Cell Sci. *116*, 1579-1587.

151. Wasylnka,J.A. and Moore,M.M. (2002). Uptake of Aspergillus fumigatus Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. Infect. Immun. *70*, 3156-3163.

152. Willment,J.A., Marshall,A.S., Reid,D.M., Williams,D.L., Wong,S.Y., Gordon,S., and Brown,G.D. (2005). The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. Eur. J. Immunol. *35*, 1539-1547.

153. Wilson,R. and Dowling,R.B. (1998). Lung infections. 3. Pseudomonas aeruginosa and other related species. Thorax *53*, 213-219.

154. Wolfs,T.G., Buurman,W.A., van,S.A., de,V.B., Daemen,M.A., Hiemstra,P.S., and van,'., V (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. J. Immunol. *168*, 1286-1293.

155. Wu,M., Maier,E., Benz,R., and 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.

156. Xiao,C. and Ghosh,S. (2005). NF-kappaB, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses. Adv. Exp. Med. Biol. *560*, 41-45.

157. Yamada,O., Ikeda,R., Ohkita,Y., Hayashi,R., Sakamoto,K., and Akita,O. (2007). Gene Silencing by RNA Interference in the Koji Mold Aspergillus oryzae. Biosci. Biotechnol. Biochem. *71*, 138-144.

158. Yoneyama,M., Kikuchi,M., Natsukawa,T., Shinobu,N., Imaizumi,T., Miyagishi,M., Taira,K., Akira,S., and Fujita,T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat. Immunol. *5*, 730-737.

159. Youn,H.S., Lee,J.Y., Fitzgerald,K.A., Young,H.A., Akira,S., and Hwang,D.H. (2005). Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. J. Immunol. *175*, 3339-3346.

160. Zhang,Z., Louboutin,J.P., Weiner,D.J., Goldberg,J.B., and Wilson,J.M. (2005). Human airway epithelial cells sense Pseudomonas aeruginosa infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. Infect. Immun. *73*, 7151-7160.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Christian Hess
Geburtsdatum:	21.04.1976 in Kassel
Familienstand:	ledig
Adresse:	Milchlingstr. 7
	34121 Kassel
	Tel.: (05 61) 2 88 68 87 o. (01 77) 3 30 30 25

Schulausbildung

1982 – 1992	Grundschule mit Förderstufe in Kassel
1992 – 1995	Herderschule Oberstufengymnasium Kassel
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note 2,8

Zivildienst

1995 – 1996	DRK Rettungsdienst Kassel

Hochschulausbildung

1996 – 1999	Diplomstudiengang der Biologie
	Universität Gesamthochschule Kassel
	Gesamtnote Vordiplom: befriedigend
1999 – 2003	Hauptstudium der Biologie
	Georg – August – Universität Göttingen
	Hauptfach: Zoologie
	Nebenfächer: Anthropologie und Geographie
	Gesamtnote Diplom: gut

Beruflicher Werdegang

07/2003-01/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG PD Dr. Dr. Bals Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
seit 09/2003	Promotionsstudent im Aufbaustudiengang Humanbiologie an der Philipps Universität Marburg

Publikationen und Präsentationen

Artikel	Beisswenger C, Kandler K, **Hess C**, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Renz H, Vogelmeier C, Bals R: Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. J Immunol 2006 177: 1833-1837 Kandler K, **Hess C,** Alalwani S, Bals R: The murine cathelicidin CRAMP is a negative regulator of innate immunity during respiratory tract infections; in Vorbereitung Hess C, Giorkhelidze T, Chanishvili N, Bals R: Bacteriophage inhibit airway epithelial infection and inflammation; in Vorbereitung Hess C, Beisswenger C, Bals R: Activation of epithelial host defense by microorganisms depends on macrophage cytokines (Arbeitstitel); in Vorbereitung Hess C, Beisswenger C, Bauer S, Schröppel K, Dalpke A, Bals R: Airway epithelial cells sense fungal mRNA through Toll-like Receptor 3 (Arbeitstitel); in Vorbereitung Beisswenger C, Herr C, **Hess C**, Kandler K, Suttorp N, Welte T, Vogelmeier C, Bals R: Suppression of Pulmonary host defense in smokers; in Vorbereitung

Vorträge

Hess C (2003), Prinzipien des Nachweises langer Deletionen an degradierter DNA aus forensischem und historischem Probenmaterial. 5. Kongress der Gesellschaft für Anthropologie (GfA), Potsdam, 17.-20. September 2003

Hess C (2005), Atemwegsepithelzellen werden durch Makrophagen-typische Zytokine für die Erkennung von bakteriellen Komponenten sensibilisiert. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP), Bonn, 14.-15. Oktober 2005

Hess C (2006), Die Aufnahme von Aspergillus fumigatus Konidien induziert IFN-ß und IP-10 in humanen Atemwegsepithelzellen. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP), Mainz, 3.-4. November 2006

Poster

Beisswenger C, **Hess C**, Anders S, Schroeppel K, Bals R (2005), Aspergillus fumigatus conidia induce internalization dependent IFN-ß and IP-10 expression in airway epithelial cells. 15. Annual ERS Congress, Kopenhagen, 17.-19. September

Hess C, Bals R (2006), Atemwegsepithelzellen werden durch Makrophagen-typische Zytokine für die Erkennung von bakteriellen Komponenten sensibilisiert. 47. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) Nürnberg, 29. März- 01. April

Hess C, Stanze D, Bals R (2006), Interaction of macrophages and airway epithelial cells. 16. Annual ERS Congress, München, 2.-6. September

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen / Herren

In Kassel:

Castenholz
Follmann
Freitag
Kulisch
Meinel
Müller
Nellen
Schmidt
Wörrmann-Repenning

In Göttingen:

Gottwald
Herrmann
Hummel
Paul
Podufal
Rothe
Schürmann
Willmann

In Marburg:

Bals
Bauer
Garn
Vogelmeier

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank…

…Herrn Privatdozenten Dr. Dr. Robert Bals für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie der Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

…Kerstin und Christoph, die mir von Anfang an mit Rat und Tat zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten. Ohne euch würde mir die Zeit in Marburg in weniger guter Erinnerung bleiben.

… Judith, Christian und Frank, für die stetige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Ihr habt immer für ein angenehmes, wenn auch teilweise stürmisches Arbeitsklima gesorgt.

… den guten Seelen des Labors: Annette, Katrin und Thomas, für eure fortwährende Unterstützung und die schöne Zeit die ich mit euch verbringen durfte.

… den angehenden Ärzten: Hannes, Uli und Jürgen, für die entgegengebrachte Freundschaft und dafür, dass sie mir die Sicherheit geben, dass es auch in Zukunft gute und fähige Mediziner geben wird.

… allen meinen lieben Freunden. Für die schönen und entspannenden Stunden abseits des Arbeitsalltags. Jeder von euch hat auf seine Art zum gelingen dieser Arbeit beigetragen.

… meiner Familie. Ihr habt mir diesen Weg ermöglicht und mich immer Unterstütz.

Mein unermesslicher Dank gilt Christine, du hast mir die Kraft und die Zuversicht gegeben, die ich in dieser Zeit gebraucht habe. Du hast mir Freiräume geschaffen und den Rücken gestärkt. Deine Liebe ist mein Antrieb.

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Eine Unterstützung der Arbeit fand durch folgende Personen statt:

PD Dr. Dr. Robert Bals:	Bereitstellung des Themas und fortwährende Betreuung
Kerstin Kändler:	Etablierung des murinen Infektionsmodells
Thomas Damm:	technische Unterstützung
Annette Püchner:	technische Unterstützung
Katrin Rüttger:	technische Unterstützung

Marburg, Februar 2007