

Aus der Medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. P. Zabel

Die angeborene Immunität in der humanen Lunge
am Beispiel der Infektion mit *Haemophilus influenzae*
und ihrer Modulation durch *Chlamydia pneumoniae*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
- aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Kristina Rohmann
aus Osnabrück

Lübeck 2010

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Härtel
Tag der mündlichen Prüfung:	13.05.2011
Zum Druck genehmigt:	Lübeck, den 13.05.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Die COPD – eine inflammatorische Erkrankung	1
1.2	Die Bedeutung von Infektionen bei COPD	4
1.3	Zielsetzung der Arbeit und Fragestellungen	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Zellkulturmodell	10
2.2	Anzucht und Vorbereitung der Erreger	13
2.3	FACS, Western Blot, ELISA	16
2.4	Vitalität und Zytotoxizität	20
2.5	Stimulation und Inhibition	23
2.6	Humanes Lungengewebsmodell	24
2.7	Statistische Analyse	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Pulmonale Zielzellen der frühen Phase respiratorischer Infektionen mit NTHi	31
3.2	Veränderungen der Zytokinexpression im humanen Lungengewebe nach Infektion mit NTHi	32
3.3	Modulation der Entzündungsreaktion auf NTHi durch atypische Pathogene	34
3.4	Bedeutung von Toll like-Rezeptoren für Erregererkennung und Entzündungsreaktion nach Infektion mit NTHi	48
3.5	Bedeutung von MAP-Kinasen für die intrazelluläre Signaltransduktion nach Infektion mit NTHi	50
4	Diskussion	54
4.1	Pulmonale Zielzellen der frühen Phase respiratorischer Infektionen mit NTHi	54
4.2	Veränderungen der Zytokinexpression im humanen Lungengewebe nach Infektion mit NTHi	55
4.3	Modulation der Entzündungsreaktion auf NTHi durch atypische Pathogene	57
4.4	Bedeutung von Toll like-Rezeptoren und MAP-Kinasen für Erregererkennung, Signaltransduktion und Inflammation – Ein Pathomechanismus für die Koinfektion	63

5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	70
7	Danksagung	82
8	Lebenslauf	83
9	Publikationsliste	84

Abkürzungsverzeichnis

AEZ	Alveolarepithelzellen
AM	Alveolarmakrophagen
BAMBI	BMP and Activin Membrane bound Inhibitor
cfu	Colony forming Unit
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
Cpn	Chlamydia pneumoniae
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität
Hib	Haemophilus influenzae Typ b
HOPE	Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect
IFT	Immunfluoreszenztest
ifu	Inclusion forming Unit
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ISH	in situ-Hybridisierung
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
McF	McFarland
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDM	Monocyte-derived Macrophages
Med	Medium
MMP	Matrix-Metalloproteinase
n.sign.	nicht signifikant
NTHi	Nontypeable Haemophilus influenzae
OMP	Outer membrane protein
p. inh.	per inhalationem
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RT	Raumtemperatur
TGF- β	Transforming Growth-Factor β
TLR	Toll like-Rezeptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Die COPD – eine inflammatorische Erkrankung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (englisch: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, COPD) ist nach der „Nationalen Versorgungsleitlinie COPD“ definiert als eine „chronische Lungenkrankheit mit progredienter, nach Gabe von Bronchodilatoren und/oder Kortikosteroiden nicht vollständig reversibler Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer chronischen Bronchitis oder eines Lungenemphysems. Hauptsymptome sind chronischer Husten, Auswurf und Atemnot, anfangs nur unter Belastung.“ Nach der Nationalen Versorgungsleitlinie ist die COPD „weltweit die vierthäufigste Todesursache. Es wird erwartet, dass die Mortalität der COPD bis zum Jahr 2020 an die dritte Stelle der weltweiten Statistik für Todesursachen vorrücken wird.“ Wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist Rauchen. Mehr als 80% der COPD-Fälle in der westlichen Welt sind mit einer Tabakrauchexposition vergesellschaftet, während nur etwa 15-20% der Raucher eine COPD entwickeln [44]. Dies lässt vermuten, dass auch genetische Ursachen, z.B. ein α_1 -Antitrypsin-Mangel für die Entstehung der COPD eine Rolle spielen [29].

Ein wichtiger Marker für Diagnose, Einstufung des Schweregrades und Prognose ist die FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde), die zusammen mit der FVC (forcierte Vitalkapazität) zur Stadieneinteilung der COPD nach GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) verwendet wird (s. Tab.1).

Spirometrische Klassifikation der COPD anhand der FEV₁ nach Bronchodilatation	
Stadium	Parameter
I (mild)	FEV ₁ /FVC < 0,70 und FEV ₁ ≥ 80%
II (mäßig)	FEV ₁ /FVC < 0,70 und 50% ≤ FEV ₁ < 80%
III (schwer)	FEV ₁ /FVC < 0,70 und 30% ≤ FEV ₁ < 50%
IV (sehr schwer)	FEV ₁ /FVC < 0,70 und FEV ₁ < 30% oder FEV ₁ < 50% mit chronischer respiratorischer Insuffizienz (PaO ₂ <60mmHg (8,0kPa) ± PaCO ₂ >50mmHg (6,7 kPa))

Tab. 1) Einteilung der Stadien der COPD nach GOLD

Bei Patienten mit COPD kann es neben der langsam progredienten Atemwegsobstruktion zeitweise zu akuten Exazerbationen kommen, die mit rasch progredienter Dyspnoe und einer akuten Verschlechterung der Lungenfunktion sowie einer zunehmenden Lungenüberblähung einhergehen. Nach einer Exazerbation nimmt die Dyspnoe wieder ab und es kommt zu einem Rückgang der Lungenüberblähung mit Zunahme der Inspirationskapazität [29], wenngleich nicht immer der Ausgangszustand wieder erreicht wird. Eine Exazerbation kann durch verschiedene Faktoren begünstigt werden, dazu gehören Umweltfaktoren (Luftverschmutzung, Staub, Temperatur) und Infektionen (bakteriell oder viral).

Pathophysiologisch ist die COPD eine chronisch entzündliche Erkrankung, die hauptsächlich durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und anderer Mediatoren charakterisiert ist. Die Atemwege von COPD-Patienten sind in den meisten Fällen mit respiratorischen Pathogenen wie *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Branhamella catarrhalis* besiedelt, was wiederum zu chronischer Inflammation und Epitheldysfunktion führt. Die erhöhte Empfänglichkeit von COPD-Patienten für respiratorische Infekte ist neben einer defekten Epithelbarriere auch durch die eingeschränkte Funktion von Mechanismen der angeborenen Immunität bedingt.

Zielzellen der Infektion mit respiratorischen Pathogenen sind in erster Linie Alveolarmakrophagen (AM) und Alveolarepithelzellen (AEZ). Verantwortlich für die frühe Immunreaktion sind sogenannte *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRR), membrangebundene oder intrazelluläre Signalrezeptoren, die Bestandteile von Pathogenen (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) erkennen. Zu den PRR gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like Rezeptoren (NLR), RIG-like Rezeptoren (RLR) und zytosolische DNA-Rezeptoren [70]. TLR erkennen Zellwandbestandteile wie bakterielle Lipoproteine (TLR2) oder LPS (TLR4), ebenso wie zytosolische NLR, die auch Zellwandbestandteile erkennen, während RLR und zytosolische DNA-Rezeptoren virale RNA oder bakterielle DNA erkennen. Die Signaltransduktion der Rezeptoren führt über die Aktivierung intrazellulärer Adaptermoleküle zur Aktivierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA führt zur Transkription von Genen für Chemokine, Adhäsionsmoleküle, proinflammatorische Zytokine und Zytokinrezeptoren.

Die proinflammatorischen Zytokine wie IL-8 und TNF- α werden dabei zuerst gebildet und führen durch ihre unterschiedlichen Effekte zu verschiedenen Teilreaktionen der akuten Entzündungsantwort.

Interleukin-8 (IL-8) ist der Hauptmediator von Neutrophilen-Chemotaxis [86] und wird von Alveolarmakrophagen, Monozyten, Gewebemakrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten ebenso wie von Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Epithelzellen sezerniert [20]. *Macrophage chemoattractant protein 1* (MCP-1) hat chemotaktische und kostimulatorische Effekte auf Monozyten, CD4⁺-T-Zellen, NK-Zellen und Eosinophile [50;57]. Interleukin-6 (IL-6) wird von Makrophagen und Atemwegsepithelzellen gebildet und hat pleiotrope proinflammatorische und immunmodulierende Effekte. Als Mediator ist IL-6 in die Synthese von Akute Phase-Proteinen und Immunglobulinen involviert [17]. Es ist essentiell für die Induktion der Akute Phase-Antwort und die Verstärkung der Antikörper-Produktion und wird daher in der frühen Phase der Entzündungsantwort freigesetzt [49].

Die *in vivo*-Situation ist geprägt von einem komplexen Zusammenspiel in einem Zytokin-Netzwerk, bei dem Alveolarmakrophagen und Leukozyten durch parakrine Stimuli wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) unter anderem benachbarte Epithelzellen zur IL-8-Produktion stimulieren. In A549-Zellen, einer immortalisierten epithelialen Zelllinie [73], konnte aber auch als direkte Reaktion auf bakterielle Stimulation eine IL-8-Produktion gezeigt werden, was bedeutet, dass Epithelzellen nicht nur eine Barrierefunktion gegenüber Bakterien und anderen Noxen haben, sondern auch in der Lage sind, eigenständig die inflammatorische Antwort auf eine Infektion durch Generierung von Zytokinen und Chemokinen zu modulieren.

Während sich die Produktion inflammatorischer Zytokine eher im Rahmen der akuten Inflammation abspielt und die Elimination des Pathogens zum Ziel hat, kommt es bei chronischen Entzündungsreaktionen, z.B. durch persistierende Infektionen mit respiratorischen Pathogenen, zur Expression von Reparatur- und Wachstumsfaktoren und damit zu Umbauprozessen im Gewebe, die durch den Abbau von extrazellulärer Matrix oder Zerstörung der Alveolarwände dauerhaft zu einer veränderten Parenchymstruktur mit Entwicklung von Fibrose und Emphysem führen können. Wesentlicher Mediator ist hier der *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) [36].

TGF- β wird von stimulierten Epithel- und Entzündungszellen freigesetzt und führt nach Bindung an Transmembran-Rezeptoren (TGF- β -Rezeptor, TGF- β -RI und -RII) über eine intrazelluläre Signalkaskade von *Smad*-Proteinen zur Transkription spezifischer Zielgene, z.B. für Kollagen oder TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Metalloprotease-1*) und induziert durch Veränderungen der extrazellulären Matrix mit vermehrter Kollagenbildung und vermindertem Abbau der extrazellulären Matrix ein Ungleichgewicht im Lungenparenchym und somit langfristig einen fibrotischen Lungengerüstumbau [15;31].

1.2 Die Bedeutung von Infektionen bei COPD

In der Ätiologie einer akuten Infektexazerbation einer COPD werden drei Arten von Erregern unterschieden: Viren, atypische Bakterien und aerobe bzw. fakultativ anaerobe Bakterien. Viren sind für etwa 30% der Exazerbationen (mit-)verantwortlich, atypische Pathogene, insbesondere Mykoplasmen und Chlamydien, spielen in etwa 5-10% der Fälle eine Rolle und pyogene Bakterien verursachen etwa 40-50% der akuten Exazerbationen bei COPD. Bei immerhin 10-20% der Patienten treten Infektionen mit mehr als einem Erreger auf [77]. Die häufigsten Erreger bei Exazerbationen einer COPD sind *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae*. Weniger häufig werden *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Haemophilus parainfluenzae* nachgewiesen [87]. Obwohl Infektionen ein wesentlicher Trigger für die Exazerbation einer COPD sind, ist die kausale Bedeutung von Bakterien bei Exazerbationen noch nicht gesichert. Bei schwerer COPD und emphysematisch vorgeschädigter Lunge kolonisieren Bakterien häufig die Atemwege der Patienten, sodass der reine Nachweis von Bakterien im Sputum während einer Exazerbation nicht den akuten Abfall der Lungenfunktion erklärt. Dennoch kann ein Anstieg der Bakterienlast, ein Standortwechsel von Bakterien oder der Erwerb neuer, virulenterer oder proinflammatorisch aktiverer Bakterien oder Bakterienstämme zu einer Infektexazerbation führen [19;29].

Nontypeable *Haemophilus influenzae*

Nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) ist – anders als der bekapselte *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib) – ein unbekapselter, gram-negativer fakultativ anaerober Erreger, der als Wachstumsfaktoren Eisen und Haemin aus dem Blut benötigt. NTHi als meistisoliertes respiratorisches Pathogen besiedelt den unteren Respirationstrakt bei etwa 25-50% der COPD-Patienten im symptomfreien Intervall [8] und ist auch mit persistierenden Infektionen sowie deren Exazerbationen assoziiert [8;62;80;86]. Dabei zeigen die Stämme, die während einer Exazerbation isoliert werden, eine vermehrte Virulenz und eine stärkere Induktion der Atemwegsinflammation als persistierende Stämme.

Darüber hinaus ist NTHi Ursache von Otitiden bei Kindern, Sinusitiden bei Kindern und Erwachsenen, Pneumonien bei Erwachsenen und Infekten der unteren Atemwege bei COPD-Patienten und Patienten mit Zystischer Fibrose [61].

Akute Infektionen mit NTHi sind durch eine Ansammlung von Neutrophilen und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine charakterisiert [21]. Da das Epithel des Respirationstraktes überall mit Mukus bedeckt ist, einer Mischung aus sezernierten Molekülen, Zellen, Debris und Muzinen, treffen die Bakterien zunächst auf diese Schicht und adhären über eine Muzin-Bakterien-Interaktion durch Proteine der äußeren Bakterienmembran (*Outer Membrane Proteins*, OMP P2, P5, P6) an das Epithel. NTHi wurde lange Zeit für ein extrazelluläres Pathogen gehalten, das das Lumen der Atemwege bei COPD-Patienten befällt, spezifisch Muzin bindet und an die Epithelzellen adhärert [80;88]. NTHi aber adhärert nicht nur an die Epithelzellen, sondern dringt selbst auch in Zellen ein, persistiert dort und verursacht so eine anhaltende Epithelschädigung und eine prolongierte lokale Entzündungsreaktion [16]. Der von Ketterer et al. beschriebene Mechanismus der Invasion in Epithelzellen ist die Makropinozytose. Nach der Infektion einer Zelle mit NTHi kommt es zur Ausbildung von Lamellipodien und Mikrovilli, die sich um den Erreger legen. Der Erreger wird dann internalisiert und überlebt in einer Vakuole im Zytoplasma [47]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NTHi die Fähigkeit hat, die Phagozytose durch Makrophagen zu überleben und in den Makrophagen weiter vital zu bleiben [32]. In diesem Fall spielt eine Interaktion zwischen dem Membranprotein OMP P6 von NTHi und den Zelloberflächenrezeptoren der Makrophagen eine Rolle, die zu einer inflammatorischen Reaktion führt. Insbesondere für eine Aktivierung von TNF- α und die Produktion von IL-8 hat sich ein wesentlicher Effekt von OMP P6 auf Makrophagen zeigen lassen, während andere Zellwandkomponenten wie das Porin OMP P2 und Lipooligosaccharid (LOS) die Zytokinproduktion allenfalls geringfügig stimulieren konnten [11]. Die Stimulation der Zytokin-Synthese und -Freisetzung durch NTHi via LOS, das spezifische Endotoxin von NTHi, wird über den Membran-gebundenen Rezeptor CD14 vermittelt [48], während OMP P6 als Lipoprotein Toll like-Rezeptoren aktiviert [11]. Indem NTHi die Epithelschicht durchdringt, ist er vor der bakteriziden Aktivität von zellwandaktiven Antibiotika und der humoralen Abwehr geschützt und kann so ein Reservoir für weitere Infektionen bilden.

Als extrazellulärer Erreger kann NTHi im Respirationstrakt Biofilme aus einer selbstproduzierten Polymermatrix bilden, in denen er ebenfalls dem Zugriff des Immunsystems entzogen ist. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum einige NTHi-Stämme bei COPD-Patienten über einen langen Zeitraum persistieren, während andere Stämme nur transient vorhanden sind [61;63]. Wesentliche Virulenzfaktoren von NTHi sind seine beiden Toxine LOS, als Ligand für TLR4, und Lipopeptide als Liganden für TLR2 [85;96].

LOS sorgt in den großen Atemwegen durch die Inflammation für eine verstärkte Mukusproduktion bei gleichzeitig herabgesetzter mukoziliärer Clearance, in den kleineren Atemwegen kommt es zu Bronchiolitis und progressiver Atemwegsobstruktion [80]. Unterschieden werden muss zwischen intrazellulärer Persistenz und Kolonisation der Atemwege durch NTHi. Die Kolonisation mit NTHi ist ein dynamischer Prozess, bei dem nicht ein Stamm die ganze Zeit persistiert, sondern verschiedene Stämme nacheinander die Lunge besiedeln. Im Falle einer COPD kolonisieren häufig mehrere Stämme gleichzeitig den Respirationstrakt. Wie von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, führt eine Besiedelung mit NTHi zu einer erhöhten Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α [21;49;81], was durch Aktivierung und Migration von Neutrophilen zum Entzündungsort eine wesentliche pathogenetische Rolle bei der akuten Exazerbation einer COPD spielt. Persistierende Stämme induzieren *in vitro* weniger IL-6 und IL-8 als nicht-persistierende Stämme, unabhängig davon, ob die einzelnen Stämme an ihre Zielzellen adhären oder nicht, wenngleich die unterschiedlichen Stämme in ihrer Wirkung eine Zeit- und Dosisabhängigkeit zeigen [17]. Während die Infektion mit einem neuen NTHi-Stamm der Auslöser für eine Exazerbation mit einer akuten inflammatorischen Reaktion sein kann [79], scheint die persistierende Infektion mit NTHi durch Regulation von Reparatur- und Wachstumsfaktoren, wie z.B. der Expression von TGF- β , einen langfristigen Einfluss auf Reparatur- und Umbauprozesse im Lungengewebe zu haben. Dies ist insofern relevant, als Drömann et al. im Lungengewebe von 38% der COPD-Patienten eine persistierende Infektion mit NTHi nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu fand sich im Kontrollkollektiv von Patienten ohne chronische Atemwegserkrankungen kein Nachweis einer NTHi-Infektion [27].

Chlamydia pneumoniae

Chlamydia pneumoniae (Cpn) gehört zur Familie der Chlamydiaceae. Chlamydiaceae sind 0,3-1 μ m große, atypische, gram-negative Bakterien. Da Chlamydien keine ATP-Synthese und somit einen Defekt im Energiestoffwechsel aufweisen, den sie durch Leistungen ihrer Wirtszellen ausgleichen müssen, handelt es sich bei ihnen um obligat intrazelluläre Bakterien [54;97].

Allen Chlamydien-Spezies ist ein genusspezifisches Antigen gemeinsam und ihre Vermehrung entspricht einem Entwicklungszyklus mit zwei Formen. Die Elementarkörperchen sichern das Überleben außerhalb der Zelle und dienen der Infektion neuer Wirtszellen [53]. Intrazellulär wandeln sie sich in Retikularkörperchen um, die für die

Replikation verantwortlich sind und sich durch Querteilung innerhalb der Wirtszelle vermehren. Nach Umwandlung in die infektiöse Form werden die neuen Elementarkörperchen aus der Wirtszelle freigesetzt, um weitere Zellen zu infizieren [10;30;43;54;97]. Der Entwicklungszyklus dauert etwa 48-72h [52]. Ein wesentliches Merkmal der Chlamydien ist ihre Fähigkeit zur Persistenz in ihrer Wirtszelle, bei der die Chlamydien keine definierten Symptome verursachen. Während der Persistenz sind die Chlamydien dem Zugriff des Immunsystems entzogen und auch für Antibiotika nicht zu erreichen [38].

Cpn ist ein ausschließlich humanpathogener Erreger, der aerogen übertragen wird. Mit einer Inkubationszeit von mehreren Wochen befällt er in erster Linie Epithelzellen des humanen Respirationstraktes [54] und verursacht Krankheiten wie Pneumonien, Bronchitiden, Pharyngitiden und Sinusitiden [41]. 5-10% der ambulant erworbenen Pneumonien (*community acquired pneumonia*, CAP) und 5% der Pharyngitiden, Bronchitiden und Sinusitiden werden durch Cpn verursacht [18]. Cpn kann für akute Exazerbationen der COPD verantwortlich sein [54], wird aber bei Patienten mit COPD insbesondere im Rahmen persistierender Infektionen gefunden [71;100].

Infektionen mit Cpn sind weltweit verbreitet und fast jeder wird in seinem Leben infiziert und möglicherweise auch reinfiziert. Schon in der frühen Jugend ist die Hälfte der Weltbevölkerung seropositiv für Cpn, was es erschwert, die Bedeutung von Cpn bei der COPD und deren Exazerbationen richtig einzuschätzen. Cpn-Infektionen kommen in allen Altersgruppen vor. Bis zu 60% der Erwachsenen weisen Antikörper gegen Cpn auf, wobei die Seropositivität für Cpn mit zunehmendem Alter und bei positiver Nikotinanamnese ansteigt [41;54]. Die Seroprävalenz von Cpn bei COPD-Patienten ist nach von Hertzen et al. erheblich höher [94]. Die Autoren fanden nach serologischen Kriterien eine Inzidenz von 71% chronischer Cpn-Infektionen bei Patienten mit schwerer COPD, 46% bei Patienten mit milder bis moderater COPD und 0% in der Kontrollgruppe. Drömann et al. konnten durch direkten Nachweis von Cpn im humanen Lungengewebe zeigen, dass etwa 15% der Patienten mit COPD chronisch mit Cpn infiziert sind, im Gegensatz zu 0% der Kontrollpersonen [26]. In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe berichten Rupp et al. ebenfalls, dass Cpn in 13% der mittels *in situ*-Hybridisierung untersuchten Lungenpräparate von COPD-Patienten nachgewiesen werden konnte [71].

Im humanen Respirationstrakt sind neben Infektionen mit einzelnen respiratorischen Pathogenen auch Koinfektionen beschrieben worden, überwiegend im Sinne viraler Infektionen im Zusammenhang mit bakteriellen Superinfektionen, z.B. bei Rhinoviren [78].

Auch für Cpn ist ein erhöhtes Auftreten bei Koinfektionen beschrieben [80], sodass sich durch eine chronische Kolonisation der Lunge mit Cpn möglicherweise ein erhöhtes Risiko für Infektexazerbationen der COPD durch eine Koinfektion mit einem zweiten respiratorischen Pathogen ergibt [13].

Veränderungen der Zytokinexpression nach Infektion mit Cpn und NTHi

Nach unserer Hypothese verändert die Infektion mit einem respiratorischen Pathogen, z.B. Cpn, die Proteinexpression und somit möglicherweise auch die Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren der Zielzelle und ermöglicht dadurch einem zweiten Erreger, z.B. NTHi, die Adhäsion an die geschädigte Zelle [99].

Patienten mit chronischer Atemwegsobstruktion zeigen eine lokale Erhöhung der TNF- α -Konzentration im Sputum bzw. eine lokal erhöhte Anzahl an Zellen, die TNF- α exprimieren [16]. Die überschießende TNF- α -Produktion bedingt eine verstärkte Inflammation in den Atemwegen, ein Zustand, bei dem Erreger wie NTHi leichter die Atemwege dieser Patienten besiedeln können – wie bei der Exazerbation einer COPD [98]. Zunächst bindet NTHi an Rezeptoren der Zielzelle, z.B. Toll like-Rezeptoren. Dies führt zu einer Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden, hauptsächlich des NIK-IKK-I κ B α -NF- κ B- und des MKK-p38MAPK-Signalweges [56]. Die Konsequenz der Aktivierung dieser Signalwege ist die Regulation von Genen, die wichtige inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-8 kodieren. Wie von Krüll et al. beschrieben, führt auch die Infektion mit dem obligat intrazellulären Pathogen Cpn zu einer Verstärkung der IL-6- und IL-8-Produktion in Epithelzellen. Die IL-8-Produktion durch eine Infektion mit Cpn ist – zumindest in Endothelzellen – ebenfalls abhängig von der Aktivierung der Signalwege über *mitogen-activated protein kinase* MAPK p38 und *extracellular signal-regulated kinases* ERK1/2 [52]. Somit aktivieren beide Erreger dieselben Signalkaskaden, wodurch es bei einer Koinfektion mit beiden Pathogenen zu einer Verstärkung der Inflammation kommen könnte.

Epithelzellen als Ort der ersten Abwehr produzieren nach Stimulation mit NTHi vermehrt IL-8 [34] und auch Alveolarmakrophagen reagieren auf eine Infektion mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-8 [69].

Um die Effekte der verschiedenen Zellkulturen auf humanes Lungengewebe zu übertragen, entwickelten Drömann, Goldmann und Rupp das humane Lungengewebsmodell zunächst für die Untersuchung der verschiedenen Zellarten bei der akuten Infektion mit Cpn [26;71],

später wurde das Modell aber auch auf andere respiratorische Pathogene wie NTHi übertragen. Die inflammatorische Reaktion als Antwort auf eine Cpn-Infektion betrifft vorwiegend die Alveolarmakrophagen (AM) und nur in geringerer Ausprägung die Alveolarepithelzellen (AEZ), wie im Modell der akuten Cpn-Infektion von Rupp et al. beschrieben [71]. Im Gegensatz dazu ist die Rate der mit Cpn-infizierten Alveolarepithelzellen Typ II bei der persistierenden Infektion signifikant höher. Für die Infektion mit NTHi zeigten sich in der akuten *in vitro*-Infektion ebenfalls deutlich höhere Infektionsraten in Alveolarmakrophagen (70-85%) verglichen mit Alveolarepithelzellen (15-25%), während bei der persistierenden *in vivo*-Infektion beide Zellpopulationen gleichermaßen infiziert waren (AM 40-50%, AEZ 35-45%).

Anhand dieses humanen Lungengewebmodells kann gezeigt werden, welche Zellen für die akute oder chronische Infektion mit NTHi eine Bedeutung als Wirtszellen haben. Außerdem können so die Einflüsse auf das pulmonale Milieu kontrolliert und verändert werden und es kann untersucht werden, wie die Interaktion zwischen Wirt (humanes pulmonales Milieu) und Pathogen unter veränderten Bedingungen abläuft.

1.3 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellungen

Das Ziel unserer Versuche war, den Ablauf der Entzündungsreaktion bei Infektionen des humanen Lungengewebes mit Cpn und NTHi *in vitro* zu charakterisieren.

Es ergaben sich dazu folgende Fragestellungen:

- 1.) Welche Zielzellen sind entscheidend in der frühen Phase der respiratorischen NTHi-Infektion?
- 2.) Wie verändert sich die Zytokinexpression in der humanen Lunge nach NTHi-Infektion? Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren?
- 3.) Wird die Entzündungsreaktion auf eine Infektion mit NTHi durch eine Vorstimulation mit atypischen Pathogenen moduliert?
- 4.) Welche Bedeutung haben Toll like-Rezeptoren (TLR) für Erregererkennung und Entzündungsreaktion nach NTHi-Infektion?
- 5.) Welche Bedeutung haben MAP-Kinasen für die intrazelluläre Signalübertragung nach NTHi-Infektion?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmodell

Zellkultur von A549-Zellen

Als Alveolarepithelzelllinie wählten wir für unser Infektionsmodell A549-Zellen. Dabei handelt es sich um immortalisierte Zellen eines nicht-kleinzelligen Adenokarzinoms von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Die A549-Zelllinie weist charakteristische Merkmale der Pneumozyten Typ II auf [33], inklusive Lamellarkörperchen und Surfactant-Produktion. In entsprechenden Färbungen zeigen sie sich positiv für alkalische Phosphatase und mRNA-Transkripte für Surfactant Protein-c (SP-C) sowie Aquaporin (AQP) 3. Im Gegensatz zu den Pneumozyten Typ I sind sie negativ für AQP 5 [6].

Die Zellkultur der A549-Zellen erfolgt in Zellkulturflaschen (Cellstar® Tissue Culture Flasks, 175cm², 550ml, Firma Greiner bio-one), die alle 3-4 Tage passagiert werden. Dabei wird ein Teil der Zellen für Stimulationsversuche in Zellkulturplatten (Firma Greiner bio-one) gebracht, ein anderer Teil wird zur Fortführung der Zellkultur wieder in Zellkulturflaschen gegeben. Beim Passagieren der Zellen wird zunächst die Zelldichte in den Zellkulturflaschen unter dem Plattenmikroskop (Firma Carl Zeiss) beurteilt. Unter sterilen Arbeitsbedingungen (Sterile Werkbank, Firma Biohit ANTARES) wird dann das Medium aus den Zellkulturflaschen verworfen und die Zellen werden mit PBS-Puffer (Firma PAA) gewaschen. Die Zellen werden in 10ml Trypsin (Trypsin-EDTA (1x), Firma PAA) für 5min bei 37°C im Brutschrank (Cell House²⁰⁰, Firma Heraeus Instruments) inkubiert, sodass sich die adhärennten Zellen vom Flaschenboden und aus dem Zellverband lösen und man eine Suspension mit frei schwimmenden Einzelzellen erhält. Die Zellsuspension wird in 50ml-Röhrchen (Firma Sarstedt) gefüllt und 1min bei 4000rpm (*rounds per minute*) zentrifugiert (Zentrifuge „Rotina 35R“, Firma Hettich), um das Trypsin von den Zellen zu trennen. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in Anzuchtmedium (500ml RPMI 1640 (without L-Glutamine, Firma PAA), 50ml FCS (*Fetal Calf Serum*, Biochrome AG), 5ml NEAA (Amino Acids (100x) Non Essential, Solution for MEM, PAA), 5ml L-Glutamin (L-Glutamine 200mM (100x), PAA), 4ml Amphotericin B (Amphotericin B (250µg/ml), PAA), 0,5ml Gentamicin (Gentamicin Solution 10mg/ml, Sigma-Aldrich)) resuspendiert und erneut für 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in 10ml Medium gelöst und aus der Zellsuspension wird mit einer Neubauer-Zählkammer (Firma Assistent) die Zellzahl bestimmt, um die Zellen für Stimulation gleichmäßig auf Zellkulturplatten verteilen zu

können. Mindestens $5 \cdot 10^6$ Zellen werden in eine neue Zellkulturflasche gegeben, um die Zellkultur weiterzuführen. Für die Verteilung der Zellen auf Zellkulturplatten wird die benötigte Zellzahl eingestellt und bei 6-Lochplatten mit je 2ml Medium, bei 12-Lochplatten mit je 0,6ml Medium in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend werden die Zellkulturflaschen und -platten bis zur nächsten Passage bzw. bis zur Stimulation bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach etwa 24h sind die Zellen in den Zellkulturplatten adhärent und können infiziert werden. Dazu wird das Anzuchtmedium verworfen. Erreger und Kontrollen werden in Antibiotika-freiem Infektionsmedium (500ml RPMI 1640 (without L-Glutamine, Firma PAA), 25ml FCS (Biochrome AG), 5ml NEAA (Amino Acids (100x) Non Essential, Solution for MEM, PAA), 5ml L-Glutamin (L-Glutamine 200mM (100x), PAA), 4ml Amphotericin B (Amphotericin B (250µg/ml), PAA)) angesetzt und auf die Zellen gegeben.

Zellkultur von Monocyte-derived Macrophages (MDM)

Airenne et al. haben für *Monocyte-derived Macrophages* (MDM) gezeigt, dass diese von Cpn infiziert werden können [2;37], sodass wir für unser Infektionsmodell anstelle primärer Alveolarmakrophagen, die *in vitro* nicht ausreichend lange kultivierbar sind, MDM auswählten. Die MDM werden aus Monozyten generiert, die mit Hilfe der Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF zu dendritischen Zellen differenzieren.

Die Isolation von Monozyten aus *Buffy Coats* wird unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Das konzentrierte Blut aus dem *Buffy Coat* wird mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:5 in einem sterilen Becherglas verdünnt. Dann werden in zehn 50ml-Röhrchen je 10ml Ficoll (LSM 1077 *Lymphocyte Separation Medium*, Firma PAA) vorgelegt, die im Verhältnis 1:4 mit dem verdünnten Blut überschichtet werden. Der Gradient wird für 20min mit 1600rpm bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wird der obere weiße Ring, der die mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) enthält, mit einer sterilen Plastikpasteurpipette abgenommen und die Zellen werden in 50ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wird mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt, um die Zellen zu waschen. Die Röhrchen werden dazu 5min mit 1600rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, während das Zellpellet der PBMC in Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (Cellstar® Tissue Culture Flasks, 175cm², 550ml, Firma Greiner bio-one) gegeben wird. Jede Flasche wird mit insgesamt 60ml Medium gefüllt, um den Monozyten genügend Platz zum Sedimentieren zu geben. Die Zellkulturflaschen werden dazu für 3h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird das

Medium mit den nicht-adhärenenten Zellen aus der Zellkulturflasche verworfen. Dann werden die Zellkulturflaschen drei Mal mit 37°C warmem Medium gewaschen und das Medium jeweils verworfen, um verbleibende nicht-adhärenente Zellen von den Monozyten zu trennen.

Die adhärenenten Zellen werden mit einem Zellschaber (Firma Sarstedt) vom Flaschenboden gelöst und in 10ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird für 5min mit 1000rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in einer definierten Menge MDM-Anzuchtmedium (500ml BioWhittaker™ RPMI 1640 (without L-Glutamine and Phenol Red, Firma Cambrex), 50ml FCS (Biochrome AG), 5ml L-Glutamin (GIBCO)) resuspendiert. Mit einer Neubauer-Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter errechnet sich nach der Formel

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ml.}$$

Als nächstes wird mit Trypanblau (Trypanblue 0,4%, Firma INC Biomedicals) ein Vitalitätstest durchgeführt. Dazu werden jeweils 10µl Zellsuspension und Trypanblau auf einem Objektträger (Firma Menzel GmbH) vermischt und mit einem Deckgläschen (Firma Roth) bedeckt. Trypanblau bildet ein Farbstoff-Anion, das sich an zytosolische Proteine bindet. Dieses Phänomen zeigt sich nur bei avitalen Zellen mit einer durchlässigen Zellmembran, die sich daraufhin blau anfärben. Auf diese Weise wird der prozentuale Anteil vitaler Zellen bestimmt.

Zur weiteren Differenzierung der Zellen wird ein Zytopspin-Präparat angefertigt. Dazu werden 50-100µl der Zellsuspension in einer Zytozentrifuge (Firma Shandon) 5min bei 700rpm auf Objektträger zentrifugiert. Die Präparate werden nach Pappenheim gefärbt und jeweils 100 ausgezählte Zellen nach ihrer Morphologie differenziert.

Die isolierten Monozyten werden entsprechend der benötigten Zellzahl verteilt. Bei Kultur im FACS-Zellkultur-Röhrchen (Firma BD Biosciences) werden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingesetzt, in 1,5ml-Reaktionsgefäße (Firma Sarstedt) werden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml gegeben. Um die Monozyten zur Differenzierung anzuregen, werden dem Medium bei der Erststimulation je 5ng/ml IL-4 und GM-CSF zugegeben [91]. Nach zwei Tagen erfolgt die Nachstimulation mit je 15ng/ml IL-4 und GM-CSF. Nach vier Tagen sind die Monozyten zu MDMs differenziert und können mit Erregern stimuliert werden. Wie bei Tang et al. beschrieben, exprimieren die MDM nach Stimulation mit rhGM-CSF und rhIL-4 CD1a und CD86 auf der Oberfläche, was vor der Stimulation mit Erregern mehrfach durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte.

Zur Kontrolle der Zellvitalität im Verlauf der Zellkultur wird eine Life-Death-Färbung durchgeführt. Dazu werden die Zellen in 200µl PBS aufgenommen und mit je 1µl Syto 16

und Ethidium Homodimer-2 (beides Firma Molecular Devices) gefärbt. Dann werden die Zellen eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer lichtgeschützt inkubiert und anschließend nach Zugabe von 2ml PBS für 10min bei 2200rpm zentrifugiert. Die zentrifugierten Zellen werden in PBS aufgenommen und mit der Zytospin-Zentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Die fertigen Präparate werden mit 1%-igem Paraformaldehyd 10min bei RT im Dunkeln fixiert. Die Auswertung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25, Firma Carl Zeiss). Während der grün fluoreszierende Farbstoff Syto 16 intakte Zellmembranen permeieren kann und sich dort an die DNA anlagert, ist dies für Ethidium Homodimer-2 mit roter Fluoreszenz nur bei apoptotischen Zellen mit durchlässiger Zellmembran möglich, daher färben sich vitale Zellen grün an, apoptotische Zellen rot.

2.2 Anzucht und Vorbereitung der Erreger

Anzucht von Cpn

Cpn (Stamm ATCC CWL-029) wächst nicht allein in einem Nährmedium, sondern lässt sich nur intrazellulär anzüchten. Als Wirtszellen werden HEP-2-Zellen verwendet. HEP-2-Zellen werden wie A549-Zellen passagiert und in Zellkulturflaschen kultiviert. Für eine Infektion mit Cpn werden die HEP-2-Zellen auf 6-Lochplatten verteilt und 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Wenn sich am nächsten Tag ein adhärenter Monolayer in den Vertiefungen gebildet hat, werden die HEP-2-Zellen mit Cpn infiziert. Dazu werden die alten, Cpn-haltigen HEP-2-Zellen in einem 50ml-Röhrchen mit Glaskügelchen für 1,5min auf dem Vortex geschüttelt, sodass die Zellen durch die Glaskügelchen zerstört und Cpn freigesetzt werden. Die freigesetzten Cpn werden mit frischem Infektionsmedium bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und auf neue Zellkulturplatten mit HEP-2-Zellen gegeben. Die Platten werden anschließend für 45min bei 3500rpm und 35°C zentrifugiert. Vor einer weiteren Passage werden die Platten für 3-4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für die Aufreinigung von Cpn werden die HEP-2-Zellen in den Röhrchen mit Glaskügelchen ebenfalls auf dem Vortex geschüttelt, um die Zellen zu zerstören und Cpn freizusetzen. Anschließend wird die Suspension in neue Röhrchen überpipettiert und für 5min bei 900rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer und Cpn zu trennen. Der Überstand wird auf Radioselectan 30% geschichtet und erneut für 90min bei 11000rpm zentrifugiert, um die

restlichen Zelltrümmer von den Cpn zu trennen. Nach der Aufreinigung wird das Cpn-Pellet in 1ml SPG-Puffer (75g Sucrose (Firma Merck), 2,47g Na₂HPO₄ (dibasisch, anhydrid, Merck), 0,36g NaH₂PO₄ (monobasisch, Merck) und 0,72g L-Glutaminsäure (PAA) ad 11 Aqua dest., pH 7,3) aufgenommen und aliquotiert. Zur Aufbewahrung werden die Aliquots wie beschrieben [59] bei ca. -80°C gelagert.

Zur Titerbestimmung der aufgereinigten Cpn-Suspension wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu werden HEp-2-Zellen auf Deckgläschen mit verschiedenen Konzentrationen von Cpn infiziert, indem mit dem Infektionsmedium eine Verdünnungsreihe hergestellt wird, die Verdünnungen zwischen konzentriert und 10⁻¹-10⁻⁵ *inclusion forming units* pro Milliliter (ifu/ml) enthält. Nach 48h wird das Medium verworfen und die Zellen werden mit Methanol fixiert.

Der Immunfluoreszenz-Test (IFT) für Chlamydien (IMAGENTM Chlamydia, Firma DAKO Cytomation) ist ein direkter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Chlamydien in Zellkulturen und arbeitet mit einem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten gattungsspezifischen monoklonalen Antikörper, der gegen Chlamydien-Lipopolysaccharid gerichtet ist, das in allen Chlamydien-Stämmen vorliegt.

Die Deckgläschen werden mit der verdünnten IFT-Lösung (1:2 mit Evansblue) bei 37°C für 10-15min in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann werden sie mit PBS-Puffer gewaschen und getrocknet, wobei sie dunkel gelagert werden müssen. Anschließend werden die Deckgläschen auf Objektträger eingedeckt. Die fluoreszierenden Infektionseinheiten können nun unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt werden. Schließlich wird das Deckgläschen, das eine IFU-Dichte von ca. 10ifu/Gesichtsfeld aufweist, meanderförmig ausgezählt. Da man weiß, welcher Cpn-Verdünnung die dabei ermittelte Zahl an IFUs entspricht, kann man auf den Gehalt von 1µl der konzentrierten Cpn-Suspension zurückrechnen und erhält so den Titer der aufgereinigten Aliquots.

Für die Stimulationsversuche wird die Cpn-Suspension auf eine Konzentration von 0,5*10⁶ifu/ml eingestellt und entsprechend auf die Zellkulturplatten verteilt.

Da Chlamydien intrazelluläre Erreger sind, ist es üblich, Zellkulturen mit nicht-phagozytierenden Zellen nach der Infektion zu zentrifugieren, um die Erreger in die Zelle zu bringen. Dies ist z.B. bei Alveolarepithelzellen der Fall. In der Literatur sind allerdings auch Studien mit Alveolarepithelzellen beschrieben, die keine Zentrifugation für die Infektion der Zielzellen mit Cpn verwenden, um eine Stress-induzierte Zytokin-Freisetzung aus den Alveolarepithelzellen zu verhindern [102].

Im Vergleich der Infektionsraten von zentrifugierten und nicht-zentrifugierten Zellen finden sich im zeitlichen Verlauf ähnliche Werte (s. Tab. 2).

Zeitraum der Stimulation (n=3)	Infektionsraten in % (mit Zentrifugation)	Infektionsraten in % (ohne Zentrifugation)
24h	90%	90%
48h	95%	90%
72h	80%	80%

Tab. 2) Infektionsraten von Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml in A549-Zellen nach Infektion mit und ohne Zentrifugation

Wir verzichten fortan auf die Zentrifugation der Alveolarepithelzellen, um die Zellkulturbedingungen an die Bedingungen der Gewebekultur anzugleichen und eine Vorstimulation der Zellen zu vermeiden. Die Zytokinkonzentrationen zeigen ebenfalls keinen Unterschied in Abhängigkeit von den Infektionsraten (Daten nicht gezeigt), was uns erlaubt, die Versuche gemeinsam auszuwerten.

Anzucht von NTHi

NTHi (Isolat B5144 vom 20.06.2002 eines 60-jährigen COPD-Patienten mit invasiver Pneumonie, in der 16S rRNA-Sequenzierung Nachweis von Stamm Rd KW20) wird üblicherweise auf Kochblutagar (Syn.: Schokoladenagar) angezüchtet. Kochblutagar entsteht durch Erhitzen von Blutagar auf 80°C, wodurch aus den Erythrozyten die Wachstoffsstoffe X- und V-Faktor sowie Inhibitoren des V-Faktors freigesetzt werden. Dies ergibt ein Milieu, in dem NTHi gut wachsen kann. Die Beimpfung der Agarplatte erfolgt in Form eines Drei-Ösen-Ausstrichs, sodass nach 24h Bebrütung bei 37°C und 5% CO₂ Einzelkolonien für Stimulationsversuche von der Agarplatte abgenommen werden können. Ebenso erfolgt nach 24h eine Überimpfung des Bakteriums auf eine frische Kochblutagarplatte.

Die Einstellung der McFarland (McF)-Einheit von NTHi erfolgt mit 8ml NaCl-Lösung in einem Densitometer. Zunächst wird die Eigentrübung des NaCl-Röhrchens gemessen, um diese hinterher ggf. von der gemessenen Gesamt-Trübung abzuziehen. Dann werden einzelne Kolonien von NTHi mit einer Impföse von der Agarplatte abgenommen und in die NaCl-Lösung eingerührt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hat, die den Wert McF 0,5 hat. Die hergestellte Keimsuspension enthält 10^8 colony-forming units pro Milliliter (cfu/ml). Vor der Stimulation der Zellen wird die Suspension 1:10 oder 1:100 (entsprechend 10^7 cfu/ml oder 10^6 cfu/ml) mit dem Infektionsmedium verdünnt und in entsprechender Menge auf die Zellkulturplatten verteilt.

2.3 FACS, Western Blot, ELISA

Fluorescence-associated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie erfolgt zur Darstellung der veränderten Expression der Zelloberflächenantigene CD14, CD1a und CD86 während der Differenzierung der Monozyten durch die Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF wie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [3;89;91].

Die Zellen liegen für die Zellkultur mit $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml im FACS-Zellkultur-Röhrchen vor. Zur Markierung der Zellen mit FACS-Antikörpern werden die Röhrchen mit 1550rpm für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf jedes Pellet werden 95µl FACS-Puffer (1x PBS (Firma PAA) + 1% BSA (Roth) + 0,01% NaN_3 (Sigma)) und 5µl Antikörper (1µg/µl) gegeben, durchmischt und 20min bei +4°C inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen mit je 2ml FACS-Puffer aufgefüllt und mit 1500rpm für 5min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörper-markierten Zellen werden mit Paraformaldehyd (Firma Merck) fixiert und mindestens 20min bei +4°C gelagert. Vor der Messung werden die Zellen zunächst mit FACS-Puffer gewaschen, dann erneut in FACS-Puffer aufgenommen, gemischt und gemessen.

Das Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) differenziert die Zellen nach Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, *Forward Scatter*, FSC), Zellgranulierung und Zelldichte (Seitwärtsstreulicht, *Side Scatter*, SSC). Die Darstellung erfolgt als Punktwolke (*Dot Plot*, s. Abb. 1), in der Zellpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften getrennt werden.

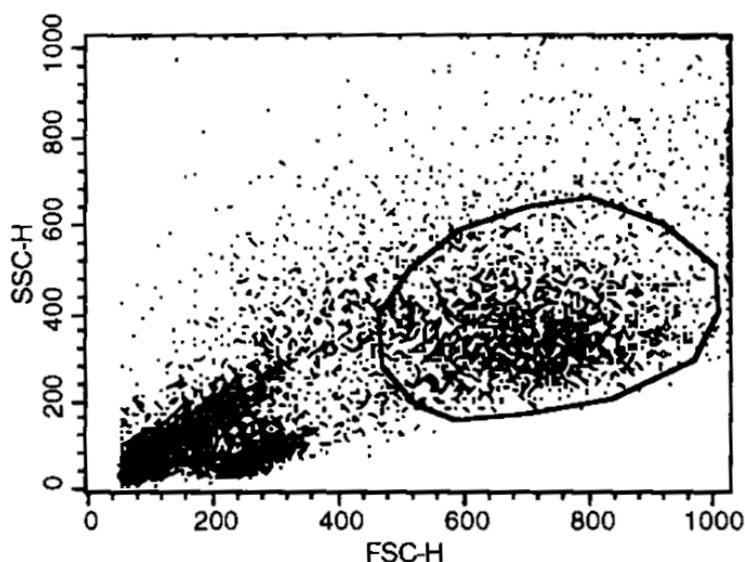


Abb. 1)
Repräsentativer *Dot Plot* nach vier Tagen Stimulation der MDM mit IL-4 und GM-CSF (Eingrenzung der Punktwolke der MDM anhand farblicher Darstellung)

Es können verschiedene Fluoreszenzbereiche gemessen werden. Die von uns verwendeten Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Emissionsmaximum 530nm) und Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum 575nm) sind an monoklonale Antikörper gekoppelt und können durch Bindung der Antikörper an die Zellen diese nach Oberflächenantigenen weiter differenzieren. Durch das Setzen von *Gates* ist es möglich, nur die relevante Zellpopulation weiter zu untersuchen. Die verwendeten Antikörper gegen CD14, CD1a, und CD86 zeigen die Differenzierung der Monozyten zu *Monocyte-derived Macrophages* (MDM). Wie bei Tang et al. beschrieben, sollen die MDM als Vorstufe ausdifferenzierter dendritischer Zellen bestimmte CD-Antigene auf der Oberfläche tragen [91]. Zunächst untersuchen wir deswegen CD14, einen Monozyten-Marker, dessen Expression während der Differenzierung abnimmt. Dann untersuchen wir CD1a, einen charakteristischen molekularen Marker dendritischer Zellen, die aus Monozyten abgeleitet sind. CD86 ist ein für die Funktion antigenpräsentierender Zellen wichtiger kostimulatorischer Faktor und vermittelt unter anderem Effekte von dendritischen Zellen auf die Proliferation von T-Lymphozyten. Der Phänotyp reifer Populationen von dendritischen Zellen ist durch den kompletten Verlust von CD14 sowie eine verstärkte Expression von CD1a und CD86 gekennzeichnet [91].

Die Proben werden nach Einstellung des jeweiligen Isotyps (Maus IgG2a, κ (PE) für anti-CD14-PE und Maus IgG1, κ (FITC) für anti-CD1a-FITC und anti-CD86-FITC, alle Firma BD Biosciences Pharmingen) gemessen. Die Zellpopulation der Monozyten wird durch Vorgabe eines CD14-*Gates* im *Dot Plot* dargestellt. Die Fluoreszenzintensitäten der Zellen werden als Histogramm gezeigt (s. Abb. 2a-c). Dabei wird die Stärke des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der fluoreszierenden Zellen aufgetragen und der Mittelwert der Fluoreszenzintensität von Antikörper und Isotypkontrolle bestimmt.

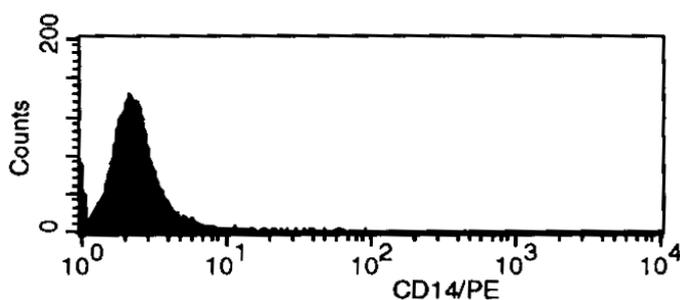


Abb. 2a)
Repräsentatives Histogramm der MDM für CD14 nach vier Tagen Stimulation

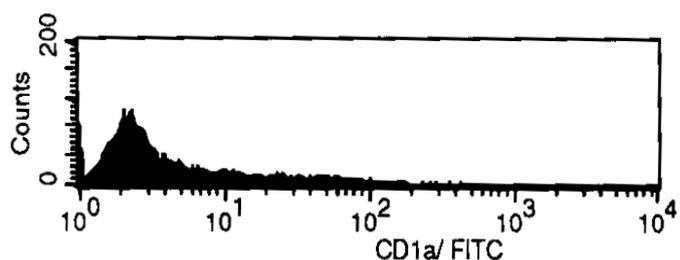


Abb. 2b)
Repräsentatives Histogramm der MDM für CD1a nach vier Tagen Stimulation

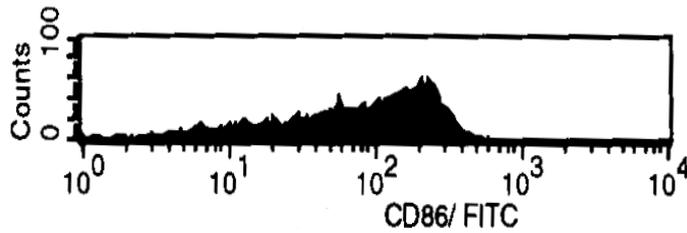


Abb. 2c)
Repräsentatives Histogramm der MDM für CD86 nach vier Tagen Stimulation

Der Verlauf der Wertrelation (Quotient von Mittelwert des Antikörpers und Mittelwert der Isotypkontrolle) zeigt die veränderte Antigenexpression auf der Zelloberfläche und die Differenzierung der Monozyten zu MDM.

Die durchflusszytometrischen Messungen und Auswertungen erfolgen in CellQuest®, Microsoft® Excel 2007 und SPSS Statistics 17.0.

In den Vorversuchen der MDM-Kultur werden der relative Mittelwert (rel. Mean) und der relative Median der Fluoreszenzintensität im Verlauf der Stimulation gemessen. Dabei ergeben sich für beide Parameter ähnliche Verläufe (s. Abb. 3). Für n=4 Versuche zeigt sich nach vier Tagen ein Verlust von CD14 (rel. Mean 1,09) und eine maximale Stimulation der Expression von CD1a (rel. Mean 50,19) und CD86 (rel. Mean 29,92).

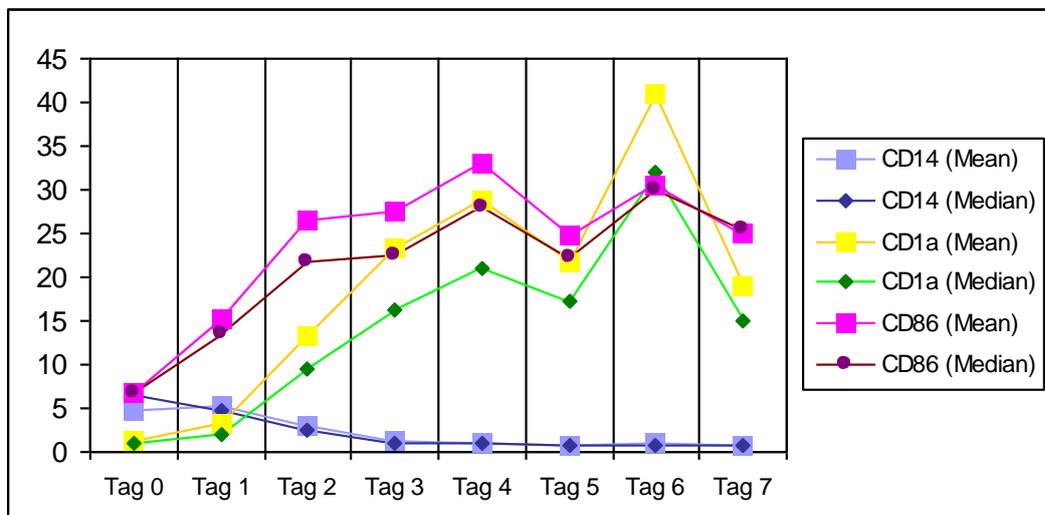


Abb. 3) Veränderung der Expression von Oberflächenantigenen bei Generierung von MDM aus humanen Monozyten durch Stimulation mit IL-4 und GM-CSF über einen Zeitraum von 7 Tagen (n=4)

Da die Zellkultur für die durchflusszytometrischen Messungen im FACS-Zellkultur-Röhrchen vorliegt, die weitere Stimulation mit Erregern allerdings im 1,5ml-Reaktionsgefäß erfolgen soll, wird in einem weiteren Versuchsansatz überprüft, ob die Monozyten sich bei sonst gleichen Bedingungen im 1,5ml-Reaktionsgefäß anders entwickeln als im FACS-Zellkultur-Röhrchen. Die statistische Auswertung zeigt dabei lediglich einen Unterschied in der CD1a-

Expression, die ihr Maximum schon nach drei Tagen erreicht (rel. Mean 10,77, n=4, Daten nicht gezeigt). Für die beiden anderen Parameter ergeben sich keine differenten Werte, sodass auch bei Stimulation im 1,5ml-Reaktionsgefäß eine Vorinkubation mit IL-4 und GM-CSF über einen Zeitraum von vier Tagen zur Zelldifferenzierung vor der Stimulation mit Cpn und NTHi beibehalten wird.

Western Blot

Für die Untersuchung zellulärer Proteine werden stimulierte Zellen als Proben gewonnen. Dazu wird das Medium aus den Zellkulturplatten verworfen und 0,5-1ml Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Dann werden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in autoklavierte 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend werden die Proben durchmischt und bei -20°C eingefroren.

Vor der Proteinanalyse werden die Proben aufgetaut und für 5min bei 95°C denaturiert (Thermostat 5320, Firma Eppendorf). Währenddessen werden nacheinander Trenngel 12% (4,08ml Aqua dest., 2,5ml 1,5M Tris-Base, 3ml Acrylamid-Bis (Firma BIO-RAD), 100µl 10% SDS, 5µl TEMED, 50µl 10% APS) und Sammelgel 5% (3,08ml Aqua dest., 1,25ml 0,5M Tris-Base, 625µl Acrylamid-Bis, 50µl 10% SDS, 5µl TEMED, 25µl 10% APS) vorbereitet. Nach Polymerisierung der Gele werden die Geltaschen mit Marker und Probe gefüllt.

Bei der Elektrophorese startet der Lauf im Sammelgel, um die Proteine auf eine Ebene zu bringen, bevor sie in das Trenngel wandern (Elektrophorese-Puffer (5-fach): 15g Tris (Firma BIO-RAD), 72g Glycin (Firma Sigma), 5g SDS, ad 1l, pH 8,3). Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Während des Blots (Power Pac 3000, Firma BIO-RAD) werden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Firma Whatman) übertragen (Blotpuffer: 3g Tris, 14,4g Glycin, 200ml Methanol, ad 1l). Nach Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen (Blockpuffer: 5g Milchpulver ad 100ml T-TBS) wird die Membran in T-TBS (T-TBS: 1ml Tween ad 1l TBS, TBS (10-fach): 24,2g Tris, 80g NaCl ad 1l Aqua dest., pH 7,6) gewaschen und mit dem Primärantikörper (alle Firma Cell Signaling) inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (alle Firma Cell Signaling) zugegeben wird. Dieser wird eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgt wieder ein Waschschrift. Zur Entwicklung des Blots wird die Membran in einer Röntgenkassette 5min mit Entwicklerlösung (Firma Pierce) bedeckt, bevor ein Röntgenfilm in die Kassette eingelegt wird. Dieser wird abhängig

vom Proteingehalt der Probe und vom eingesetzten Primärantikörper unterschiedlich lange belichtet. Nach der Entwicklung des Films kann man die Proteinbanden durch Vergleich mit dem Marker ihrem Molekulargewicht zuordnen.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den Nachweis sezernierter Proteine werden die zellfreien Überstände der Zell- oder Gewebekultur als Aliquots in 1,5ml-Reaktionsgefäßen steril verschlossen und bei -70°C eingefroren.

Gemessen werden IL-8, MCP-1, IL-6, TNF- α und TGF- β_1 , wobei die ELISAs jeweils nach Angabe des Herstellers durchgeführt werden. Verwendet werden monoklonale Antikörper aus ELISA-Kits der Firma R&D Systems (DuoSet® ELISA Development System, human CXCL8/ IL-8, human CCL2/ MCP-1, human IL-6, human TNF- α , human TGF- β_1 , R&D Systems) Die Primärantikörper liegen als *mouse-anti-human*-Antikörper vor, bei den Sekundärantikörpern handelt es sich um biotinylierte *goat-anti-human*-Antikörper, die durch an Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gebundenes Streptavidin in einer enzymgebundenen Farbreaktion dargestellt werden. Der Messbereich der Zytokinkonzentration liegt für IL-8 bei 31,3-2000pg/ml (Interassay-Variationskoeffizient (CV) 5,2%), für MCP-1 bei 15,6-1000pg/ml (CV 4,5%), für IL-6 bei 600pg/ml (CV 3,7%) und für TGF- β bei 31,3-2000pg/ml (CV 8,3%). Alle Proben werden in ELISA-Platten der Firma nunc™ doppelt pipettiert, um einen verlässlicheren Mittelwert zu erhalten.

2.4 Vitalität und Zytotoxizität

LDH-Zytotoxizitätstest

Der LDH-Zytotoxizitätstest (Cytotoxicity Detection Kit, Firma Roche) funktioniert nach dem Prinzip eines ELISA. Die Proben werden zusammen mit der Reaktionslösung bis zum Farbumschlag bei RT im Dunkeln inkubiert. Bei deutlicher Farbentwicklung wird die Reaktion durch HCl-Lösung gestoppt.

Die Absorption wird bei 490 oder 492nm mit einer Referenzwellenlänge von mehr als 600nm gemessen. Ausgewertet werden die Daten anhand der Standardkurve, wodurch ein Verlauf der Zytotoxizität unter Stimulation gezeigt werden kann.

Untersuchung der Vitalität der Alveolarepithelzellen (A549) während der Stimulation

Da für die unterschiedlichen Versuche verschiedene Konzentrationen an Fetalem Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS) im Medium benötigt werden, wird die Zellvitalität in Abhängigkeit von verschiedenen FCS-Konzentrationen mit der Life-Death-Färbung untersucht (Tab. 3a). Dazu werden die Zellen bis zu 96h auf Deckgläschen in 6-Lochplatten bei 37°C inkubiert. Wie in der unten stehenden Tabelle gezeigt, finden sich in der Zellkultur jeweils gleiche Vitalitätsraten unabhängig von der eingesetzten FCS-Konzentration.

Stimulationsdauer	10% FCS	5% FCS	1% FCS
24h	99%	99%	99%
48h	98%	99%	98%
72h	99%	98%	96%
96h	97%	99%	95%

Tab. 3a) Vitalität der Alveolarepithelzellen in Abhängigkeit von Stimulationsdauer und FCS-Konzentration im Medium (n=2), Life-Death-Färbung

Im nächsten Schritt werden die A549-Zellen mit verschiedenen Erregerkonzentrationen untersucht. Die optimale Cpn-Konzentration ist bereits im IFT ermittelt worden, sodass es nun darum geht, die Konzentration von NTHi zu ermitteln, bei der die Vitalität der Zellen auch nach einer Infektionsdauer von 72h möglichst wenig beeinträchtigt ist (Tab. 3b). Hierbei fällt auf, dass die Vitalität nach 72h bei Infektion mit hohen NTHi-Konzentrationen deutlich abfällt.

Cpn 0,5*10 ⁶ ifu/ml		+ NTHi 10 ⁷ cfu/ml		+ NTHi 10 ⁶ cfu/ml	
24h	99%				
48h	98%	24h	99%	24h	99%
72h	96%	48h	85%	48h	97%

Tab 3b) Vitalität der Alveolarepithelzellen (A549) in Abhängigkeit von der Erregerkonzentration nach verschiedenen Stimulationsintervallen (n=3), Life-Death-Färbung

Bestimmung der Zytotoxizität durch Stimulation mit Cpn und NTHi

Um die LDH-Freisetzung nach Stimulation der A549-Zellen mit den entsprechenden Erregern zu messen, werden die Zellen in einer Konzentration von 10⁵ Zellen/100µl auf 96-Lochplatten verteilt und anschließend stimuliert.

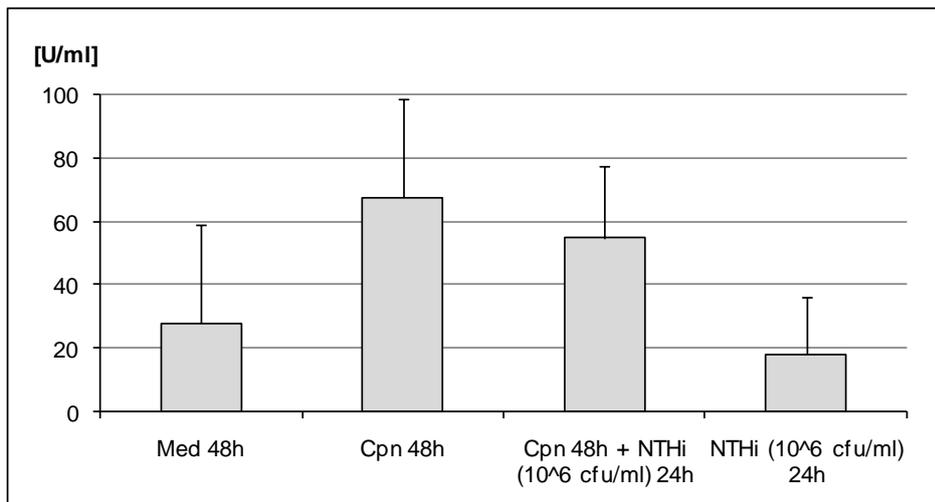


Abb. 4) LDH-Freisetzung aus Alveolarepithelzellen (A549) in Abhängigkeit von der Stimulation mit NTHi 10^6 cfu/ml nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (n=16), Med=Medium (Negativkontrolle)

Untersuchung der Vitalität von MDM während der Stimulation

Damit sich die isolierten Monozyten zu MDM entwickeln, müssen die Zellen über einige Tage mit den Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF, die dem Medium zugesetzt werden, vorinkubiert werden, bevor die Stimulation mit den beiden Erregern erfolgen kann. Aus den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, die gezeigt haben, dass die MDM nach vier Tagen die Oberflächenantigene CD1a und CD86 exprimieren, und der Stimulation mit beiden Erregern über 72h ergibt sich eine Gesamtstimulationsdauer von sieben Tagen, die mit der Vitalität der MDM gut vereinbar ist. Auch die Life-Death-Präparate, die 24h und 48h nach Zugabe von Cpn zu den vorinkubierten Zellen angefertigt worden sind, zeigen keinen Vitalitätsabfall nach der Einzelinfektion (s. Tab. 4).

Vitalität nach Vorinkubation		+ Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml	
unstimuliert	95%		
24h (Tag 1)	97%		
48h (Tag 2)	98%		
72h (Tag 3)	99%		
96h (Tag 4)	94%		
120h (Tag 5)	92%	24h	92%
144h (Tag 6)	90%	48h	89%
168h (Tag 7)	83%		
192h (Tag 8)	84%		
216h (Tag 9)	77%		

Tab. 4) Vitalität der MDM in Abhängigkeit vom Zeitraum der Zellkultur und von der Stimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (n=9), Life-Death-Färbung

2.5 Stimulation und Inhibition

Stimulation und Inhibition			
Inkubation (37°C, 5% CO ₂)	A549-Zellen	MDM	Lunge
	0,3*10 ⁶ Zellen/0,6ml/12-Lochpl. oder 0,6*10 ⁶ Zellen/2ml/6-Lochpl.	10 ⁶ Zellen/ml/1,5ml- Reaktionsgefäß	0,3-0,4g/2ml/24- Lochplatte
t ₋₁ = 1 Std. vor Vorstimulation	bei Inhibitionsversuchen: Zugabe von UO126 10µM		
t ₀ = Vorstimulation	Zugabe von Cpn 0,5*10 ⁶ ifu/ml		
t ₁ = nach 24 Std.	Zugabe von NTHi 10 ⁶ cfu/ml oder NTHi 10 ⁷ cfu/ml für Monoinfektion und Koinfektion nach 24h Cpn-Vorstimulation		
t ₂ = nach 48 Std.	Zugabe von NTHi 10 ⁶ cfu/ml oder NTHi 10 ⁷ cfu/ml für Monoinfektion und Koinfektion nach 48h Cpn-Vorstimulation		
Asservierung der Proben			
Western Blot-Proben	Aufnehmen der Zellen in Lysispuffer 0,5h, 1h und 2h nach Stimulation		
Elisa-Proben	Sammeln der zellfreien Zell- und Gewebekultur-Überstände 4h, 8h und 24-72h nach Stimulation		

Tab. 5) Schema der Stimulation der Zell- und Gewebekultur mit Cpn und NTHi.

Zeit- und Dosisabhängigkeit der Koinfektion

Zunächst wird der Effekt verschiedener Erregerkonzentrationen und Infektionszeitpunkte untersucht. Nachdem zuvor Vitalität und Infektionsraten für verschiedene Erregerkonzentrationen bestimmt worden sind, soll durch den Nachweis von IL-8 im Überstand von A549-Zellen gezeigt werden, unter welchen Bedingungen der inflammatorische Effekt der Mono- und Koinfektion am deutlichsten ist.

Dabei ist die Cpn-Konzentration von 0,5*10⁶ifu/ml im Vergleich zu den geringeren Konzentrationen diejenige, die am stärksten stimuliert (s. Tab. 6). Außerdem zeigt sich bei der Koinfektion durch Vorinkubation mit Cpn vor Stimulation mit NTHi eine wesentlich stärkere Steigerung der Inflammation, während eine gleichzeitige Stimulation mit Cpn und NTHi geringere Effekte zeigt.

Stimulation (A549-Zellen)	IL-8-Konzentration [pg/ml]
Med 24h	773,6 ± 328,45
Cpn 1*10 ⁵ 24h	1319,25 ± 369,87
Cpn 2,5*10 ⁵ 24h	2052 ± 440,02
Cpn 5*10 ⁵ 24h	16318 ± 2943,18
NTHi 24h	836,8 ± 328,92
Cpn 5*10 ⁵ 24h + NTHi 24h	988 ± 0
Med 48h	666,8 ± 256,58
Cpn 1*10 ⁵ 48h	941,6 ± 341,5
Cpn 2,5*10 ⁵ 48h	1149,6 ± 508,48
Cpn 5*10 ⁵ 48h	5098,88 ± 1263,44
NTHi 48h	717 ± 276,16
Cpn 1*10 ⁵ 48h + NTHi 48h	1019,8 ± 464,68
Cpn 2,5*10 ⁵ 48h + NTHi 48h	1019 ± 431,46
Cpn 5*10 ⁵ 48h + NTHi 48h	1890 ± 940,98
Cpn 1*10 ⁵ 48h + NTHi 24h	989 ± 347,54
Cpn 2,5*10 ⁵ 48h + NTHi 24h	1554,4 ± 587,58
Cpn 5*10 ⁵ 48h + NTHi 24h	5566 ± 1554,82

Tab. 6)
IL-8-Konzentrationen
in Abhängigkeit von
Stimulationsdauer und
Cpn-Konzentration in
[ifu/ml]
(n=4, NTHi 10⁶cfu/ml,
Werte als Mittelwert
± Standardfehler)

2.6 Humanes Lungengewebsmodell

Für Versuche im humanen Lungengewebe wurde Gewebe von Patienten genutzt, denen im Rahmen einer Resektion pulmonaler Herdbefunde Lungengewebe entnommen wurde (Klinik für Chirurgie des UK-SH, Campus Lübeck, Prof. Dr. med. P. Kujath und Mitarbeiter). Hierbei handelte es sich um anatomische Resektionen, bei denen gesundes Lungengewebe nach den Regeln der onkologischen Chirurgie mit entfernt wird. Die Patienten wurden präoperativ über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Nutzung von Gewebe, das für die pathologische Beurteilung nicht erforderlich war. Die Verwendung von Lungengewebe, das aufgeklärten Patienten im Rahmen thoraxchirurgischer Eingriffe bei pulmonalen Rundherden entnommen wird, wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät zu Lübeck geprüft und genehmigt (Ethikantrag: Az 08-131).

Das Lungengewebe wird nach der Resektion auf Eis aus dem OP abgeholt und zur Begutachtung in das Institut für Pathologie gebracht. Vom umgebenden tumorfreien Resektionsrand werden je nach Größe des Präparates Gewebestreifen abgeschnitten und umgehend mit einem Skalpell (Firma Feather) nach Gewicht zugeschnitten. Das Gewicht der Lungenstückchen soll 0,3-0,4g betragen.

Während des stationären Aufenthaltes wurden auch die klinischen Daten der Patienten erhoben (s. Tab. 7).

Lunge	m/w	Alter	COPD-Stadium	FEV ₁	FEV ₁ /FVC	Raucherstatus	Steroide vor OP
1	m	78	GOLD II	1,61l (58%)	65%	R	nein
2	m	67	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
3	w	61	GOLD II	1,33l (64%)	62%	R	Fluticason p.inh.
4	w	69	GOLD II	1,33l (57%)	61%	ExR	Fluticason p.inh.
5	m	59	GOLD II	1,86l (59%)	63%	R	nein
6	m	63	GOLD II	2,1l (62%)	68%	R	nein
7	w	67	nein	1,61l (79%)	106%	R	nein
8	m	77	nein	1,86l (81%)	97%	NR	nein
9	m	61	nein	2,74l (87%)	70%	k.A.	k.A.
10	w	62	GOLD II	1,75l (71%)	67%	k.A.	k.A.
11	m	68	GOLD II	2,21l (78%)	67%	k.A.	k.A.
12	w	69	nein	1,29l (54%)	72%	ExR	nein
13	w	51	nein	2,41l (71%)	75%	R	nein
14	w	50	nein	1,99l (75%)	83%	R	nein
15	m	57	GOLD II	2,48l (64%)	58%	R	nein
16	w	69	nein	1,84l (100%)	74%	ExR	nein
17	m	74	nein	2,23l (83%)	95%	ExR	nein
18	m	52	GOLD II	2,75l (69%)	48%	R	Fluticason p. inh.
19	m	67	nein	2,75l (92%)	64%	ExR	nein
20	w	44	nein	3,55l (113%)	75%	R	nein
21	m	61	GOLD II	2,04l (70%)	61%	ExR	nein

Tab. 7) Klinische Daten der 21 chirurgischen Patienten, von denen das Lungengewebe stammt (Abkürzungen: R: Raucher, ExR: Z.n. Rauchen, NR: Nichtraucher, p.inh.: per inhalationem)

Zur Stimulation werden die Lungenstückchen in 24-Lochplatten gebracht und pro Vertiefung mit 2ml Gewebekultur-Medium (500ml RPMI 1640 (Firma Biochrome AG), w. 2.0g/l NaHCO₃, LE (Low Endotoxin), 50ml FCS (Biochrome AG)), bedeckt. Für die Stimulation wird das Lungengewebe mit Cpn, NTHi oder LPS (1µg/ml) inkubiert.

Nach dem Stimulationsintervall werden die Überstände für ELISA-Messungen gesammelt. Das Lungengewebe wird nach der Stimulation in HOPE-Lösung fixiert, da sich hierdurch eine bessere DNA- und Protein-Asservierung erreichen lässt als in der Formalin-Fixierung [39;40;64;93]. Die HOPE-Lösung (HOPE = *Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect*) wird auch für Proben benutzt, die mittels *in situ*-Hybridisierung auf mRNA untersucht werden sollen.

Bestimmung der Zytotoxizität durch Cpn und NTHi im humanen Lungengewebe

Aus den Überständen der Gewebekultur wird im ELISA LDH gemessen, um die Vitalität des Gewebes nach Infektion zu untersuchen. Wie Abb. 5a und b zeigen, finden sich für die Cpn-Infektion nach 48h LDH-Werte, die deutlich über der Zellschädigung im unstimulierten Lungengewebe liegen, während nach 72h Cpn-Infektion die LDH-Freisetzung rückläufig ist.

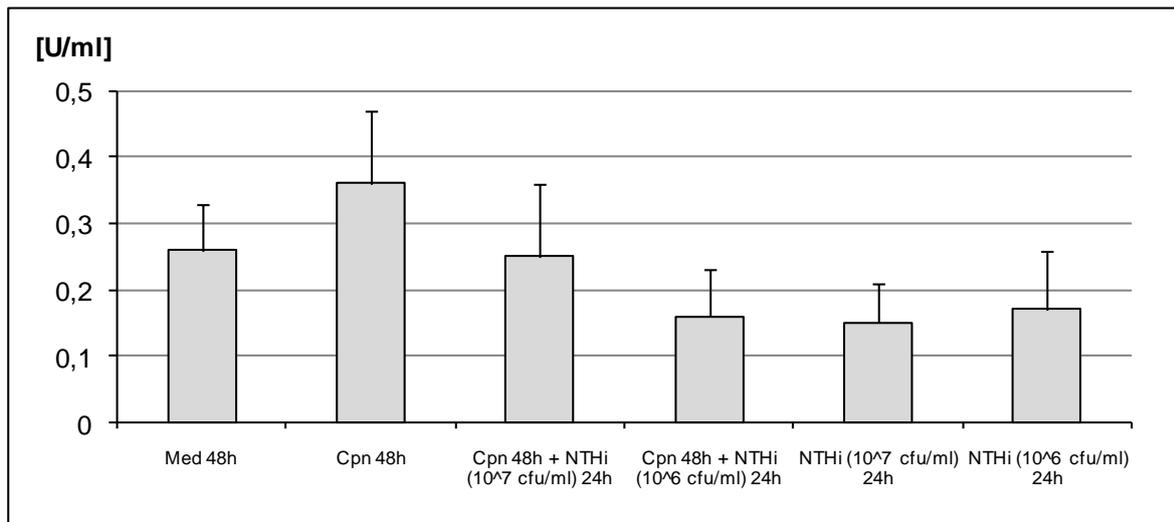


Abb. 5a) LDH-Freisetzung im humanen Lungengewebe nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und Koinfektion mit NTHi 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml (n=16)

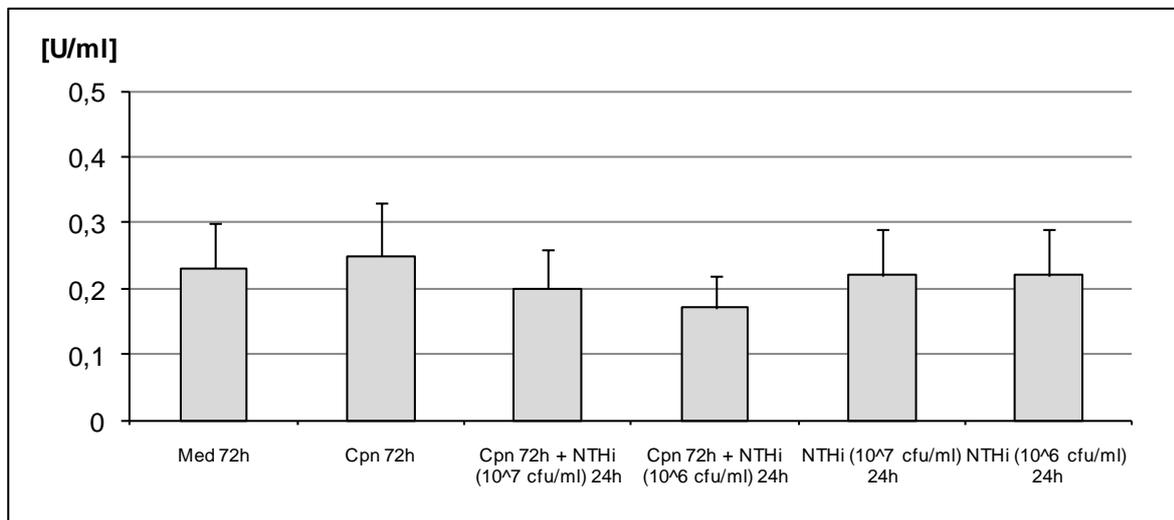


Abb. 5b) LDH-Freisetzung im humanen Lungengewebe nach 48h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und Koinfektion mit NTHi 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml (n=16)

Dabei zeigen die geringen LDH-Werte, dass keine relevante Zytotoxizität im Gewebe vorliegt. Die LDH-Freisetzung als Reaktion auf eine akute Infektion mit NTHi (24h) ist geringer als die LDH-Freisetzung nach Cpn-Monoinfektion. Auffallend ist, dass die Zellschädigung bei der Koinfektion deutlich geringer ist als durch die Cpn-Monoinfektion und etwa der LDH-Freisetzung durch die NTHi-Monoinfektion gleicht.

Die Koinfektion mit NTHi nach Vorstimulation mit Cpn verursacht keine weitere Steigerung der Zellschädigung, sodass die Inflammation auch nach 72h Gewebekultur als Reaktion vitaler Zellen anzusehen ist.

Ermittlung der optimalen Infektionsdosis für NTHi im humanen Lungengewebe

Entsprechend den Vorversuchen in der Zellkultur wird auch im humanen Lungengewebe die optimale Infektionsdosis für NTHi ermittelt. Über 24h wird das Gewebe mit NTHi 10^6 cfu/ml und NTHi 10^7 cfu/ml stimuliert. Dabei sieht man in beiden Fällen eine deutliche Steigerung der IL-8-Sekretion im Vergleich zur IL-8-Produktion im unstimulierten Lungengewebe (Medium-Kontrolle, Abb. 5c).

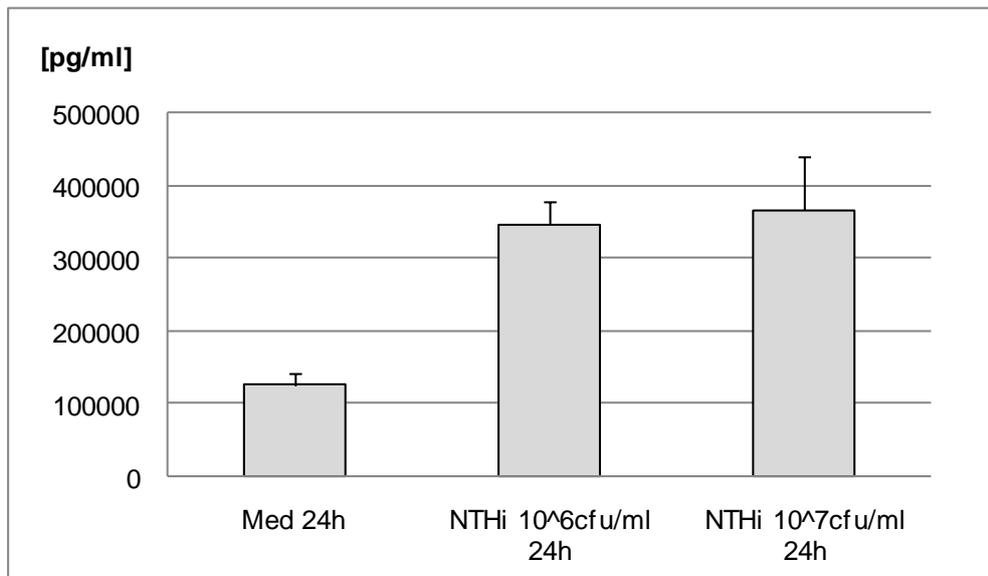


Abb. 5c) IL-8-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Stimulation mit NTHi 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml (n=12)

Da die Zytotoxizität durch die hohe NTHi-Konzentration bei Monoinfektion nicht ansteigt, der inflammatorische Effekt aber stärker ist als mit der geringeren Konzentration von NTHi, werden die Stimulationen für die NTHi-Monoinfektion im Lungengewebe mit NTHi 10^7 cfu/ml durchgeführt. Für die Koinfektion mit Cpn wird für NTHi 10^6 cfu/ml als Infektionsdosis gewählt, um die zytotoxischen Effekte durch die Koinfektion möglichst gering zu halten (vgl. Abb. 5a).

HOPE-Fixierung und Anfertigung der Lungenschnitte

Das Gewebe wird nach der Stimulation in HOPE-Lösung im Sinne einer Immersionsfixierung fixiert, d.h. es wird im 10-fachen Volumen der ursprünglichen Mediummenge aufbewahrt, sodass es nach der Fixierung völlig durchtränkt ist.

Vor der weiteren Verarbeitung wird das Gewebe für 16-64h bei 0-4°C in HOPE-Lösung I inkubiert. Nach der Inkubation wird die HOPE-Lösung entfernt, während das Gewebestückchen im Röhrchen verbleibt und mit 5ml einer Lösung aus Aceton und HOPE-Lösung II für zwei Stunden bei 0-2°C inkubiert wird. Anschließend wird die Lösung verworfen und das Röhrchen mit reinem Aceton aufgefüllt. Damit wird das Gewebe für weitere zwei Stunden inkubiert. Der Vorgang wird zweimal über je zwei Stunden wiederholt. Nach maximal acht Stunden Dehydratation wird die Lösung verworfen und vorgewärmtes Spezialparaffin (Medite Tissue Wax, Schmelzpunkt 52-54°C, Firma Medite) zum Lungengewebe dazugegeben. Die Röhrchen werden für die Paraffinierung über Nacht bei 54-55°C inkubiert. Anschließend werden die Gewebestückchen auf einer Wärmeplatte unter Zugabe von frischem Paraffin ausgebettet. Das Gewebe wird auf Eis abgekühlt und die fertigen Paraffinblöcke aus dem HOPE-fixierten Gewebe werden bei -20°C über 30min tiefgekühlt, bevor sie mit einem Mikrotom angeschnitten werden. Die Schnitte werden zunächst auf der Oberfläche von Streckbad 1 (Aqua dest., RT) gesammelt und dann mit einem gereinigten oder beschichteten Objektträger herausgehoben und einzeln im warmen Streckbad 2 (Aqua dest., 35-50°C) ausgezogen. Sobald der Schnitt glatt auf dem Objektträger liegt, entfernt man mit Filterpapier Wasserreste zwischen Schnitt und Glas. Die Schnitte werden danach bei 37°C über Nacht getrocknet.

Zum Entparaffinieren werden die Objektträger in eine Küvette mit Isopropanol (60°C) gestellt. Nach 10min nimmt man den Objektträger heraus, wäscht ihn in der zweiten, warmgestellten Küvette, lässt ihn ablaufen und lufttrocknen. Zur Rehydratisierung werden die Schnitte für 10min in 70%-igem eisgekühltem Aceton in den Kühlschrank gestellt. Anschließend nimmt man die Objektträger heraus, lässt sie auf Filterpapier ablaufen und wäscht sie 10min lang in einer Küvette mit Aqua dest., bevor man sie für 1-2min auf eine 45°C warme Heizplatte legt, bis das Wasser verdunstet und der Schnitt angetrocknet ist.

Haematoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die rehydratisierten und angetrockneten Schnitte werden für die HE-Färbung für 2-4min in Hämalaun-Lösung gestellt und anschließend in einer Küvette mit Aqua dest. gespült. Nach 1-2min unter fließendem Leitungswasser lässt man sie in Aqua dest. bläuen. Dann werden die Objektträger je nach Intensität 2-4min in der Eosin-Farblösung gefärbt, anschließend in Aqua dest. gewaschen, durch zwei Küvetten mit 70%-igem Alkohol (z.B. Isopropanol) und zwei Küvetten mit absolutem Alkohol gezogen und schließlich in einer dritten Küvette mit

absolutem Alkohol für 10min inkubiert. Die Objektträger werden dann in einer Küvette mit Xylol gespült und in einer zweiten Küvette mit Xylol für 5min inkubiert, bevor sie feucht eingedeckt werden.

Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie färbt man bestimmte Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Dabei bindet der erste Antikörper mit seinem Fab-Fragment an das Antigen, während das Fc-Fragment frei bleibt. Dieses wird vom Sekundärantikörper gebunden und über eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht.

Die Immunhistochemie wird mit einem Polymer-System mit kovalent gebundenem Sekundärantikörper und Enzym (Firma Zytomed-Systems) durchgeführt. Dabei werden die entparaffinierten und rehydratisierten Schnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase zunächst für 10min in 3% H₂O₂ inkubiert. Anschließend werden die Objektträger zur Reduktion der Hintergrundfärbung in Blockpuffer gegeben und danach mit Trispuffer gewaschen, bevor sie für 45min mit dem Primärantikörper inkubiert werden. Im Anschluss werden die Objektträger wieder mit Trispuffer gewaschen. Dann inkubiert man die Schnitte für 20min in *Post Block Reagent*. Nach einem Waschschrift erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit HRP-Polymer, bevor erneut mit Trispuffer gewaschen wird.

Die Schnitte werden dann für 5-10min mit dem Chromogen AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) inkubiert, anschließend für 20 Sekunden mit Haematoxylin gegengefärbt und in Kaysers Glyceringelatine eingedeckt.

***In situ*-Hybridisierung**

Die *in situ*-Hybridisierung arbeitet nach dem gleichen Verfahren, färbt aber statt der Proteine DNA oder mRNA im Gewebe an.

Die mRNA-*in situ*-Hybridisierung wird – wie von Goldmann et al. beschrieben [40] – mit einer Hybridisierungslösung bestehend aus frisch denaturierter Sonde, Formamid, tRNA und Aqua dest. über Nacht in einer feuchten Kammer bei 46°C durchgeführt. Für die Detektion werden die Objektträger zunächst für 1min bei RT in DIG-Waschpuffer gewaschen. Dann wird für 30min *Blocking Reagent* (1%) in Maleinsäurepuffer zugegeben. Im nächsten Schritt wird für weitere 30min ein Phosphatase-konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:7500 in 1% *Blocking Reagent* zugegeben, bevor die Objektträger zweimal 15min in Waschpuffer gewaschen werden. Um einen optimalen pH für die Farbreaktion der

alkalischen Phosphatase zu erreichen, werden die Objektträger für 5min bei RT in *Detection*-Puffer bei einem pH von 9,5 inkubiert. Als Chromogen für die alkalische Phosphatase wird Neu-Fuchsin verwendet und in *Detection*-Puffer verdünnt. Die Farbsubstrat-Lösung wird bei RT zugegeben. Der Färbeprozess wird unter dem Mikroskop beobachtet und nach spätestens 10min gestoppt. Anschließend wird das Präparat gegengefärbt und eingedeckt.

Bei der DNA-*in situ*-Hybridisierung wird AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Chromogen für die Peroxidase (HRP) verwendet. Zunächst wird die Sonde 10min lang in siedendem Wasser denaturiert, bevor sie der Hybridisierungslösung zugegeben und auf den getrockneten Schnitt pipettiert wird. Der Schnitt wird zusammen mit der Sonde über 5min bei 65°C denaturiert, um die DNA-Stränge zu trennen. Nach der Inkubation mit 1:200 verdünntem Anti-DIG-Peroxidase-konjugiertem Antikörper bei 37°C folgen 15min Inkubation mit Streptavidin-HRP. Die Chromogen-Detektion wird mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) über 6-40min durchgeführt. Für die Gegenfärbung wird Mayers Haemalaun verwendet. Schließlich werden die Objektträger mit Kaysers Glyceringelatine bedeckt.

2.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der statistischen Analysen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM). Als statistisch signifikant gilt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Für die Signifikanzprüfung von Stimulationsversuchen bei gepaarten Proben im humanen Lungengewebe und in Zellkulturen wurde der t-Test nach Student gewählt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SPSS Statistics 17.0 für Windows, die Darstellung erfolgte mit Microsoft® Excel 2007.

3 Ergebnisse

3.1 Pulmonale Zielzellen der frühen Phase respiratorischer Infektionen mit NTHi

Eine Infektion mit NTHi führt in den pulmonalen Zielzellen zu einer veränderten Zytokinantwort, gemessen an der IL-8-Sekretion im Vergleich zur basalen IL-8-Produktion in unstimulierten Zellen (Medium-Kontrolle).

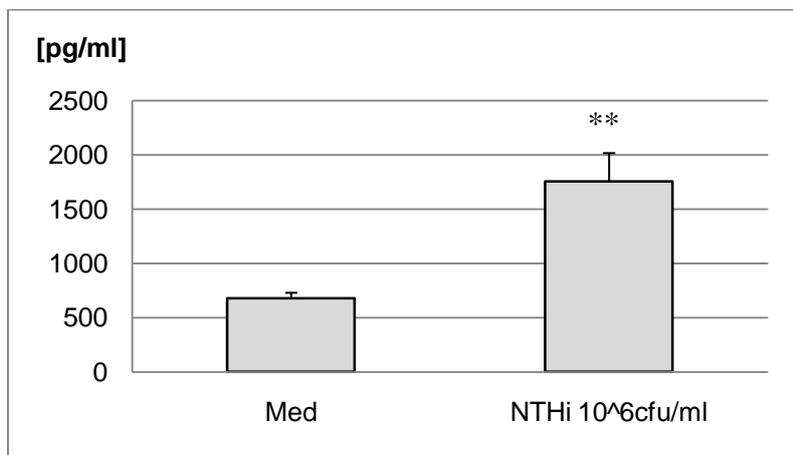


Abb. 6)
IL-8-Sekretion von A549-Zellen nach 24h Stimulation mit NTHi 10⁶cfu/ml (**p<0,01, n=9)

Sowohl in den Alveolarepithelzellen (Abb. 6) als auch in den MDM (Abb. 7) sieht man eine signifikante Steigerung der Inflammation durch NTHi 10⁶cfu/ml nach 24h (jeweils p<0,01).

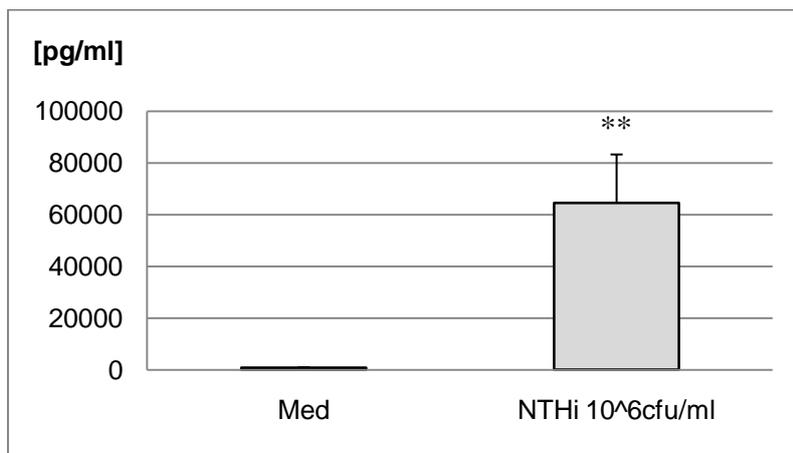


Abb. 7)
IL-8-Sekretion von MDM nach 24h Stimulation mit NTHi 10⁶cfu/ml (**p<0,01, n=13)

3.2 Veränderungen der Zytokinexpression im humanen Lungengewebe nach Infektion mit NTHi

Nach Stimulation mit NTHi über 24h sieht man im humanen Lungengewebe eine Expression verschiedener Zytokine, darunter sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Mediatoren. Als Marker der akuten proinflammatorischen Reaktion wurden IL-8 und TNF- α im Überstand bestimmt, als Marker der antiinflammatorischen Reaktion wurde die Konzentration von TGF- β gemessen. Wie in den Vorversuchen ermittelt, wurde das Lungengewebe mit NTHi 10^7 cfu/ml stimuliert. Es zeigt sich, dass in der akuten Phase der Inflammation IL-8 und TNF- α durch Stimulation mit NTHi deutlich vermehrt ausgeschüttet werden, während die Expression von TGF- β reduziert wird (Abb. 8a-c).

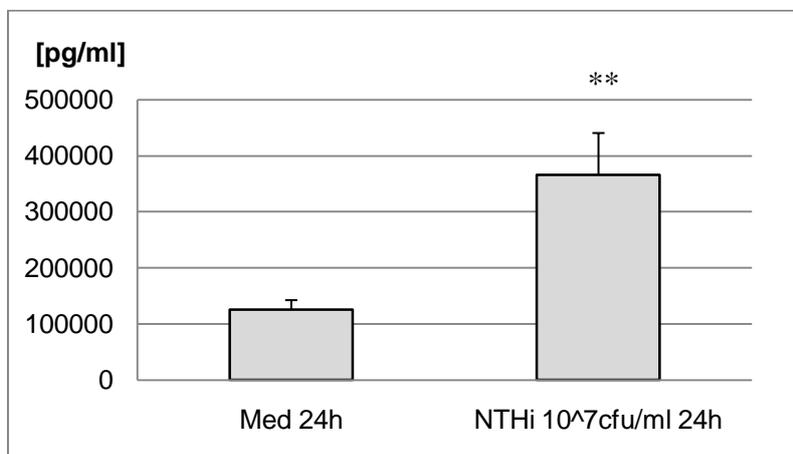


Abb. 8a)
IL-8-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Stimulation mit NTHi 10^7 cfu/ml (** $p < 0,01$, $n=12$)

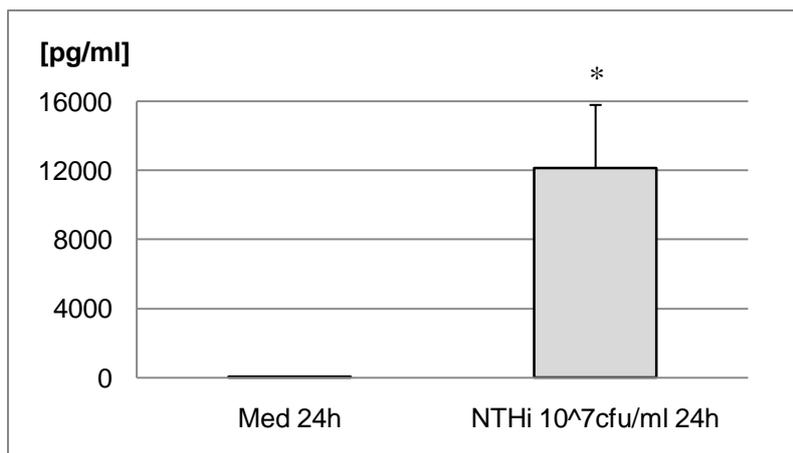


Abb. 8b)
TNF- α -Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Stimulation mit NTHi 10^7 cfu/ml (* $p < 0,05$, $n=5$)

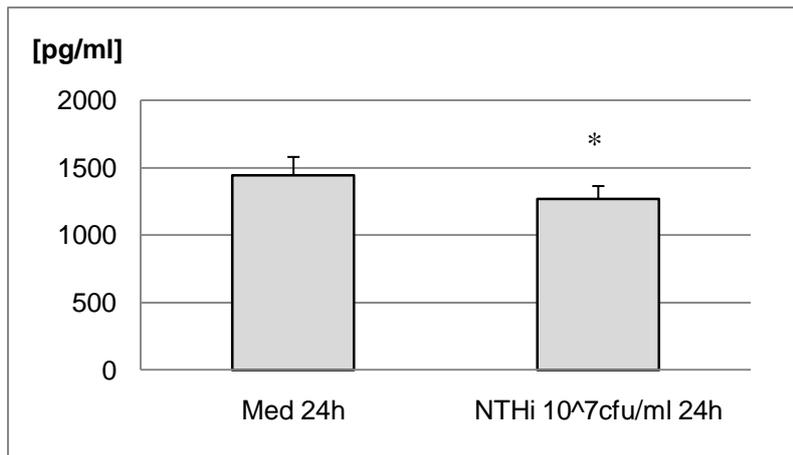


Abb. 8c)
TGF-β-Sekretion im
humanen Lungengewebe nach
24h Stimulation mit NTHi
10⁷ cfu/ml (*p<0,05, n=6)

Man sieht somit einen deutlichen Anstieg proinflammatorischer Mediatoren, während die Konzentration von TGF-β als antiinflammatorischer Komponente durch die Infektion mit NTHi abnimmt, sodass eine Imbalance zwischen Proinflammation und Antiinflammation entsteht, bei der die proinflammatorischen Effekte überwiegen.

Um zu erklären, welcher Mechanismus hinter der Abnahme der TGF-β-Konzentration steckt, führten wir einen mRNA-Array für Mediatoren der TGF-β-Signaltransduktion durch. Dieser zeigt neben einer erhöhten Expression von TGF-β-mRNA eine deutlich erhöhte Expression von BAMBI-mRNA nach Stimulation mit NTHi (s. Abb. 9).

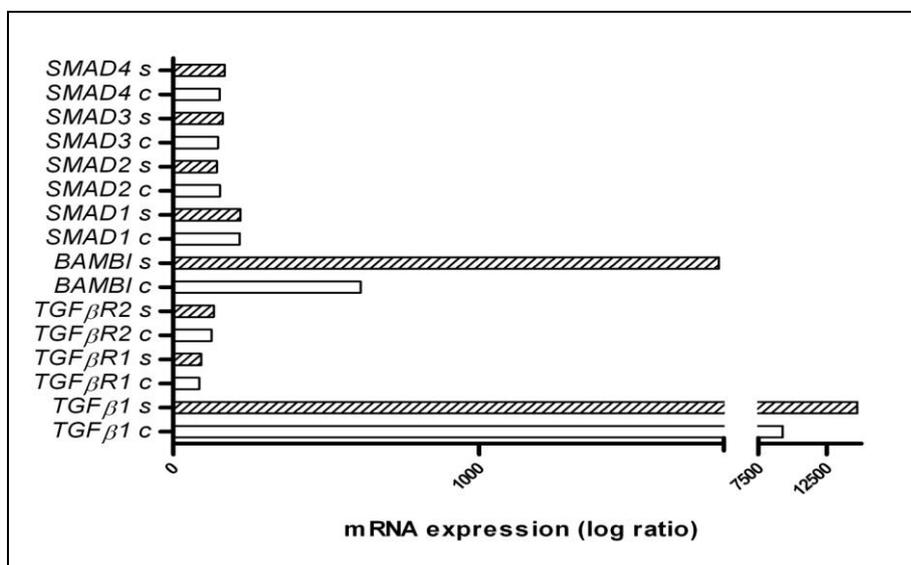


Abb. 9) mRNA-Expression von Mediatoren der TGF-β-Signaltransduktion im
humanen Lungengewebe nach 24h Stimulation mit NTHi 10⁶ cfu/ml
(c= Negativkontrolle, s= nach Stimulation mit NTHi)

Eine *in situ*-Hybridisierung zum Nachweis von BAMBI-mRNA im humanen Lungengewebe bestätigte dieses Ergebnis (s. Abb. 10).

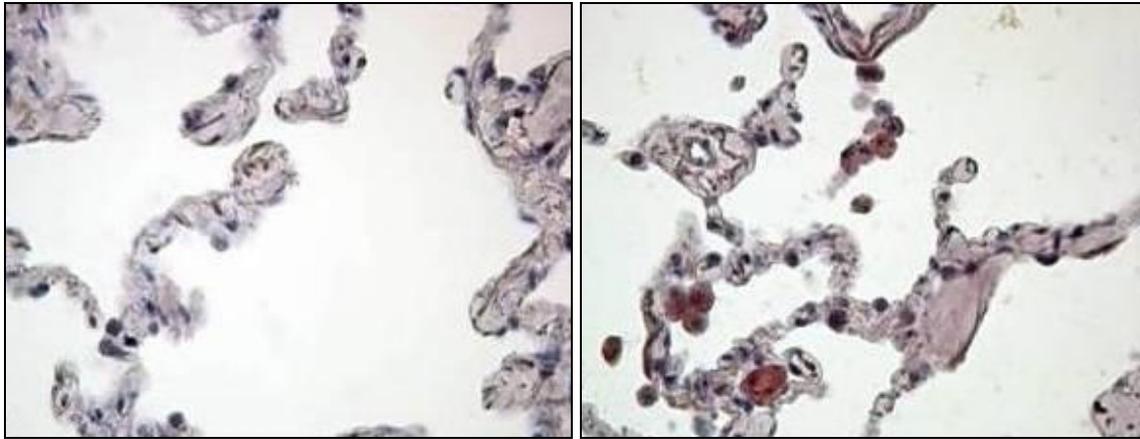


Abb. 10) *In situ*-Hybridisierung auf BAMBI-mRNA im unstimulierten Lungengewebe (li., 400x) und nach 24h Stimulation mit NTHi 10^6 cfu/ml *in vitro* (re., 400x)

Somit ist eine deutlich vermehrte Expression des TGF- β -Pseudorezeptors BAMBI nach Infektion mit NTHi im humanen Lungengewebe nachweisbar. BAMBI (*Bone morphogenetic protein and Activin membrane bound inhibitor*) ist ein TGF- β -Pseudorezeptor, der TGF- β -Protein bindet und inaktiviert. Dadurch ist auf mRNA-Ebene eine vermehrte Expression der TGF- β -mRNA zu erkennen, während die Nachweisbarkeit von TGF- β auf Proteinebene nach Infektion mit NTHi signifikant sinkt.

3.3 Modulation der Entzündungsreaktion auf NTHi durch atypische Pathogene

Zur Untersuchung der Epidemiologie respiratorischer Koinfektionen in unserem Patientenkollektiv wurden Keimnachweise von Patientenproben aus respiratorischen Materialien aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zusammengestellt. Es wurden Daten von 2233 respiratorischen Materialien ausgewertet, von denen wir bei 1120 Patienten mindestens eines der vier respiratorischen Pathogene *Chlamydia pneumoniae* (Cpn), *Haemophilus influenzae* (NTHi), *Streptococcus pneumoniae* (Strpn) und *Branhamella catarrhalis* (Branca) fanden, Mehrfachnachweise eingeschlossen.

Es wurden 135 Infektionen mit Cpn gefunden, 503 mit NTHi, 313 mit *S. pneumoniae* und 169 mit *B. catarrhalis*. In 106/1120 Fällen (9,5%) konnten Koinfektionen nachgewiesen werden. Wie sich die Mono- und Koinfektionen auf die einzelnen Erreger verteilen, zeigt Abb. 11a.

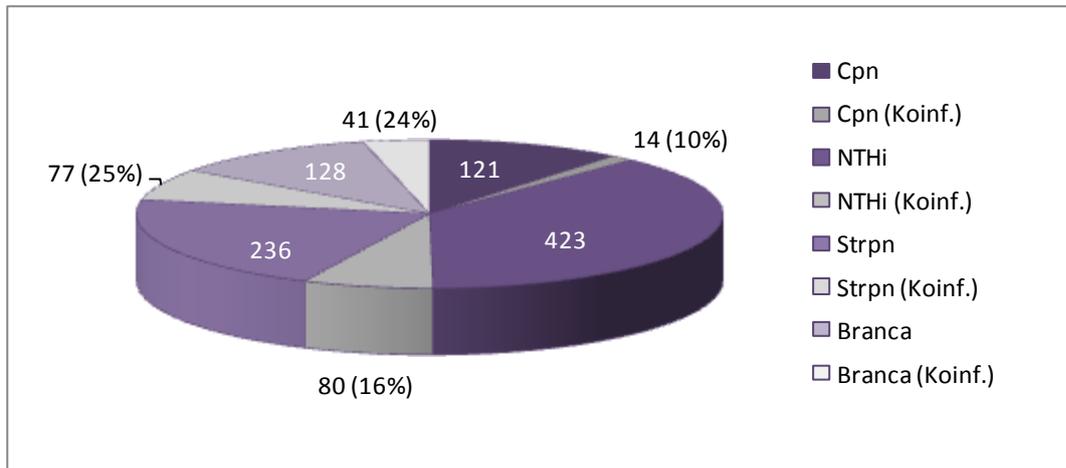


Abb. 11a) Verteilung von 1120 Infektionen einzelner respiratorischer Erreger mit Anteil der Koinfektionen nach einer Erhebung von 2233 Datensätzen respiratorischer Materialien im Zeitraum 2001-2005 aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck (Daten zeigen die absolute Anzahl der nachgewiesenen Keime, Prozentangaben beziehen sich auf Anteil der Koinfektionen an den insgesamt nachgewiesenen Infektionen mit dem jeweiligen Pathogen, Doppelnachweise eingeschlossen)

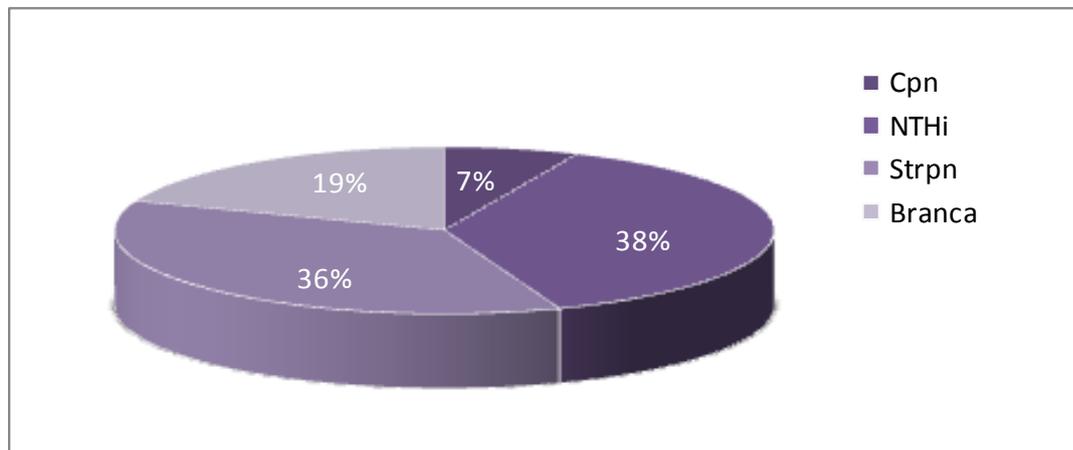


Abb. 11b) Verteilung der einzelnen respiratorischen Erreger auf die untersuchten 106 Koinfektionen der vier Erreger Cpn, NTHi, Strpn und Branca

Bei Betrachtung der 106 Koinfektionen, dargestellt in Abb. 11b, machen Koinfektionen, an denen NTHi beteiligt war, mit 38% den größten Anteil aus, danach folgen Koinfektionen mit *Streptococcus pneumoniae* mit einem Anteil von 36%, während Koinfektionen mit Chlamydien oder Branhamellen seltener gefunden werden. Auch bezogen auf die absoluten Zahlen machen sowohl Mono- als auch Koinfektionen mit NTHi die häufigsten

Keimnachweise aus. Cpn ist als atypisches, intrazelluläres Pathogen von besonderem Interesse, da dieser Erreger nach vorliegenden Daten [76] Superinfektionen mit extrazellulären Erregern zu erleichtern scheint. Daher werden die Koinfektionen mit Cpn gesondert betrachtet. Insgesamt sind 14 Koinfektionen mit Cpn beobachtet worden. Dabei entfallen jeweils sechs Koinfektionen auf NTHi und *Streptococcus pneumoniae* als koinfizierende Erreger, in zwei Fällen konnte *Branhamella catarrhalis* nachgewiesen werden. Die Daten zeigen, dass die Koinfektion von Cpn und NTHi, die Gegenstand unserer Untersuchungen war, eine deutliche klinische Relevanz hat.

Die Effekte der Koinfektion untersuchten wir in Zellkulturen von Alveolarepithelzellen und MDM sowie im humanen Lungengewebe.

Die Stimulation des Lungengewebes mit Cpn erfolgte direkt nach dem Zuschneiden der Gewebeproben. Nach 24h und 48h Vorinkubation wurde wie bei den Zellkulturexperimenten mit NTHi 10^7 cfu/ml oder 10^6 cfu/ml stimuliert. Nach weiteren 24h Inkubation wurde das Gewebe in HOPE-Lösung fixiert und der Überstand für ELISA-Proben gesammelt. Zum Erregernachweis im humanen Lungengewebe nutzten wir die *in situ*-Hybridisierung auf NTHi-DNA im HOPE fixierten Material (s. Abb. 12a-d).

Nach 24h Monoinfektion mit NTHi liegen die Infektionsraten im humanen Lungengewebe in Alveolarepithelzellen (AEZ) bei 10-20% und in Alveolarmakrophagen (AM) bei 55-75%. Wird das Lungengewebe über 48h mit Cpn vorstimuliert und erst dann für 24h mit NTHi infiziert, steigen die Infektionsraten von NTHi auf 20-35% in AEZ und 70-80% in AM.

Abb. 12a-d) Nachweis der Infektion mit Cpn und NTHi an repräsentativen Lungenschnitten durch *in situ*-Hybridisierung (n=2)

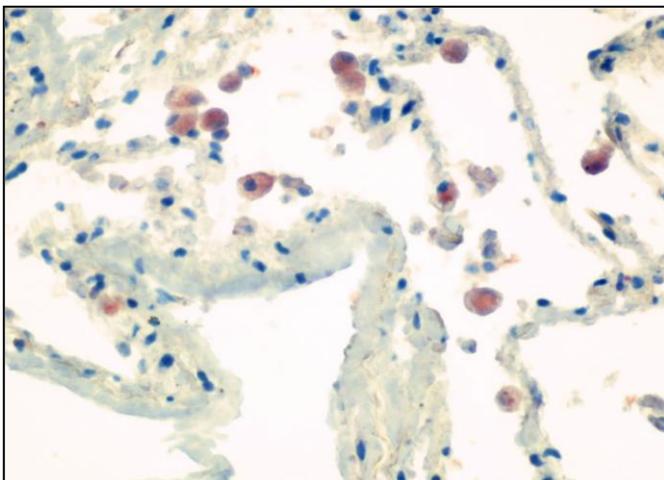


Abb. 12a)
In situ Hybridisierung auf Cpn-DNA (Anti-DIG-AP-Neufuchsin; 400x) nach *in vitro*-Infektion mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml über 24h

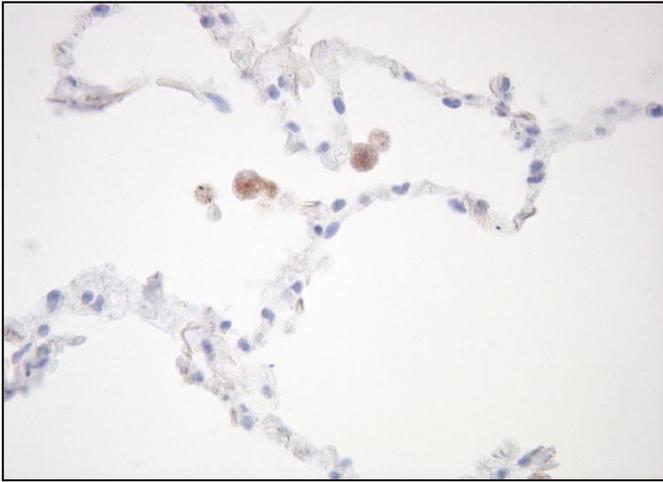


Abb. 12b)
 Unstimuliertes Lungenge-
 webe (*In situ*-Hybridisie-
 rung auf NTHi-DNA, Anti-
 DIG-HRP-AEC; 400x)

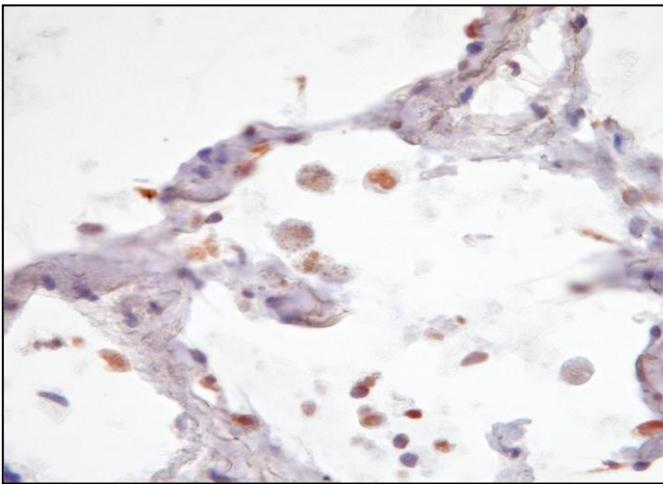


Abb. 12c)
 Infektion mit NTHi
 10^6 cfu/ml über 24h (400x).
 Infektionsraten für NTHi:
 AEZ 10-20%, AM 55-75%.

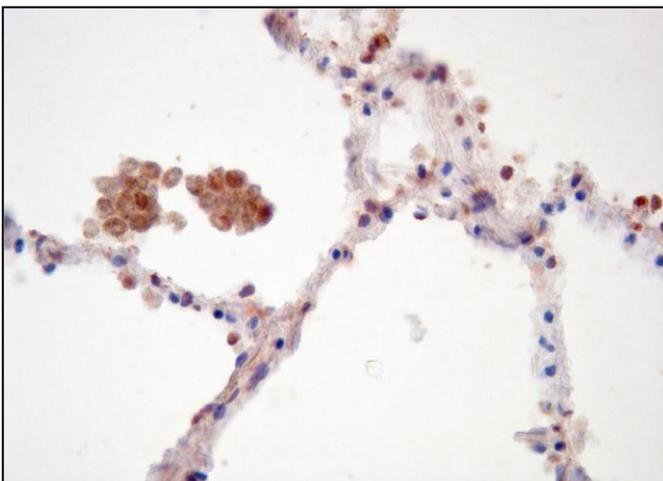


Abb. 12d)
 Infektion mit NTHi
 10^6 cfu/ml 24h nach 48h
 Vorinkubation mit Cpn
 $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (400x).
 Infektionsraten für NTHi:
 AEZ 20-35%, AM 70-80%.

Durch *in situ*-Hybridisierung auf IL-8-mRNA ließ sich auch intrazellulär im humanen Lungengewebe eine erhöhte IL-8-Produktion durch die Einzelinfektionen und eine Steigerung durch die Koinfektion nachweisen (Abb. 13a-d).

Abb. 13a-d) Nachweis der intrazellulären IL-8-Expression in repräsentativen Lungenschnitten mit mRNA-*in situ*-Hybridisierung (n=1).

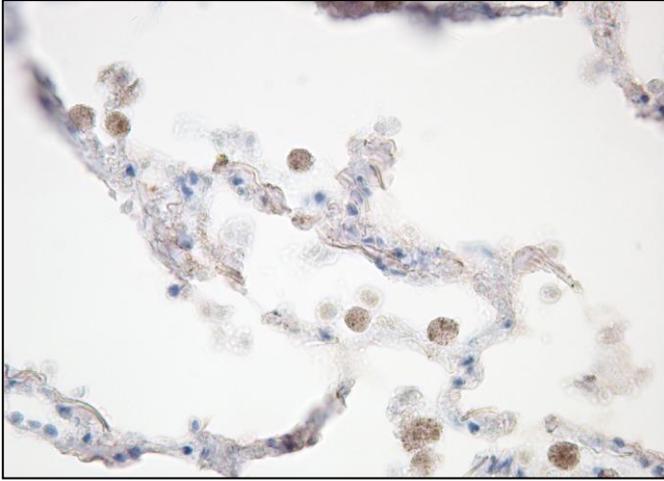


Abb. 13a)
Unstimuliertes Lungengewebe
(*In situ*-Hybridisierung auf
IL-8-mRNA, 400x)

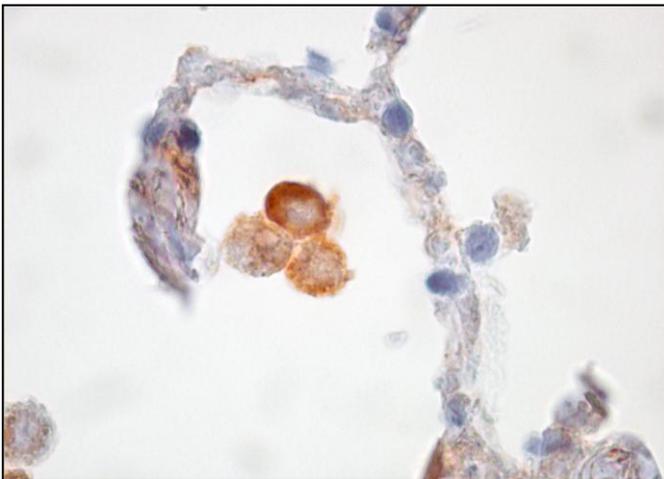


Abb. 13b)
Anstieg der intrazellulären
IL-8-mRNA-Expression nach
24h Stimulation mit Cpn
 $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (1000x)

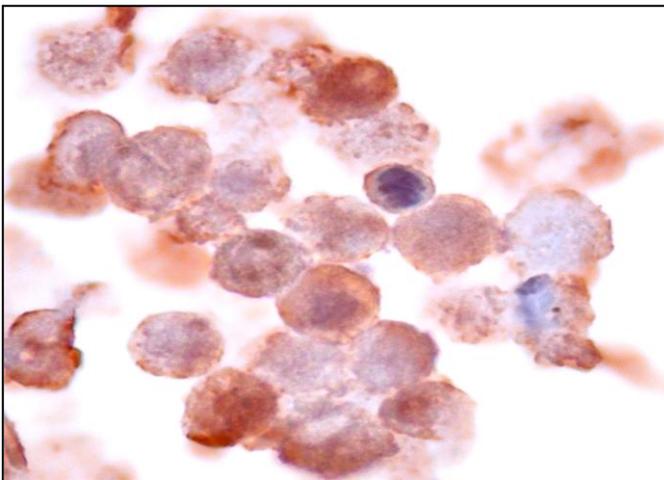


Abb. 13c)
Steigerung der IL-8-mRNA-
Expression durch 24h
Koinfektion mit NTHi
 10^6 cfu/ml nach 48h
Vorinkubation mit Cpn
 $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (1000x)

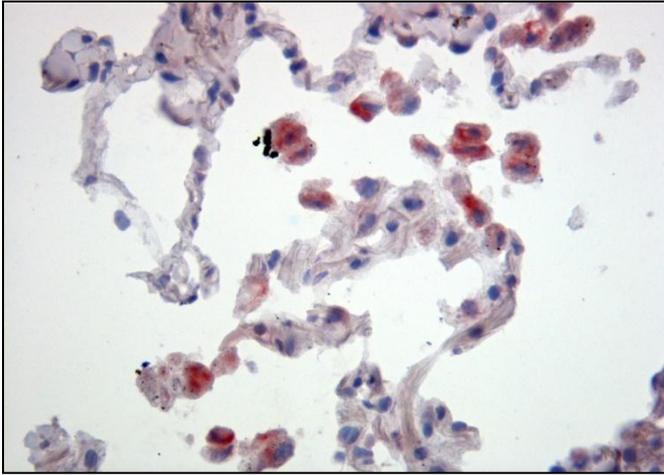


Abb. 13d)
IL-8-mRNA-Expression
nach 24h Stimulation mit
NTHi 10⁶cfu/ml (400x).

Es zeigt sich eine geringe basale IL-8-Produktion im unstimulierten humanen Lungengewebe. Diese kann durch 48h Vorinkubation mit Cpn verstärkt werden. Nach 24h Koinfektion mit NTHi 10⁶cfu/ml sehen wir eine weitere Steigerung der intrazellulären IL-8-Expression und somit eine deutlich verstärkte Inflammation als Reaktion auf die Kostimulation durch zwei respiratorische Pathogene. Auch die Expression von IL-8-mRNA nach 24h Monoinfektion mit NTHi ist deutlich geringer als nach Koinfektion von Cpn und NTHi.

Veränderungen der IL-8-Sekretion durch die Koinfektion mit Cpn und NTHi

Humanes Lungengewebe wird mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml und NTHi 10⁶cfu/ml stimuliert. Nach 24h Stimulation mit Cpn kann die IL-8-Produktion im Vergleich zur IL-8-Konzentration im unstimulierten Lungengewebe im Sinne einer Vorstimulation des Gewebes tendenziell gesteigert werden (p=0,058, Abb. 14a). Die IL-8-Produktion nach Koinfektion durch Cpn und NTHi zeigt dementsprechend tendenziell höhere Werte als die NTHi-Monoinfektion (p=0,154, Abb. 14b).

Eine längere Vorinkubation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml zeigt im humanen Lungengewebe keine signifikante Steigerung der IL-8-Sekretion bei Koinfektion verglichen mit der NTHi-Monoinfektion (Daten nicht gezeigt).

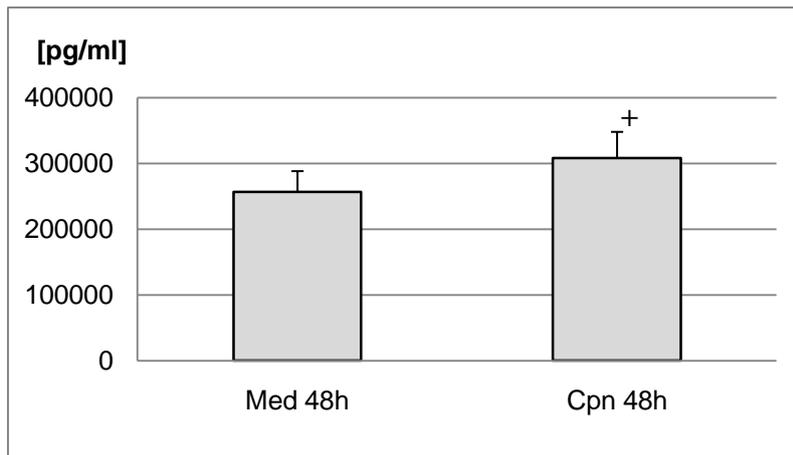


Abb. 14a)
IL-8-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml ($^+p=0,058$, $n=19$)

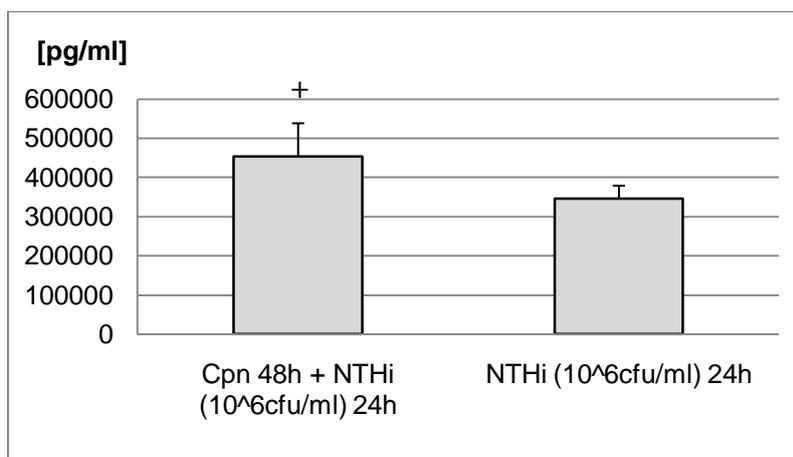


Abb. 14b)
IL-8-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml ($^+p=0,154$, $n=13$)

Tabelle 8 zeigt an drei Beispielen mit mäßiger Vorstimulation durch Cpn (IL-8-Konzentration <400 ng/ml nach 48h), dass die proinflammatorische Antwort auf die Koinkubation im humanen Lungengewebe unter diesen Bedingungen annähernd einem additiven Effekt unterliegt.

	für NTHi 10^6 cfu/ml ($n=3$)	für NTHi 10^7 cfu/ml ($n=3$)
Cpn 48h	387496	226714
NTHi (10^6 cfu/ml) 24h	364762	
NTHi (10^7 cfu/ml) 24h		208806
Cpn 48h + NTHi (10^6 cfu/ml) 24h	725883	
Cpn 48h + NTHi (10^7 cfu/ml) 24h		402759

Tab. 8) IL-8-Konzentrationen [pg/ml] im Gewebekultur-Überstand von humanem Lungengewebe nach Koinkubation mit NTHi-Konzentrationen von 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml nach 24h Vorinkubation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml

Bei Betrachtung der Zellkulturen von Alveolarepithelzellen und dem Alveolarmakrophagen-Modell der MDM zeigen sich durchaus Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Zellen durch die beiden Erreger.

Die Infektion mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml führt in Alveolarepithelzellen nach 24h zu einer signifikanten Steigerung der IL-8-Produktion ($p < 0,01$, Abb. 15a). Nach der Koinfektion mit Cpn und NTHi ist die IL-8-Konzentration gegenüber der NTHi-Monoinfektion ebenfalls signifikant gesteigert ($p < 0,05$, Abb. 15b).

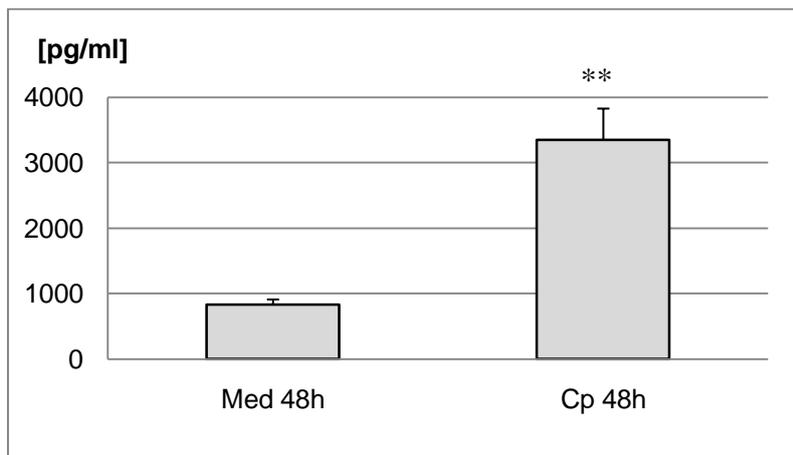


Abb. 15a)
IL-8-Sekretion in Alveolarepithelzellen nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (** $p < 0,01$, n=30)

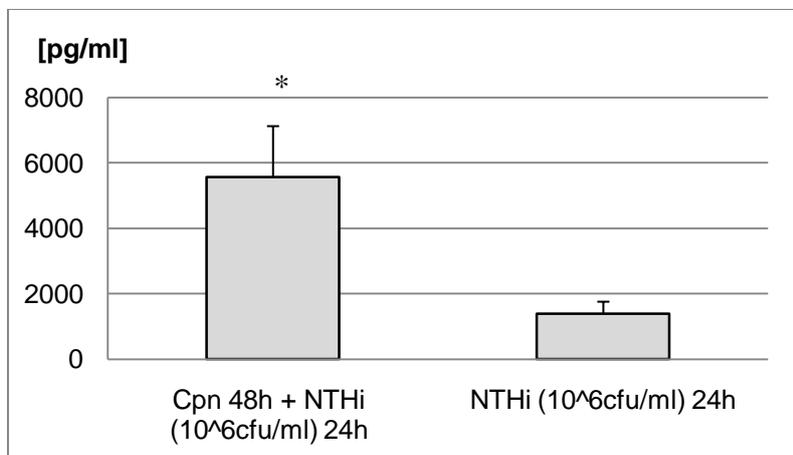


Abb. 15b)
IL-8-Sekretion in Alveolarepithelzellen nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml (* $p < 0,05$, n=8)

Auch nach längerer Vorinkubation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml NTHi sieht man in Alveolarepithelzellen eine signifikante Steigerung der IL-8-Sekretion durch die Koinfektion gegenüber der Einzelinfektion mit NTHi 10^6 cfu/ml ($p < 0,01$, Daten nicht gezeigt).

Bei den MDM zeigt sich nach 24h Vorinkubation mit Cpn zwar ein signifikanter Anstieg der IL-8-Sekretion im Vergleich zu unstimulierten MDM ($p < 0,05$, Abb. 16a), nach

anschließender Koinkubation mit NTHi über 24h ist aber kein statistischer Effekt in der Gesamtpopulation der Spender nachweisbar (Abb. 16b).

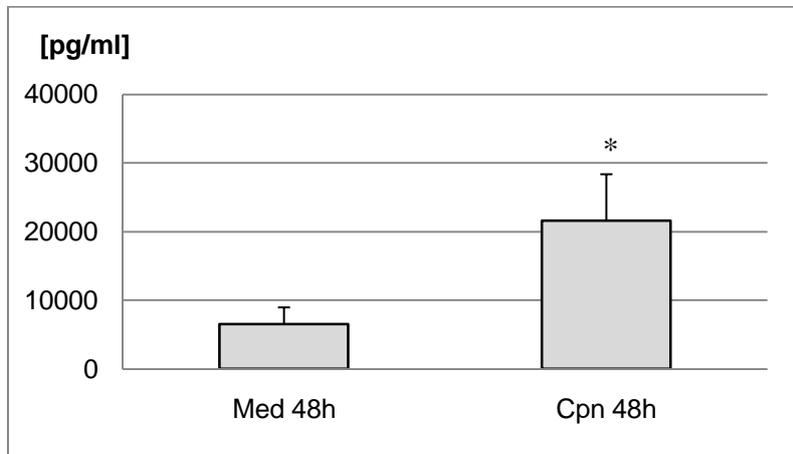


Abb. 16a)
IL-8-Sekretion in MDM nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (* $p < 0,05$, n=14)

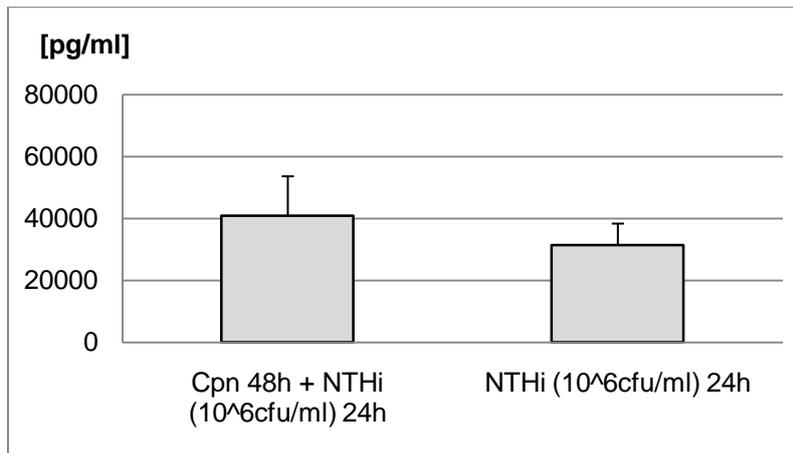


Abb. 16b)
IL-8-Sekretion in MDM nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml. Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml über 24h (n=13, n.sign.)

Die Ergebnisse der Stimulation von MDM spiegeln wider, dass es sich bei Makrophagen um eine heterogene Gruppe von Zellen handelt, deren verschiedene Subgruppen sich bezüglich der Stimulierbarkeit der Zytokinexpression deutlich unterscheiden.

Nach 48h Vorinkubation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml zeigt das Gesamtkollektiv ebenfalls eine signifikante Änderung der IL-8-Sekretion im Vergleich zu unstimulierten Zellen ($p < 0,01$, Abb. 17a), zwischen der Koinfektion und der NTHi-Monoinfektion ist aber auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar (Abb. 17b).

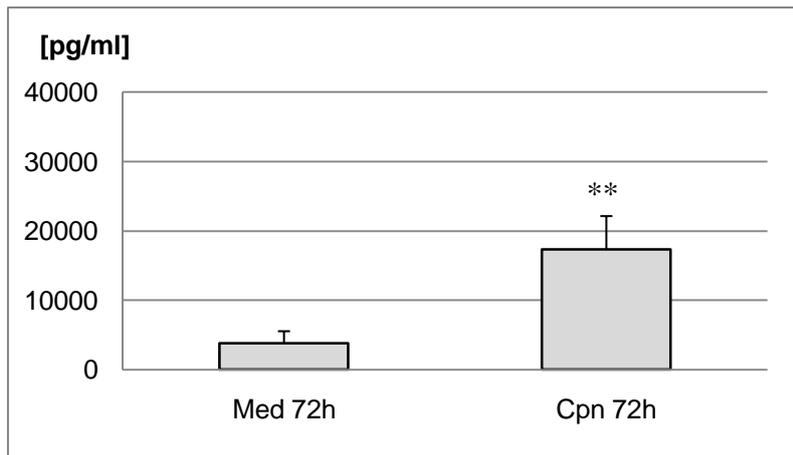


Abb. 17a)
IL-8-Sekretion in MDM nach 48h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml ($p < 0,01$, $n=14$)**

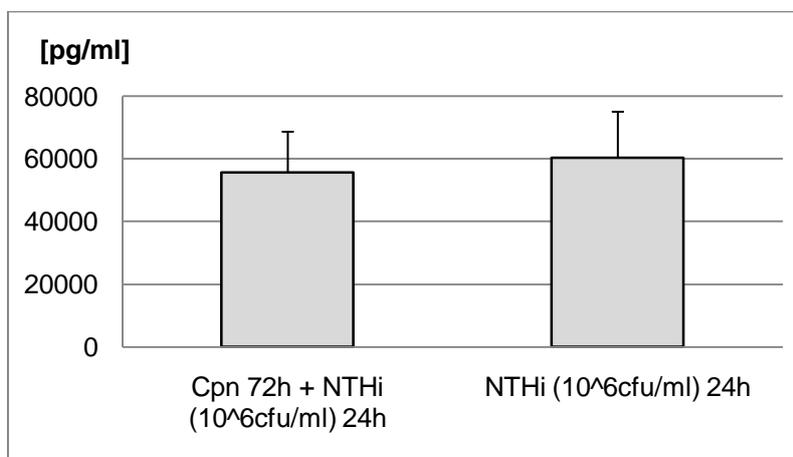


Abb. 17b)
IL-8-Sekretion in MDM nach 48h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml ($n=5$, n.sign.)

Einfluss einer chronischen Atemwegserkrankung auf die IL-8-Sekretion

Betrachtet man Patienten mit und ohne COPD getrennt (Abb. 18), fällt eine weitere Besonderheit der Zytokinexpression auf: Bei den Patienten ohne COPD wird die IL-8-Produktion durch die Koinkubation mit NTHi nach 24h Vorinkubation mit Cpn im Vergleich zur Cpn-Monoinfektion nicht signifikant gesteigert (Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml $390694,17 \pm 24952,79$ pg/ml vs. NTHi 10^6 cfu/ml $365535,83 \pm 33992,77$ pg/ml, $n=6$, n.sign.), während sich im Lungengewebe von Patienten mit COPD eine erhöhte Stimulierbarkeit durch die Koinkubation vorzuliegen scheint (Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml $541921,50 \pm 182383,49$ pg/ml vs. NTHi 10^6 cfu/ml $332221,17 \pm 63420,67$ pg/ml, $n=6$, $p=0,2$). Dieses Ergebnis ist, möglicherweise bedingt durch die geringe Patientenzahl, nicht signifikant. Eine deskriptive Darstellung der absoluten Zytokinkonzentrationen findet sich in Abb. 18.

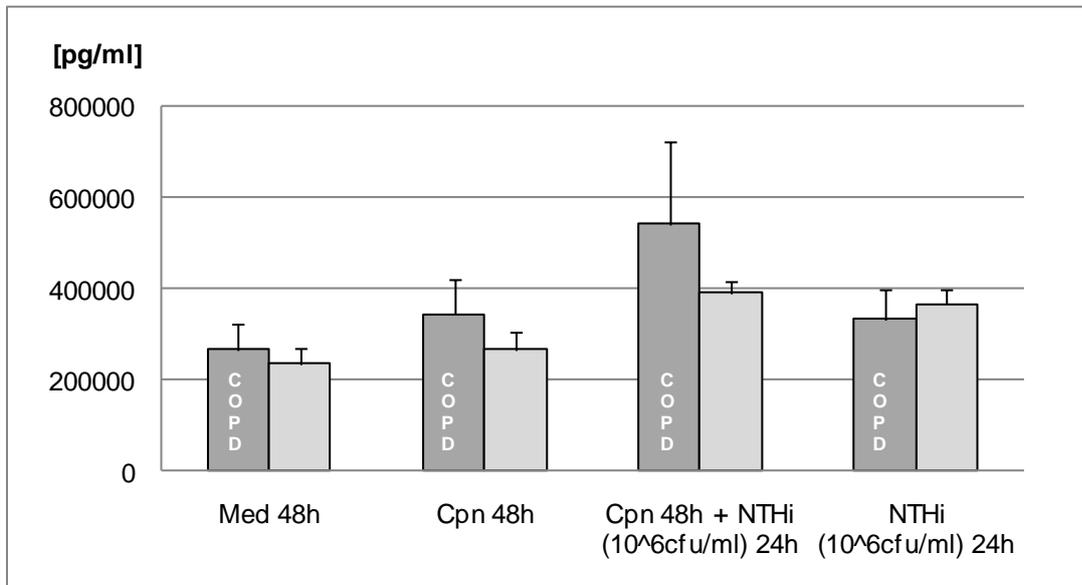


Abb. 18) IL-8-Sekretion im humanen Lungengewebe von Patienten mit und ohne COPD nach Stimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und NTHi 10^6 cfu/ml (jeweils $n=6$, n.sign.)

Veränderungen der MCP-1-Sekretion durch die Koinfektion mit Cpn und NTHi

Im humanen Lungengewebe zeigt sich neben einer veränderten IL-8-Sekretion gegenüber der NTHi-Monoinfektion auch eine veränderte MCP-1-Produktion durch die Koinfektion, da dieser Unterschied aber statistisch nicht signifikant ist, seien hier nur die absoluten Konzentrationen deskriptiv dargestellt (Abb. 19a und b)

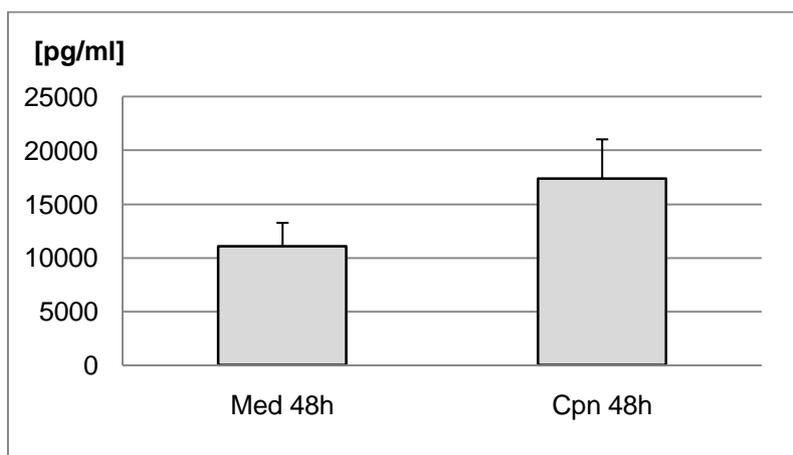


Abb. 19a) MCP-1-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml ($n=13$, n.sign.)

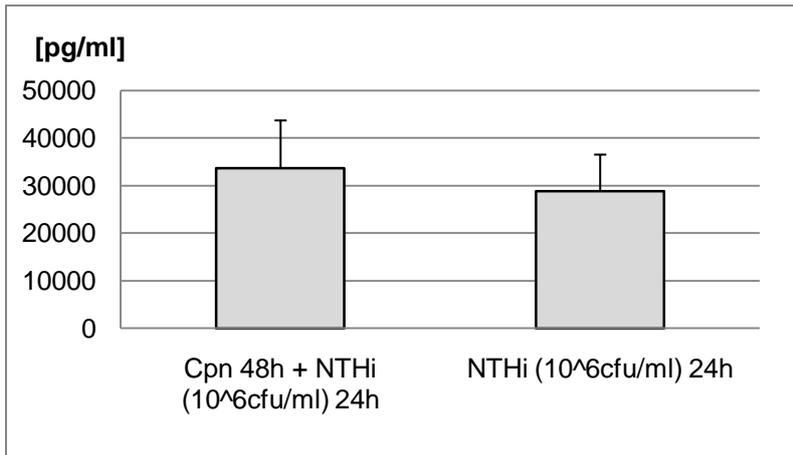


Abb. 19b)
MCP-1-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Vorstimulation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10⁶cfu/ml (n=13, n.sign.)

Lediglich in Alveolarepithelzellen zeigt sich eine signifikante Steigerung der MCP-1-Sekretion durch die Koinkubation im Vergleich zur NTHi-Monoinfektion (Abb. 19d).

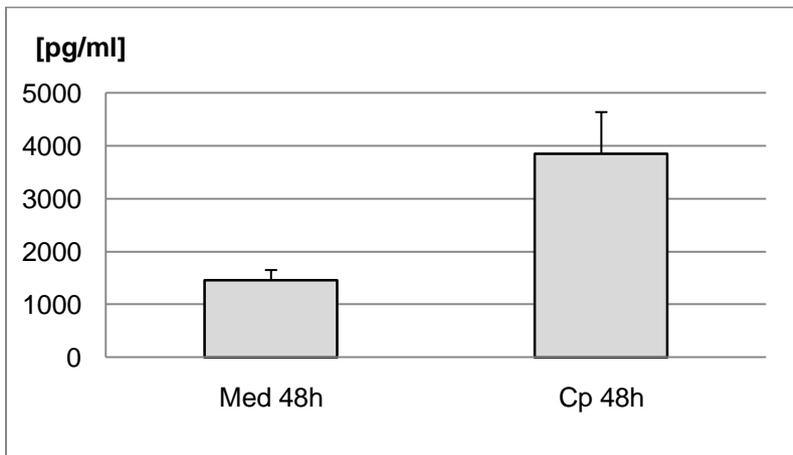


Abb. 19c)
MCP-1-Sekretion in Alveolarepithelzellen nach 24h Vorstimulation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml (n=8, n.sign.)

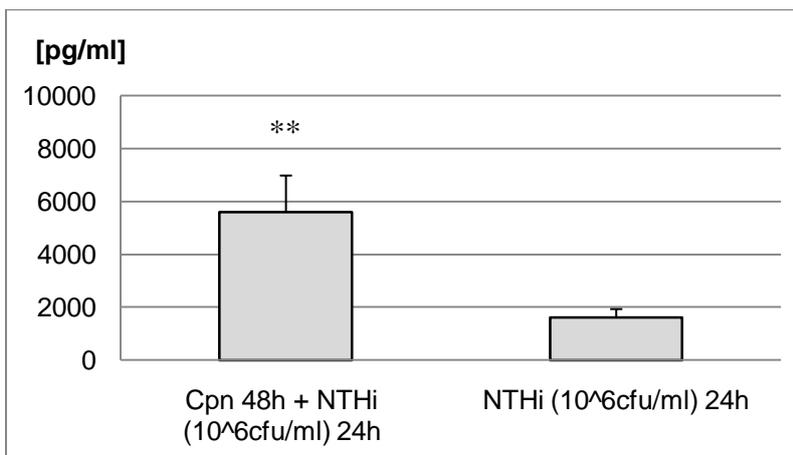


Abb. 19d)
MCP-1-Sekretion in Alveolarepithelzellen nach 24h Vorstimulation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10⁶cfu/ml (p<0,01, n=8)**

Bei den MDM finden sich tendenziell ähnliche Effekte, die aber aufgrund einer großen Varianz bei einer relativ geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant sind (s. Tab. 9).

Stimulation	Alveolarepithelzellen	MDM
Med 48h	1455,29 ± 198,13	31,8 ± 2,57
Cpn 48h	3847,63 ± 790,45	369,60 ± 161,64
Cpn 48h + NTHi (10 ⁶ cfu/ml) 24h	5596,88 ± 1371,73**	1979,8 ± 1090,50
NTHi (10 ⁶ cfu/ml) 24h	1600,63 ± 321,5	53,0 ± 25,91

Tab. 9) MCP-1-Konzentrationen [pg/ml] in Zellkultur-Überständen von Alveolarepithelzellen und MDM nach 24h Vorstimulation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10⁶cfu/ml (AEZ **p<0,01 vs. NTHi 10⁶cfu/ml 24h, n=8; MDM n=5, n.sign.)

Nach 48h Vorinkubation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml findet man für die Koinkubation weder in den Alveolarepithelzellen noch in den MDM signifikante Änderungen der MCP-1-Konzentration, möglicherweise bedingt durch eine hohe Vorstimulation der Zellen bzw. eine zu starke Stimulation durch Cpn (s. Tab. 10).

Stimulation	Alveolarepithelzellen	MDM
Med 72h	2237,25 ± 428,52	34,90 ± 5,56
Cpn 72h	1589,0 ± 173,45	620,70 ± 332,51
Cpn 72h + NTHi (10 ⁶ cfu/ml) 24h	1933,81 ± 148,03	565,60 ± 376,57
NTHi (10 ⁶ cfu/ml) 24h	2291,81 ± 208,70	43,80 ± 9,90

Tab. 10) MCP-1-Konzentrationen [pg/ml] in Zellkultur-Überständen von Alveolarepithelzellen und MDM nach 48h Vorstimulation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10⁶cfu/ml (AEZ n=16, n.sign.; MDM n=10, n.sign.)

Veränderungen der IL-6-Sekretion durch die Koinkubation mit Cpn und NTHi

Auch die IL-6-Sekretion wird durch die Stimulation mit Cpn und NTHi beeinflusst. Die Ergebnisse sind in Abb. 20a und b dargestellt. Im humanen Lungengewebe zeigen sich nach 24h Vorstimulation mit Cpn aber keine signifikanten Unterschiede der sezernierten IL-6-Konzentration durch die Koinkubation verglichen mit der NTHi-Monoinfektion (Abb. 20a, Cpn+NTHi 10⁶cfu/ml 1033789,77±232489,98pg/ml vs. NTHi 10⁶cfu/ml 926158,08±194102,78pg/ml, n=13, n.sign.). Ein Grund dafür kann – zumindest im Lungengewebe – die hohe basale IL-6-Expression im unstimulierten Lungengewebe sein, die eine weitere Stimulation erschwert.

Nach längerer Vorstimulation mit Cpn zeigt sich ebenfalls keine signifikante Steigerung der IL-6-Sekretion durch die Koinfektion mit NTHi (Daten nicht gezeigt).

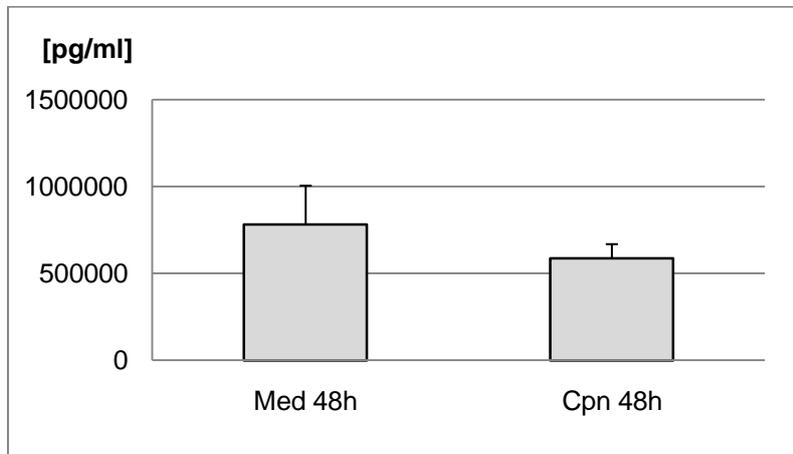


Abb. 20a)
IL-6-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (n=13, n.sign.)

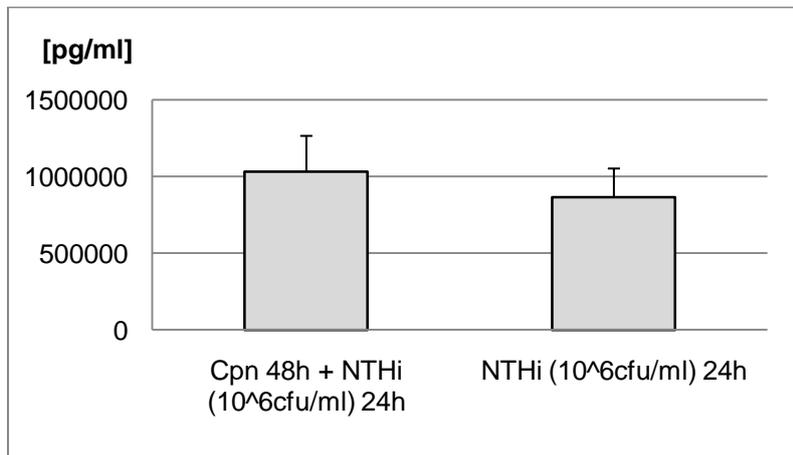


Abb. 20b)
IL-6-Sekretion im humanen Lungengewebe nach 48h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml (n=16, n.sign.)

Die Konzentrationen von IL-6 im Überstand stimulierter Alveolarepithelzellen sind insgesamt sehr gering, dennoch zeigen sich signifikante Effekte durch die Koinfektion. In den MDM zeigen sich ebenfalls Änderungen der IL-6-Sekretion durch die Infektion mit Cpn und NTHi, wobei hier statistisch kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden kann (Tab. 11).

Stimulation	Alveolarepithelzellen	MDM
Med 48h	28,0 ± 5,09	47,30 ± 15,02
Cpn 48h	171,08 ± 35,26	858,80 ± 476,59
Cpn 48h + NTHi (10^6 cfu/ml) 24h	385,13 ± 94,71**	4015,6 ± 3159,1
NTHi (10^6 cfu/ml) 24h	78,13 ± 26,12	7679,60 ± 7076,41

Tab. 11) IL-6-Konzentrationen [pg/ml] in Zellkultur-Überständen von Alveolarepithelzellen und MDM nach 24h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml (AEZ ** p<0,01 vs. NTHi 10^6 cfu/ml 24h, n=8; MDM n=5, n.sign.)

Auch nach längerer Stimulationsdauer mit Cpn bleiben die Konzentrationen von IL-6 in der Zellkultur der Alveolarepithelzellen sehr gering und liegen teilweise weiterhin unterhalb der Nachweisgrenze. Die Koinfektion mit NTHi führt hier aber dennoch zu einer Erhöhung der IL-6-Konzentration, während sich bei MDM auch nach längerer Inkubationszeit tendenziell eher eine Reduktion der NTHi-vermittelten IL-6-Sekretion durch eine Vorstimulation mit Cpn zeigt, wobei auch hier statistisch kein signifikanter Effekt nachweisbar ist (Tab. 12).

Stimulation	Alveolarepithelzellen	MDM
Med 72h	31,33 ± 4,94	182,30 ± 168,53
Cpn 72h	44,13 ± 16,46	600,0 ± 303,06
Cpn 72h + NTHi (10 ⁶ cfu/ml) 24h	56,73 ± 18,24	2446,50 ± 1206,45
NTHi (10 ⁶ cfu/ml) 24h	54,33 ± 13,41	2863,80 ± 2577,29

Tab. 12) IL-6-Konzentrationen [pg/ml] in Zellkultur-Überständen von Alveolarepithelzellen und MDM nach 48h Vorstimulation mit Cpn 0,5*10⁶ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10⁶cfu/ml (AEZ n=15, n.sign.; MDM n=10, n.sign.)

3.4 Bedeutung von Toll like-Rezeptoren für Erregererkennung und Entzündungsreaktion nach Infektion mit NTHi

Da bekannt ist, dass es nach Infektion respiratorischer Zellen durch Cpn zu einem Anstieg der TLR2-mRNA-Expression und somit der TLR2-Expression auf der Zelloberfläche kommt [24] und dass NTHi über eine Interaktion mit dem TLR2-Rezeptor zu inflammatorischen Effekten an der Zielzelle führt [85], vermuteten wir eine Beteiligung der TLR2-Rezeptoren am Mechanismus der Koinfektion von Cpn und NTHi.

In den HOPE-fixierten Lungenpräparaten wurde mit Immunhistochemie die Expression von TLR2 untersucht. Dabei wird zunächst mit einer Negativkontrolle ausgeschlossen, dass unspezifische Bindungen bestehen (Abb. 21a). Schon im unstimulierten Lungengewebe sind vereinzelt TLR2-positive Zellen nachweisbar (Abb. 21b). Nach Stimulation mit Cpn findet sich ein deutlicher Anstieg der TLR2-Expression, insbesondere in den Alveolarmakrophagen (Abb. 21c). Dieser Effekt wird durch die Koinfektion mit NTHi verstärkt, sodass es zu einem weiteren Anstieg der TLR2-Expression kommt (Abb. 21d). Diese Ergebnisse begründen zumindest eine Mitbeteiligung des TLR2-Rezeptors an der Pathophysiologie der Koinfektion.

Abb. 21a-d) TLR2-Expression in repräsentativen Lungenschnitten. Regulation der Rezeptordichte im Infektionsverlauf, nachgewiesen mit Immunhistochemie (n=1)

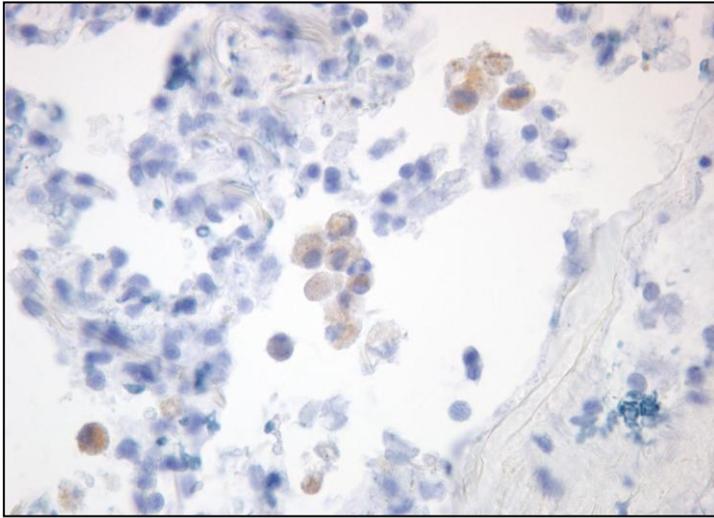


Abb. 21a)
Unstimuliertes Lungengewebe
(Negativkontrolle zum Ausschluss
unspezifischer Bindungen, 400x)

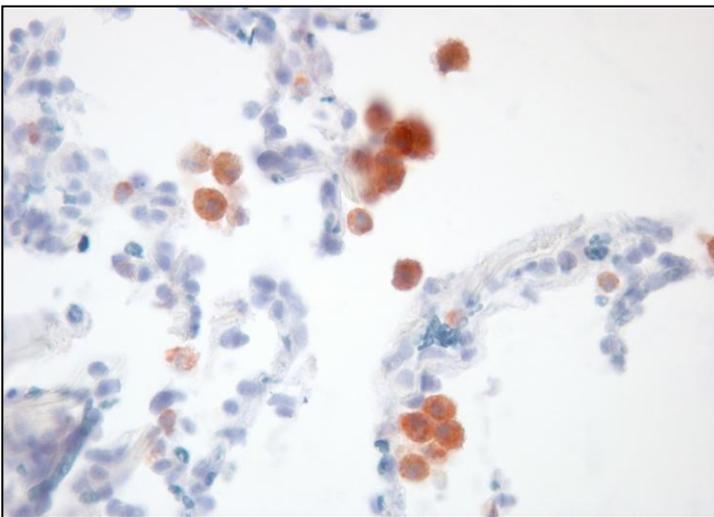


Abb. 21b)
Basale TLR2-Expression im
unstimulierten Lungengewebe
(Medium-Kontrolle, 400x)

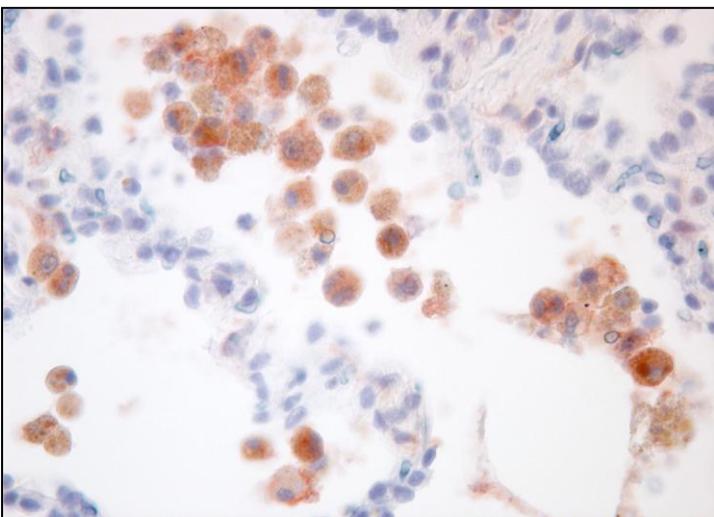


Abb. 21c)
Steigerung der TLR2-Expression
nach 2h Infektion mit Cpn
 $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (400x)

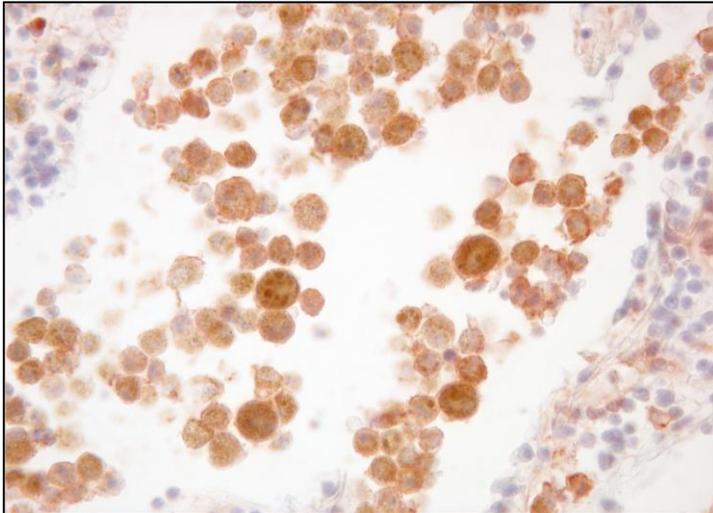


Abb. 21d)
 Weitere Verstärkung der TLR2-
 Expression durch 2h Infektion mit
 NTHi 10^7 cfu/ml nach 48h
 Vorinkubation mit $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml
 Cpn (400x)

3.5 Bedeutung von MAP-Kinasen für die intrazelluläre Signaltransduktion nach Infektion mit NTHi

Proteinsynthese in Alveolarepithelzellen bei Koinfektion nach Vorinkubation mit Cpn

Da die Signaltransduktion von TLR2 zumindest teilweise über die Proteinkinase phospho p44/42 (=ERK1/2, *extracellular receptor kinase*) vermittelt wird, untersuchten wir die intrazelluläre ERK1/2-Expression mittels Western Blot.

Wie in Abb. 22 zu erkennen, wird nach Stimulation mit Cpn und NTHi vermehrt phospho p44/42 intrazellulär exprimiert. In der Negativkontrolle (Medium) zeigt sich nach 30min noch keine phospho p44/42-Expression, wohl aber nach 2h. Cpn aktiviert bereits nach 30min den Signalweg und führt zu einer vermehrten phospho p44/42-Expression, allerdings wird die Expression durch die Koinfektion mit der höheren NTHi-Dosis (10^7 cfu/ml) nochmal deutlich gesteigert. Nach 2h führt die Koinfektion zu einer geringeren ERK1/2-Expression als nach 30min, was für eine Bedeutung der Proteinkinasen in der sehr frühen Phase der NTHi-Infektion spricht.

Die Koinfektion mit Cpn und der niedrigeren Dosis von NTHi (10^6 cfu/ml) scheint keine nennenswerte Steigerung der phospho p44/42-Expression im Gegensatz zur Cpn-Monoinfektion zu bewirken.

Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen untersucht, zur Kontrolle gleicher Proteinmengen in allen Proben erfolgte ein Nachweis von β -Aktin.

Abb. 22a und b) Veränderungen der Proteinsynthese für phospho p44/42 (ERK1/2) in Alveolarepithelzellen bei Koinfektion mit NTHi nach Vorinkubation mit Cpn (repräsentative Blots, n=2)

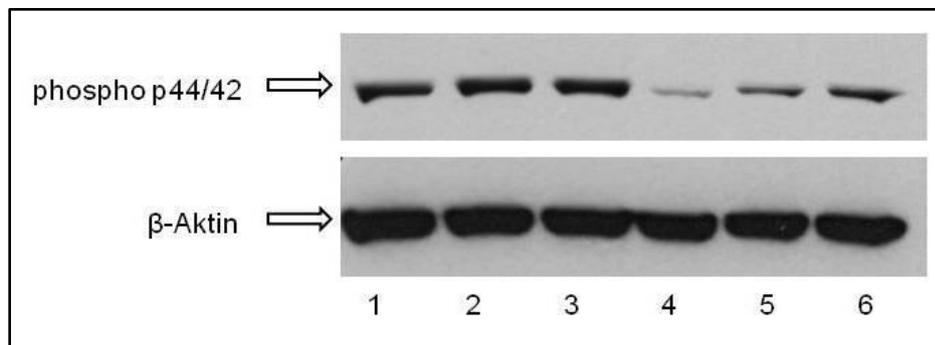


Abb. 22a)

1= Med (30min), 2= Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (30min), 3= Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml (30min), 4= Med (2h), 5= Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (2h), 6= Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml (2h)

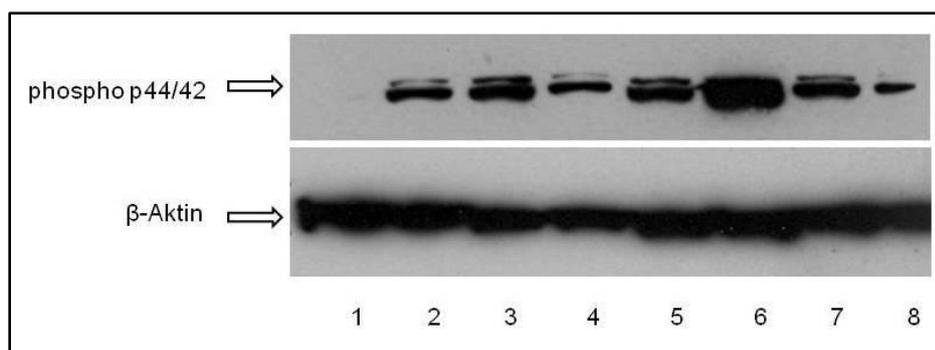


Abb. 22b)

1= Med (30min), 2= Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (30min), 3= Cpn+NTHi 10^7 cfu/ml (30min), 4= Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml (30min), 5= Med (2h), 6= Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (2h), 7= Cpn+NTHi 10^7 cfu/ml (2h), 8= Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml (2h)

Aus früheren Daten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass auch eine Signaltransduktion via phospho p38 erfolgt [101] und dass somit die MAP-Kinasen einen wesentlichen Mechanismus der Cpn- und vor allem der NTHi-vermittelten Signaltransduktion darstellen.

Proteinexpression in Alveolarepithelzellen nach Inhibition der ERK1/2-Kinase

Um zu zeigen, dass die IL-8-Produktion durch den spezifischen ERK1/2-Inhibitor UO126 reduziert werden kann, wurden die Zellen eine Stunde vor Infektion mit Cpn mit UO126 $10 \mu\text{M}$ (Firma Calbiochem) vorinkubiert. Nach 48h Inkubation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml wurde

NTHi 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml zugegeben. Nach 0,5h und 2h wurden die Zellen sowie nach 24h die Überstände für Western Blot und ELISA gesammelt.

In den Western Blots sieht man bei gleicher Proteinmenge in den unterschiedlich stimulierten Zellen zunächst eine Steigerung der ERK1/2-Expression durch die Koinfektion (Abb. 23, jeweils Bande 3) und gleichzeitig eine deutliche Inhibition durch die Vorinkubation mit UO126, was die Bedeutung des ERK1/2-Kinase-Signalweges für die Koinfektion verdeutlicht.

Abb. 23a und b) Veränderungen der ERK1/2-Expression in Alveolarepithelzellen bei Koinfektion mit NTHi und Cpn nach Inhibition mit UO126 (repräsentative Blots, n=2)

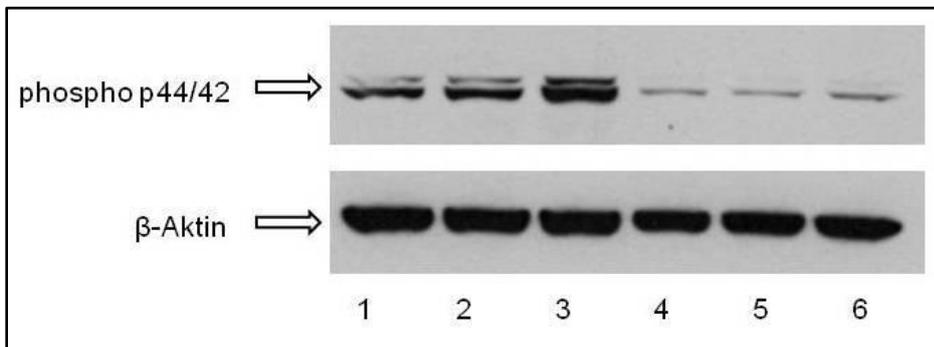


Abb. 23a)

1= Med (2h), 2= Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (2h), 3= Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml (2h), 4= UO126+Med (2h), 5= UO126+Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (2h), 6= UO126+Cpn+NTHi 10^6 cfu/ml (2h)

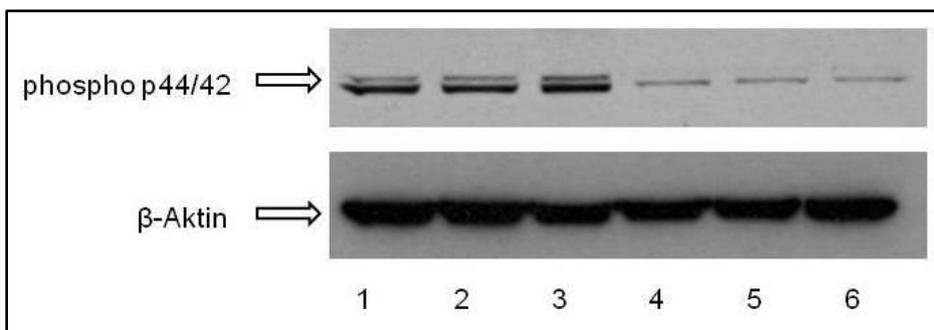


Abb. 23b)

1= Med (30min), 2= Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (30min), 3= Cpn+NTHi 10^7 cfu/ml (30min), 4= UO126+Med (30min), 5= UO126+Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (30min), 6= UO126+Cpn+NTHi 10^7 cfu/ml (30min)

Zytokinsekretion von Alveolarepithelzellen nach Inhibition der ERK1/2-Kinase

Da die intrazelluläre Expression der ERK1/2-Kinase durch UO126 reduziert werden konnte, soll im Folgenden gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibition der ERK1/2-Kinase auch zu einer Reduktion der IL-8-Sekretion der Zellen führt.

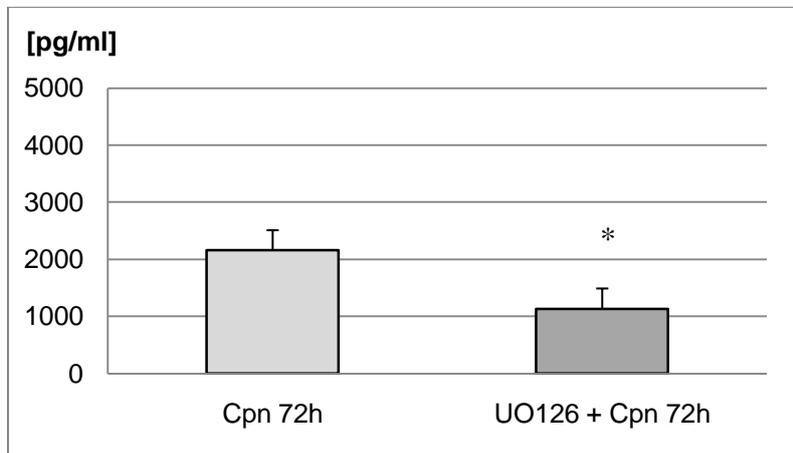


Abb. 24a)
IL-8-Sekretion in Alveolarepithelzellen nach 60-minütiger Inhibition der Cpn-Signaltransduktion mit dem spezifischen ERK1/2-Inhibitor UO126 bei 48h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml (* $p < 0,05$, $n=3$)

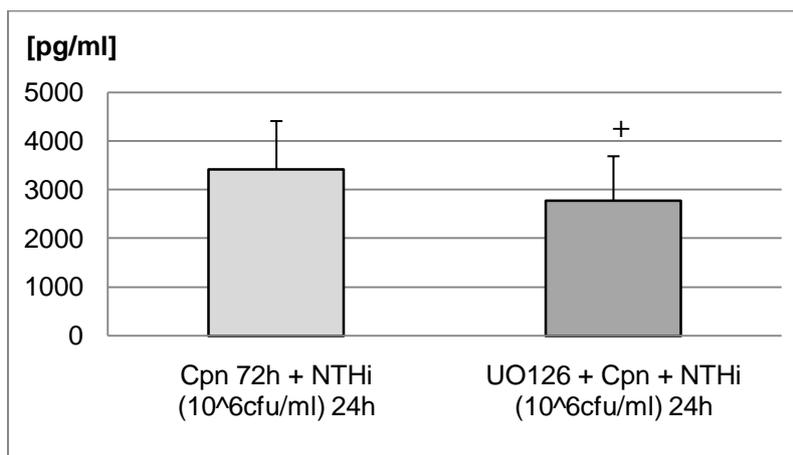


Abb. 24b)
IL-8-Sekretion in Alveolarepithelzellen nach 60-minütiger Inhibition der Cpn-Signaltransduktion mit UO126 bei 48h Vorstimulation mit Cpn $0,5 \cdot 10^6$ ifu/ml und 24h Koinkubation mit NTHi 10^6 cfu/ml (+ $p=0,131$, $n=2$)

Wie in Abb. 24 dargestellt, führt eine Vorinkubation der Zellen mit dem spezifischen ERK1/2-Inhibitor UO126 zu einer Inhibition des ERK1/2-Signalweges und einer reduzierten IL-8-Produktion. Nach Stimulation mit Cpn wurde die IL-8-Sekretion durch UO126 um etwa 50% reduziert (Cpn $2155,67 \pm 352,02$ pg/ml, Cpn+UO126 $771,67 \pm 99,19$ pg/ml, $n=3$, $p < 0,05$). Die IL-8-Sekretion nach Koinfektion von Cpn und NTHi kann um 20% bei Stimulation mit NTHi 10^6 cfu/ml reduziert werden (Ergebnisse bei $n=2$ nicht signifikant).

4 Diskussion

Zielsetzung der Arbeit war es, die inflammatorischen und antiinflammatorischen Effekte bakterieller Pathogene im humanen Respirationstrakt zu untersuchen. Insbesondere bei der COPD als chronisch entzündlicher Erkrankung ist ein Gleichgewicht von Inflammation und Antiinflammation wichtig für die Erhaltung eines funktionsfähigen Lungenparenchyms. Dennoch kommt es im Rahmen der meistens bakteriell getriggerten Exazerbationen zu einer akuten Verstärkung der Entzündungsreaktionen mit der Gefahr einer irreparablen Gewebeerstörung. Relevante Pathogene sind dabei *nontypeable Haemophilus influenzae* (NTHi), das am häufigsten isolierte Pathogen bei Infektexazerbationen der COPD, sowie *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) als atypisches Pathogen, das gehäuft bei Koinfektionen mit NTHi vorkommt. Die Fragestellung bestand darin, mögliche Effekte von NTHi auf die pulmonalen Zielzellen zu untersuchen und zu klären, inwiefern eine Kostimulation mit Cpn die Effekte der NTHi-Infektion moduliert.

4.1 Pulmonale Zielzellen der frühen Phase respiratorischer Infektionen mit NTHi

Für die beiden respiratorischen Pathogene Cpn und NTHi konnte bisher in mehreren Studien gezeigt werden, dass beide Pathogene inflammatorische Reaktionen in Epithelzellen und Makrophagen des Respirationstraktes hervorrufen können [21;43;46;67;102].

Khair et al. beschreiben, dass humane Bronchialepithelzellen auf eine Stimulation mit NTHi-LPS mit einer Sekretion von IL-6 und IL-8 reagieren [49], was wir für die Stimulation von Alveolarepithelzellen (AEZ) mit intaktem NTHi reproduzieren konnten.

Die Stimulation durch NTHi scheint, im Gegensatz zur zwingend intrazellulären Lokalisation von Cpn, sowohl extrazellulär als auch intrazellulär zu erfolgen. Eine Interaktion von NTHi mit dem membranständigen Toll like-Rezeptor 2 (TLR2) spricht eher für eine extrazelluläre Lokalisation [56], während andere Arbeiten von einer Internalisierung des Erregers berichten [47]. Betrachtet man die Ergebnisse der NTHi-vermittelten Inflammation in unseren verschiedenen Zellpopulationen, so fällt auf, dass die *Monocyte-derived Macrophages* (MDM) als Modell für Alveolarmakrophagen deutlich höhere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine produzieren als die Alveolarepithelzellen bei vergleichbarer Zellzahl. Durch die massive Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine,

einschließlich TNF- α und IL-8, sind Alveolarmakrophagen (AM) die wichtigste zelluläre Quelle chemotaktischer Faktoren für Leukozyten und haben das Ziel, einen chemotaktischen Gradienten zum Ort der Entzündung aufzubauen und damit weitere Abwehrzellen anzulocken. In unseren *in situ*-Hybridisierungen im humanen Lungengewebe konnten wir außerdem nachweisen, dass in der akuten Phase der Inflammation, die wir durch unser *in vitro*-Modell abbilden, die Alveolarmakrophagen zu einem deutlich höheren Anteil mit NTHi infiziert sind als die Alveolarepithelzellen (AEZ 10-20%, AM 55-75%), was mit Daten von Drömann et al. übereinstimmt [27].

Insgesamt scheinen also die Alveolarmakrophagen die entscheidenden pulmonalen Ziel- und Effektorzellen für die frühe Phase der NTHi-Infektion zu sein.

4.2 Veränderungen der Zytokinexpression im humanen Lungengewebe nach Infektion mit NTHi

Eine Infektion von humanem Lungengewebe mit NTHi führt sowohl zu proinflammatorischen als auch zu antiinflammatorischen Reaktionen.

Nach *in vitro*-Stimulation mit NTHi über 24h kommt es im humanen Lungengewebe zu einer veränderten Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine, darunter IL-8 und TNF- α als proinflammatorische Mediatoren und TGF- β als Mediator der antiinflammatorischen Reaktion. Es zeigt sich, dass in der akuten Phase der NTHi-Infektion die proinflammatorischen Zytokine deutlich überwiegen, während die Sekretion des antiinflammatorisch wirksamen TGF- β eher inhibiert wird und es somit indirekt zu einer zusätzlichen Verstärkung der proinflammatorischen Effekte kommt.

Wie in vielen Modellen bereits gezeigt werden konnte, führt eine akute Infektion mit NTHi zur vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine [11;35;56;98], was auch in unserem Infektionsmodell bestehend aus Alveolarepithelzellen, MDM und humanem Lungengewebe bestätigt wird. In allen *in vitro*-Stimulationsversuchen zeigt sich ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- α , die durch Neutrophilen-Chemotaxis oder Aktivierung von NF- κ B *in vivo* weitere Entzündungszellen rekrutieren und zusätzliche Signalkaskaden für die Expression proinflammatorischer Mediatoren aktivieren.

Die Veränderung der *Transforming growth factor* (TGF)- β -Expression nach Infektion mit NTHi beeinflusst Reparatur- und Umbauprozesse im Lungengewebe. Von Versuchen mit Bronchialepithelzellen ist beschrieben, dass es durch eine erhöhte TGF- β -Expression zu einer

Umwandlung epithelialer Zellen in mesenchymale Zellen und schließlich zur Fibrose kommt [23]. In der ersten Phase der TGF- β -Stimulation kommt es bei den Epithelzellen zu einem Verlust der *tight junctions* und somit zu einem Verlust der Integrität der Epitheloberfläche. Eine gestörte Barrierefunktion des Epithels kann wiederum chronische Infektionen, z.B. persistierende Infektionen mit NTHi bei Patienten mit COPD, begünstigen [62].

Nach Infektion mit NTHi kommt es durch die Induktion des TGF- β /Smad-Signalweges und die Überexpression proinflammatorischer Zytokine zu einer Aktivierung profibrotischer Gene und zum Beginn fibrotischer Umbauprozesse. Diese sind im weiteren Verlauf von einer persistierenden Induktion des TGF- β /Smad-Signalweges abhängig, und weniger von der initialen Aktivierung inflammatorischer Zytokine wie TNF- α [14], was wiederum die Bedeutung persistierender Infektionen im humanen Lungengewebe unterstreicht. Das Fehlen eines intakten TGF- β /Smad-Signalweges schützt das Gewebe zwar vor fibrotischem Umbau, führt allerdings in der Folge zur Bildung vergrößerter Alveolarräume im Sinne einer Emphysementwicklung [36].

Dass dieser Mechanismus der Emphysementwicklung nach NTHi-Infektion in der humanen Lunge eine Rolle spielen könnte, zeichnet sich auch in den vorliegenden Ergebnissen ab. Bei Messung der TGF- β -Konzentration im Überstand von Lungengewebe, das 24h mit NTHi stimuliert worden ist, sehen wir trotz initial massiv erhöhter Sekretion proinflammatorischer Zytokine eine deutlich verminderte Proteinexpression von TGF- β , die bisher nicht beschrieben war. Weitere Versuche, im humanen Lungengewebe andere Proteine der TGF- β -Signalkaskade nachzuweisen, zeigen eine unveränderte mRNA-Expression für die Smad-Proteine und die TGF- β -Rezeptoren I und II (TGF- β -RI und -RII). Erstaunlich ist allerdings, dass es auf mRNA-Ebene nach NTHi-Infektion zu einer deutlich vermehrten Expression von TGF- β -mRNA kommt. Dies steht im Gegensatz zur verminderten TGF- β -Proteinexpression, sodass ein posttranslationeller Mechanismus zu einer verminderten Proteinexpression führen muss. Passend dazu ist eine massiv verstärkte mRNA-Expression des TGF- β -Pseudorezeptors BAMBI (*Bone morphogenetic protein and Activin membrane bound inhibitor*) nachweisbar. Dieser bildet durch Homologie mit dem TGF- β -RI ein Heterodimer mit dem TGF- β -RII, das TGF- β bindet und damit die Proteinexpression reduziert, aber durch die fehlende intrazelluläre Kinase-Domäne auch eine Signaltransduktion ins Zellinnere verhindert und somit die Eigenschaften von TGF- β inhibiert [27]. Da TGF- β für die Gewebereparatur von essentieller Bedeutung ist, führt eine reduzierte TGF- β -Expression einerseits zu eingeschränkten Reparaturmöglichkeiten des Gewebes, andererseits werden negative Folgen einer TGF- β -Expression wie Fibroseinduktion verhindert. Problematisch ist allerdings, dass

es bei verminderter TGF- β -Expression durch eine überschießende Aktivierung Matrix-degradierender Proteasen (Matrix-Metalloproteinasen, MMP) langfristig zu einer Parenchymzerstörung und Emphyseentwicklung kommen kann. Durch Drömann et al. gelang bei 38% der untersuchten, symptomfreien COPD-Patienten (n=40) der Nachweis von NTHi-DNA im Sinne einer persistierenden NTHi-Infektion, im Kontrollkollektiv von Patienten ohne COPD konnte keine NTHi-DNA nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die NTHi-induzierte Emphyseentwicklung aufgrund der verminderten TGF- β -Expression durch eine vermehrte Bindung von TGF- β an den stark exprimierten TGF- β -Pseudorezeptor BAMBI insbesondere bei Patienten mit COPD ein wesentlicher Pathomechanismus der Gewebedestruktion ist.

4.3 Modulation der Entzündungsreaktion auf NTHi durch atypische Pathogene

In den epidemiologischen Daten mikrobiologisch untersuchter Patientenproben macht NTHi mit 45% den größten Anteil der nachgewiesenen respiratorischen Infektionen aus, gefolgt von *Streptococcus pneumoniae* mit 28%. In Bezug auf die Koinfektionen bildet NTHi mit einem Anteil von 38% auch dort den größten Anteil, gefolgt von *Streptococcus pneumoniae* mit 36%. Auf die Koinfektionen mit Cpn bezogen bildet NTHi zusammen mit *Streptococcus pneumoniae* ebenfalls den größten Anteil (je 43%). Etwa 9,5% der respiratorischen Infektionen treten als Koinfektionen auf, davon die meisten mit NTHi. Koinfektionen mit Cpn kommen in etwa 6,6% der Fälle vor, meistens mit NTHi oder *Streptococcus pneumoniae* als Erreger der Sekundärinfektion. Ähnliche Daten konnten von Erkan et al. in einer klinischen Studie gezeigt werden, hierbei gelang der Nachweis von NTHi in Sputum und Serologie in 23/75 Patienten (31%) und von Cpn in 13/75 Patienten (17%), wobei von den 13 Cpn-Infektionen fünf als Koinfektion mit NTHi auftraten [28]. Dies zeigt die Bedeutung der Koinfektion mit Cpn und NTHi *in vivo* und stellt den Hintergrund für unsere Untersuchungen im humanen Lungenmodell dar.

NTHi induziert eine verstärkte Genexpression für IL-6, IL-8 [49] und MCP-1 in Epithelzellen über Lipooligosaccharide (LOS) [21], NTHi-LPS [11], oder Lipopeptide [95].

Auch Cpn kann in Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen [37] replizieren und führt dort zu proinflammatorischen Reaktionen mit Freisetzung von IL-8 [69;71;72;95;102]. Auch für MDM konnte gezeigt werden, dass sie durch Cpn infiziert werden können [1;37].

Alveolarepithelzellen und MDM sind daher ein wesentlicher Bestandteil des Infektionsmodells, um die Effekte der Mono- und Koinfektion von Cpn und NTHi an definierten Zellpopulationen zu untersuchen und die Entzündungsreaktion im humanen Lungengewebe besser verstehen zu können. Sowohl in den Alveolarepithelzellen als auch in den MDM führen unsere Stimulationsversuche mit Cpn und NTHi zu einer deutlich vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, MCP-1 und IL-6.

In den Alveolarepithelzellen zeigt sich dabei ein homogenes Inflammationsmuster mit gleichsinniger Reaktion aller drei Zytokine, wobei IL-8 und MCP-1 am stärksten induziert werden. Dabei verstärkt die Koinfektion von Cpn und NTHi die Zytokinexpression signifikant gegenüber der NTHi-Monoinfektion, sodass hier eine deutliche Modulation der NTHi-Infektion durch eine Vorstimulation mit Cpn zu erkennen ist.

Bei Betrachtung der MDM-Ergebnisse fallen zum Teil große Unterschiede in der Zytokinexpression auf. Diese begründen sich durch die Heterogenität der Spender der *Buffy Coats*, aus denen die MDM gewonnen werden. Dadurch unterscheiden sich die MDM deutlich von einer homogenen Zelllinie wie den A549-Zellen. Die interindividuelle Variabilität zwischen den verschiedenen Spendern erklärt sich möglicherweise durch genetische Polymorphismen. So ist beispielsweise für TLR4 ein genetischer Polymorphismus beschrieben, der trotz normaler intrazellulärer TLR4-Konzentration eine Translokation des Rezeptors an die Zelloberfläche verhindert und so zu einer reduzierten Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-8 und TNF- α führt [92]. Ein derartiger Mechanismus ist auch für TLR2 denkbar, allerdings noch nicht beschrieben. Danis et al. beschreiben eine interindividuelle Variabilität in der Expression von Zytokinen wie TNF- α oder IL-6 nach Stimulation von Monozyten mit GM-CSF und vermuten als Grund dafür ebenfalls Polymorphismen bestimmter Genregionen, die für die Zytokinexpression verantwortlich sind, da bei intraindividuellen Vergleichen nach *in vitro*-Stimulation reproduzierbare Zytokinkonzentrationen gemessen werden können [22]. Auch dies könnte ein Grund für die divergenten MDM-Ergebnisse sein.

Unsere Daten bestätigen, dass Cpn sowohl Pneumozyten Typ II (in unserem Modell A549-Zellen als Alveolarepithelzellen) als auch AM (in unserem Modell MDM) in der Zellkultur infizieren kann. Dabei muss natürlich berücksichtigt werden, dass Zelllinien und mit Hilfe von Wachstumsfaktoren generierte Zellen nicht das Zytokinprofil aufweisen, das von primären humanen Zellen produziert wird. Aber zur Abschätzung inflammatorischer Reaktionen auf häufige respiratorische Pathogene sind sicherlich auch Zelllinien oder

Modelle wie MDM ausreichend. Außerdem lassen sich die in den Zelllinien und -modellen erhobenen Daten jeweils im humanen Lungengewebe bestätigen.

So lässt sich im humanen Lungengewebe auch *in vitro* eine Infektion mit Cpn nachweisen, was Daten von Drömann et al. ergänzt, nach denen bereits *ex vivo* ein Cpn-Nachweis im Lungengewebe von COPD-Patienten möglich war [26].

Weiter zeigen die Messungen der Zytokinkonzentrationen aus den Zellkulturen deutliche inflammatorische Reaktionen auf eine Monoinfektion mit Cpn, die sich nach *in vitro*-Infektion im Lungengewebe bestätigen. Bei der akuten Cpn-Infektion zeigt sich ein massiver Anstieg der Produktion inflammatorischer Zytokine verglichen mit unstimuliertem Lungengewebe. Im Zeitverlauf nimmt die inflammatorische Zytokinproduktion wieder ab, bleibt aber weiterhin über der Zytokinproduktion im unstimulierten Gewebe.

Da bekannt ist, dass NTHi eine vermehrte Expression von IL-6, IL-8 und MCP-1 im Lungengewebe induziert [21], wiesen wir IL-6, IL-8 und MCP-1 in den Überständen von humanem Lungengewebe nach und stellten IL-8 zusätzlich mittels *in situ*-Hybridisierung dar. Dabei sehen wir nach 24h Vorstimulation mit Cpn im Lungengewebe sowie nach 48h Vorstimulation in den Zellkulturen einen signifikanten Anstieg der IL-8-Sekretion durch die Koinfektion verglichen mit dem Effekt der Monoinfektionen. Bezogen auf die absolute Zytokinkonzentration sieht man für die IL-8-Sekretion insgesamt einen additiven Effekt durch die Koinfektion von Cpn und NTHi, und auch die intrazelluläre IL-8-Expression zeigt eine entsprechende Kinetik. Auch die anderen Zytokine, MCP-1 und IL-6, werden als Reaktion auf die Koinfektion deutlich vermehrt exprimiert.

Akute Infektionen, z.B. mit NTHi, können bei chronischer Bronchitis oder COPD im vorgeschädigten Lungengewebe zu einer Exazerbation der Erkrankung führen [19;99]. Bei Patienten mit COPD sind neben der chronischen Abnahme der Lungenfunktion vor allem Perioden infektgetriggelter Exazerbationen problematisch, die zusätzlich zu einer akuten Verschlechterung der Lungenfunktion charakterisiert sind durch verstärkte Dyspnoe, Husten und die Produktion eines purulenten Sputums [58].

Insbesondere wenn eine Primärinfektion nicht suffizient behandelt werden kann und der erstbesiedelnde Erreger in die Persistenz übergeht, ist einer Super- oder Koinfektion die Bahn gebnet. Dies wird zum einen durch bestimmte Eigenschaften der Erreger begünstigt, z.B. die intrazelluläre Persistenz von Cpn, zum anderen aber auch durch Faktoren, die eine antibiotische Therapie nicht ausreichend wirksam werden lassen, z.B. die Wahl des falschen Antibiotikums, die Verabreichung suboptimaler Wirkstoffkonzentrationen, zu lange Pausen

zwischen den einzelnen Einnahmezeitpunkten oder mangelnde Patientencompliance bei der Einnahme [9].

Bei 78% der Exazerbationen können bakterielle oder virale Infektionen nachgewiesen werden [12;65]. Infektiös bedingte Exazerbationen sind mit längeren Krankenhausaufenthalten und schwereren Einschränkungen der Lungenfunktion verbunden als nicht-infektiöse Exazerbationen. Bei den Infektexazerbationen zeigen wiederum jene mit viral-bakteriellen Koinfektionen einen schwereren Verlauf als Monoinfektionen. Auch eine akute Cpn-Infektion kann zu einer Exazerbation der COPD führen. Chronische Cpn-Infektionen können dagegen bei einem Großteil symptomloser Patienten mit COPD nachgewiesen werden und kommen häufig als Koinfektionen mit anderen Bakterien vor [80].

Der untere Respirationstrakt wird von verschiedenen Pathogenen kolonisiert, wie Studien mit Patienten mit chronischer Bronchitis und COPD zeigen [8;62]. Dabei ist NTHi bei Infektexazerbationen von Patienten mit chronischer Bronchitis das am häufigsten aus dem unteren Respirationstrakt isolierte Pathogen [7;42]. Die Fähigkeit dieses Erregers, starke Atemwegsentzündungen hervorzurufen, und die Assoziation von Exazerbationen mit der Entwicklung einer humoralen Immunantwort bei einer Erstinfektion mit NTHi unterstreicht die potenzielle Rolle von NTHi in der Pathogenese der COPD-Exazerbationen [58]. Auf neue NTHi-Stämme reagiert das Immunsystem stets mit einer spezifischen Immunantwort [82], was eine individuelle Anfälligkeit für Infektionen mit anderen Stämmen und damit rezidivierende NTHi-Infektionen bei COPD-Patienten erklärt [61].

Zunächst wurde die Verantwortlichkeit von NTHi bei der Entstehung von Exazerbationen kontrovers diskutiert, da es schien, als seien NTHi-Stämme, die permanent die Lunge kolonisierten, der Grund für Exazerbationen [55]. Murphy und Sethi zeigten allerdings, dass eine Exazerbation durch NTHi generell mit der Akquirierung neuer Stämme einhergeht [62;79]. Bei der Frage nach der Pathogenese einer Exazerbation ist zu berücksichtigen, dass eine negative Sputumkultur nicht immer mit einer fehlenden bakteriellen Besiedelung gleichzusetzen ist und dass weitere Hinweise wie radiologische Kriterien, Entzündungsmarker, Sputumpurulenz etc. in die Entscheidung infektiöse vs. nicht-infektiöse Exazerbation mit einbezogen werden müssen [55]. In einer 2004 von Murphy et al. veröffentlichten Studie zeigte sich, dass eine Persistenz von NTHi vorliegen kann, obwohl die entnommenen Sputumkulturen negativ sind [62]. Auch in Phasen negativer Sputumkulturen konnte aus den Sputumproben durch molekulargenetische Verfahren NTHi-DNA bei COPD-Patienten nachgewiesen werden. Dies mag daran liegen, dass NTHi Biofilme bildet, aus denen er sich kulturell schlecht nachweisen lässt, oder daran, dass NTHi dazu in der Lage ist,

intrazellulär zu überleben und sich dort dem Zugriff durch das Immunsystem sowie einem Nachweis durch kulturelle Anzucht zu entziehen.

Die Bedeutung der Koinfektion für die Pathogenese von Exazerbationen ist noch nicht ganz klar. Fest steht, dass virale und bakterielle Infektionen häufig bei Patienten mit COPD gefunden werden [65] und dass dies die Wahrscheinlichkeit für Koinfektionen und für Exazerbationen erhöht [68]. Neben bakteriellen Koinfektionen spielen auch die gemischt bakteriell-viralen Koinfektionen eine Rolle bei Exazerbationen einer COPD. So sind laut Sajjan et al. 27-56% aller Exazerbationen mit viralen respiratorischen Infektionen assoziiert [74]. Ob unsere Ergebnisse auch für viral-bakterielle Koinfektionen gelten, wird weiter zu untersuchen sein.

Bei der Koinfektion von Cpn und NTHi werden die gleichen Zytokine verstärkt ausgeschüttet, die für beide Einzelinfektionen beschrieben sind. Sowohl in Alveolarepithelzellen als auch in Alveolarmakrophagen zeigt IL-8 die größten Konzentrationsanstiege im Überstand. Bei den Alveolarepithelzellen zeigen die unstimulierten Kontrollzellen eine geringe basale IL-8-Sekretion, die durch die Koinfektion mit Cpn und NTHi signifikant gesteigert werden kann. Unstimulierte Alveolarmakrophagen hingegen zeigen eine noch geringere basale IL-8-Sekretion, aber ebenfalls eine deutliche Stimulierbarkeit als Reaktion auf die Koinfektion. MCP-1 zeigt von den Absolutwerten geringere Konzentrationen als IL-8, aber die Relationen zwischen den verschiedenen Stimulationen sind mit denen bei IL-8 vergleichbar und man findet ebenso signifikante Ergebnisse für die Koinfektion. IL-6 ist wie TNF- α ein proinflammatorisches Zytokin und wird eher von Alveolarmakrophagen als von Alveolarepithelzellen produziert, was wir in unseren Versuchen bestätigen konnten. In den Zellkulturüberständen von Alveolarepithelzellen liegen die IL-6-Konzentrationen oft unterhalb der Nachweisgrenze und nur eine lange Stimulationsdauer oder die Koinfektion mit beiden Erregern kann zu einer messbaren IL-6-Produktion führen. Bei den MDM ist die IL-6-Produktion etwa 100-fach höher und zeigt eine pathogenabhängige Induktion. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Unterschiede zwischen der IL-6- und IL-8-Produktion sind bereits von Khair et al. beschrieben worden, die zwei verschiedene Konzentrationen des LOS von NTHi für die Stimulation von humanen Bronchialepithelzellen verwendet haben. Während die IL-8-Produktion durch beide Konzentrationen gesteigert werden konnte, wurden signifikante Anstiege der IL-6-Produktion nur bei hohen LOS-Konzentrationen beobachtet [48]. Unsere Ergebnisse stimmen auch mit Beobachtungen von Yang et al. überein, die zeigen, dass bei

Alveolarepithelzellen die Proteinexpression von IL-6 im Überstand durch eine Monoinfektion mit Cpn nicht signifikant verändert wird [102].

Zusätzlich zur Messung der Zytokine im Überstand haben wir IL-8 intrazellulär im Lungengewebe mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Auch hier zeigt sich eine deutliche Stimulation der IL-8-Produktion nach Infektion mit Cpn, die durch die Koinfektion mit NTHi weiter gesteigert wird. Während der gesamten Stimulationsdauer ist das Lungengewebe, gemessen an der LDH-Freisetzung im Überstand, auch bei der Koinfektion so vital, dass die Zytokinreaktionen, die wir nachweisen konnten, als eine Reaktion auf unsere *in vitro*-Infektion zu deuten sind.

Die Zytokinproduktion von Alveolarepithelzellen, Alveolarmakrophagen und humanem Lungengewebe steigt signifikant an, wenn man die Koinfektion mit der NTHi-Monoinfektion vergleicht. Somit entsprechen sowohl das sekretorische als auch das intrazelluläre Muster der Zytokinexpression unserer Hypothese von einer verstärkten Inflammation durch die Koinfektion von Cpn und NTHi im humanen Lungengewebe.

Da chronische Cpn-Infektionen inflammatorische Reaktionen induzieren und die Proteinexpression der Zielzelle verändern, war unsere Hypothese, dass diese Veränderung, z.B. in Form einer veränderten Rezeptorexpression, NTHi einen leichteren Zugang zur Zielzelle verschafft. Wie man weiß, kann NTHi in Epithelzellen eindringen, was durch eine Vorschädigung der Zelle durch ein erstinfizierendes Pathogen begünstigt wird [45;47;80;99]. Bei Betrachtung der Zytokinkonzentration abhängig vom Vorliegen einer COPD sieht man eine ähnliche basale IL-8-Produktion im Lungengewebe von Patienten mit und ohne COPD. Unter beiden Bedingungen zeigt sich ein Anstieg der IL-8-Produktion als Reaktion auf eine Cpn-Infektion, der durch die Koinfektion mit NTHi verstärkt wird. Ein signifikanter Anstieg der IL-8-Produktion kann aber nur im Lungengewebe von Patienten ohne COPD gefunden werden. Dies zeigt, dass gesundes Lungengewebe auf Infektionen mit einer stärkeren inflammatorischen Reaktion antworten kann, sodass Lungengewebe, das nicht auf dem Boden einer COPD vorgeschädigt ist, eine effektivere Immunantwort entwickelt als vorgeschädigtes Lungengewebe. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Berenson et al., nach denen Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten eine abgeschwächte Immunantwort auf eine Stimulation mit NTHi zeigen, gemessen an IL-8 und TNF- α [12] und ist möglicherweise zu begründen mit der verminderten TLR2-Expression auf Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten, die Droemann et al. beschrieben haben [25].

4.4 Bedeutung von Toll like-Rezeptoren und MAP-Kinasen für Erregererkennung, Signaltransduktion und Inflammation – Ein Pathomechanismus für die Koinfektion

Krüll et al. beschreiben in Studien mit Endothelzellen die intrazelluläre Signalkaskade, die durch Cpn aktiviert wird. Die Signaltransduktion von Cpn basiert dabei unter anderem auf einer vermehrten Expression von phosphorylierter p44/p42 MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase (phospho p44/42) sowie einer NF- κ B-Aktivierung und -Translokation [51]. Gegenstand unserer Untersuchung waren dabei die Kinasen. Jahn et al. beschreiben einen dosis- und zeitabhängigen Effekt der Stimulation mit Cpn auf die IL-8-Produktion in Bronchialepithelzellen [46], was in unseren Versuchen auch für Alveolarepithelzellen reproduziert werden konnte. Krüll et al. konnten zeigen, dass Cpn die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 (=ERK1/2, *extracellular receptor kinase*) und p38 in humanen Endothelzellen induziert und dass die p38- und ERK1/2-Aktivität wesentlich zur Cpn-vermittelten Sekretion von IL-8 beiträgt [52].

Nach der Hypothese von Wang et al. wird der p38-MAPK-Signalweg für die NTHi-induzierte IL-8-Produktion benötigt. Die extrazelluläre Rezeptorbindung von NTHi führt demnach zu einer Aktivierung von NF- κ B und zu einer veränderten Proteinexpression wie vermehrter IL-8-Produktion [85;95]. Für den Effekt von NTHi auf die Zielzelle gibt es aber mehrere intrazelluläre Signalwege [56]. Zum einen kommt es durch die MAP-Kinase-vermittelte Aktivierung von NF- κ B zur vermehrten Expression von IL-8, TNF- α und TLR2. Zum anderen führt aber auch der TGF- β -Smad-Signalweg über NF- κ B zu einer vermehrten Expression von TLR2 und somit zur Verstärkung proinflammatorischer Effekte. Demnach scheint die Signaltransduktion von MAP-Kinasen und TLR2 eng miteinander verbunden zu sein.

In unseren Versuchen reduziert die Inhibition mit UO126, dem spezifischen Inhibitor der ERK1/2-Kinase, die Zytokinproduktion in Alveolarepithelzellen um etwa 50% und führt zu einer deutlich verringerten Proteinexpression von phospho p44/42. Unsere Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen aus HUVEC-Zellen überein, die ebenfalls mit Cpn stimuliert wurden und IL-8-Konzentrationen zeigten, die auch durch UO126 um etwa 50% reduziert werden konnten [52]. Es ist also davon auszugehen, dass die intrazelluläre Signaltransduktion von Cpn zumindest teilweise über die ERK1/2-Kinase vermittelt wird und es darüber zu einer Regulation der Zytokinproduktion kommt.

Im Modell der akuten Infektion im humanen Lungengewebe, das von Rupp et al. [71] etabliert wurde, wurde Cpn nach 48h in etwa 30% der Alveolarmakrophagen und nur in etwa 5% der Alveolarepithelzellen gefunden, sodass Alveolarmakrophagen die primären Wirtszellen für die akute Cpn-Infektion zu sein scheinen, während im Lungengewebe von Patienten mit persistierender Cpn-Infektion bei COPD sowohl Alveolarmakrophagen als auch Alveolarepithelzellen mit Cpn infiziert waren.

Wir gehen also davon aus, dass Cpn bei entsprechend langer Inkubationsdauer zu gleichen Teilen die beiden relevanten Zellpopulationen des humanen Lungengewebes infiziert, sodass eine gleichmäßige Vorstimulation der Zellen erfolgt. Auf dieser Basis beobachteten wir die Phänomene der NTHi-Infektion mit und ohne Vorstimulation durch Cpn. Im Modell der akuten Infektion im humanen Lungengewebe sind die Alveolarepithelzellen die Zielzellen für eine chronische Infektion mit Cpn, nicht aber für die akute Infektion, während Alveolarmakrophagen eher Ort der akuten Infektion sind. Dies spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen für NTHi wider, nach denen in der akuten NTHi-Infektion die Alveolarepithelzellen zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz infiziert werden als die Alveolarmakrophagen. Nach 24h *in vitro*-Infektion mit NTHi sind etwa 10-20% der Alveolarepithelzellen und 55-75% der Alveolarmakrophagen infiziert. Wird das Lungengewebe über 48h mit Cpn vorstimuliert und dann über 24h mit NTHi infiziert, so zeigen sich für NTHi Infektionsraten von 20-35% in den Alveolarepithelzellen und 70-80% in den Alveolarmakrophagen. Für eine persistierende NTHi-Infektion konnten wir *ex vivo* Infektionsraten von 35-45% in Alveolarepithelzellen und 40-50% in Alveolarmakrophagen nachweisen [27], sodass der Anteil der Alveolarepithelzellen mit der Dauer der Infektion zunimmt und sich die Infektionsraten in beiden Zellpopulationen angleichen.

Zu unserem pathophysiologischen Modell der Koinfektion gehören die Zellkulturen von Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen sowie die Gewebekultur von humanem Lungengewebe, in denen inflammatorische Effekte durch die beiden Monoinfektionen und die Koinfektion untersucht werden. In allen Versuchen des Infektionsmodells zeigt sich durchweg eine starke inflammatorische Reaktion auf eine Monoinfektion mit Cpn und NTHi, die fast regelhaft durch die Koinfektion mit beiden Erregern weiter verstärkt wird.

Nachdem wir anhand der Zytokinveränderungen zeigen konnten, dass die Koinfektion stärkere inflammatorische Effekte hat als die Einzelinfektionen, stellte sich die Frage, über welchen Mechanismus die Erreger mit den Zellen interagieren.

Für eine Interaktion mit der Wirtszelle muss Cpn in die Zelle eindringen, um dort einen pathologischen Vorgang zu initiieren. Dabei adhären die infektiösen Elementarkörperchen

über das Hauptprotein der äußeren Membran (*Major Outer Membrane Protein*, MOMP) an die Zielzelle und werden dann über die Bildung phagozytotischer Vesikel aus der Wirtszellmembran endozytotisch aufgenommen [10].

Bei NTHi ist der Mechanismus komplizierter. Zunächst war man davon ausgegangen, dass es sich bei NTHi um ein extrazelluläres Pathogen handelt, welches über Proteine der äußeren Bakterienmembran an die Oberfläche der Zielzelle andockt. Es konnte aber gezeigt werden, dass NTHi nicht nur an die Wirtszelle adhärert, sondern auch über einen Mechanismus der Makropinozytose in die Zelle eindringt [47] und in menschlichen Epithelzellen und Makrophagen überleben kann [88]. NTHi hat auf seiner Zelloberfläche LOS, ein spezifisches Endotoxin, und das *outer membrane protein* (OMP) P6. Beides sind Liganden für den Toll like-Rezeptor 2 (TLR2). OMP P6 ist ein 16 kDA großes, konserviertes Lipoprotein, das von NTHi exprimiert wird und einen Tripalmitoyl-Terminus (Cys-Pam₃) enthält, welcher ein bekannter Stimulus für Toll like-Rezeptoren ist. Wie es für bakterielle Lipoproteine charakteristisch ist, läuft die intrazelluläre Signaltransduktion über eine Aktivierung von NF- κ B [11] und steuert über eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges die Produktion von IL-6 und TNF- α [67].

Bleibt also die Frage, ob Cpn die TLR2-Expression soweit beeinflussen kann, dass es dadurch zu einer Modulation der Infektion mit NTHi kommt.

Generell spielen TLR im Rahmen der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle für die Pathogen-Erkennung [70] und werden hauptsächlich auf Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert, aber auch auf B-Zellen, T-Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen [4;75]. Das Ursprungsprotein in der Familie der Toll-like-Rezeptoren, *Toll*, ist ein Genprodukt, das für die embryonale Entwicklung bei *Drosophila melanogaster* verantwortlich ist. Heute sind 12 Mitglieder der TLR-Familie in Säugetieren identifiziert. Die Expression von TLR kann als Reaktion auf Pathogene, Zytokine und andere Einflüsse schnell angepasst werden. TLR erkennen Bestandteile von Pathogenen wie Lipoproteine, Lipopolysaccharide (LPS) und CpG-reiche Oligonukleotide (CpG ODN). TLR sind Typ I-Transmembranrezeptoren [5;83], die nach Stimulation die Aktivierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B triggern. Die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA führt zur Transkription von Genen für Chemokine, Adhäsionsmoleküle, proinflammatorische Zytokine und Zytokinrezeptoren.

Der für unsere Fragestellung relevante TLR2 wird auf der Oberfläche von Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen exprimiert und ist einer der Hauptrezeptoren für Zellwandkomponenten [6;90]. Er erkennt hauptsächlich gram-positive

Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan oder Lipoteichonsäure, aber auch Bestandteile gram-negativer Pathogene wie Lipopeptide [66].

Drömann et al. fanden *ex vivo* eine TLR2-Expression auf Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen [24] und konnten zeigen, dass eine Stimulation mit Cpn die TLR2-Expression im humanen Lungengewebe deutlich ansteigen lässt. In der RT-PCR von TLR2-mRNA zeigte sich ein etwa 15-facher Anstieg der TLR2-mRNA-Expression und ein deutlicher Anstieg der TLR2-Expression auf der Zelloberfläche nach 24h Infektion mit Cpn. Außerdem zeigen Experimente mit blockierenden Antikörpern für TLR2 eine signifikant reduzierte Immunantwort nach Infektion mit Cpn, gemessen an der IL-8-Sekretion aus den Zell- und Gewebekulturen [26]. TLR2 dient im Rahmen der angeborenen Immunität der zellulären Abwehr bakterieller Infektionen. Die vermehrte TLR2-Expression ist möglicherweise die Ursache für erhöhte Infektionsraten von NTHi und die verstärkte Inflammation nach Koinfektion im humanen Lungengewebe, da auch andere Arbeitsgruppen beschreiben, dass NTHi über eine Interaktion mit dem TLR2-Rezeptor zu inflammatorischen Effekten an der Zielzelle führt [85].

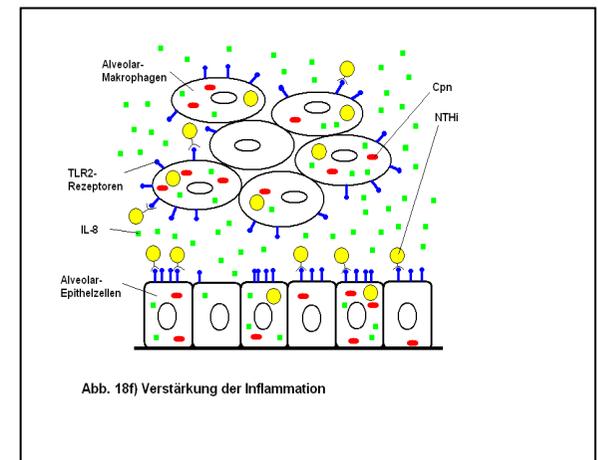
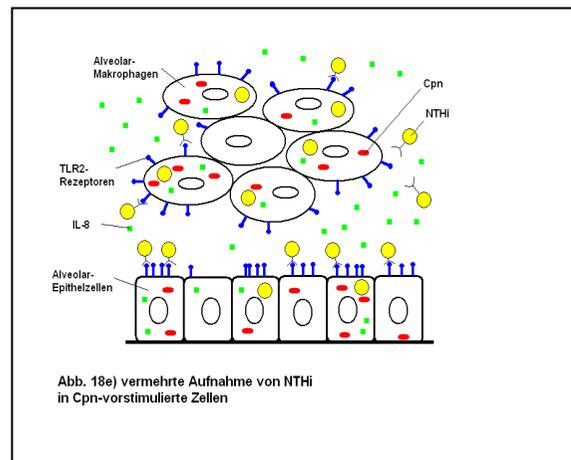
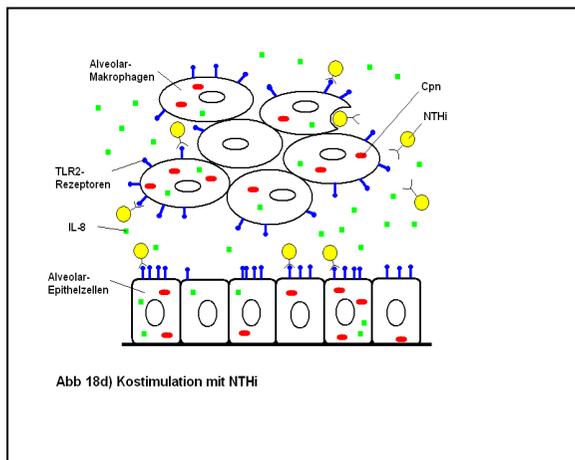
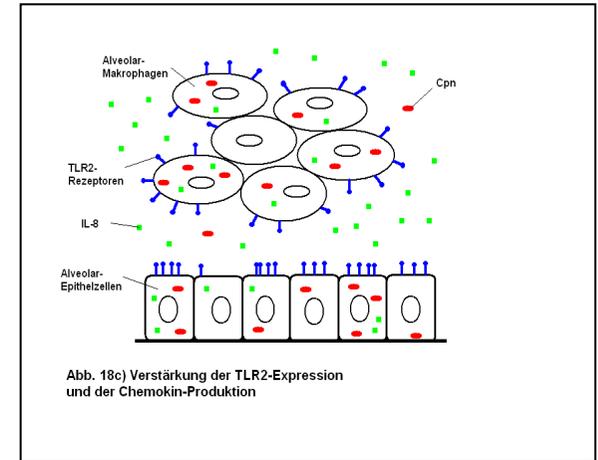
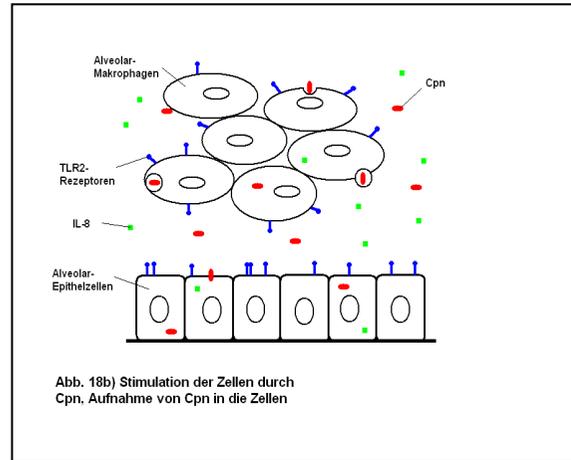
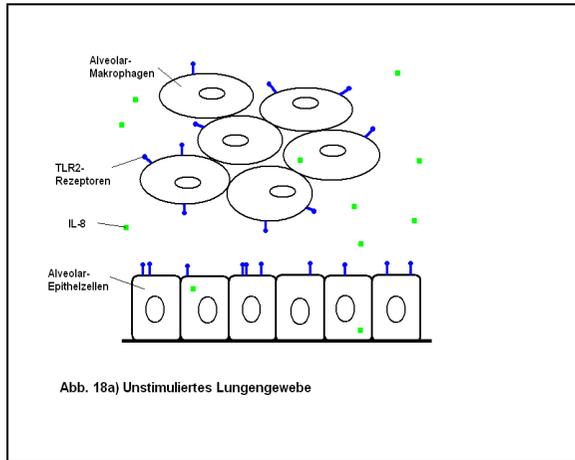
Alveolarepithelzellen Typ II spielen eine große Rolle als ein integrativer Teil des Alveolus und sie sind ideal lokalisiert, um das Rekrutment und die Reaktion verschiedener Zellen auf inflammatorische Stimuli zu kontrollieren [24]. Die basale TLR2-Expression auf den Epithelzellen ist dabei eher gering, reicht aber aus, um eine bakterieninduzierte Abwehrreaktion zu vermitteln, da die Rezeptor-Expression während der Infektion über eine NF- κ B-vermittelte Induktion der Gentranskription deutlich gesteigert werden kann [56;84].

Ausgehend davon, dass Cpn über TLR2 mit der Zelle interagiert und die Expression von TLR2 steigert, bestätigen unsere Ergebnisse, dass eine vermehrte TLR2-Expression durch eine chronische Cpn-Infektion zu stärkeren inflammatorischen Reaktionen bei Koinfektion mit NTHi führt, als wir für die persistierende Infektion mit Cpn oder die Monoinfektion mit NTHi beobachtet haben. Dass Shuto et al. zeigen konnten, dass der TLR2-Rezeptor für die NTHi-induzierte NF- κ B-Aktivierung benötigt wird [85], ergänzt unsere Theorie, dass Cpn durch die verstärkte TLR2-Expression die Bedingungen für eine Infektion mit NTHi wesentlich verbessert und die Infizierbarkeit und Stimulierbarkeit der Zielzellen erhöht. Die TLR-vermittelte Signaltransduktion führt intrazellulär zu einer ERK1/2-assoziierten Aktivierung von NF- κ B, das im Zellkern die Transkription von Zielgenen induziert und dadurch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-8 verstärkt [56;60;67;85;103].

Mit unserer Studie konnten wir zeigen, dass NTHi im humanen Respirationstrakt starke proinflammatorische Effekte entwickelt und in der akuten Phase vor allem Alveolarmakrophagen als primäre Zielzellen befällt. Bei chronischen oder persistierenden NTHi-Infektionen sind auch die Alveolarepithelzellen relevante Zielzellen für die NTHi-Infektionen und exprimieren neben proinflammatorischen Zytokinen auch antiinflammatorische Mediatoren wie TGF- β , die für Reparaturprozesse im Lungengewebe verantwortlich sind. Dass NTHi über eine vermehrte Expression des TGF- β -Pseudorezeptors BAMBI die TGF- β -Expression reduziert, zeigt, wie Pathogene in Gewebeumbauprozesse eingreifen, und stellt einen möglichen Mechanismus der Emphysementstehung bei COPD-Patienten mit rezidivierenden bakteriellen Infekten dar.

Für die Koinfektion von Cpn und NTHi bestätigte sich die Hypothese der TLR2-vermittelten Steigerung proinflammatorischer Effekte der Koinfektion von Cpn und NTHi im humanen Lungengewebsmodell. Demnach führt Cpn neben eigenen proinflammatorischen Effekten zu einer vermehrten Expression von TLR2 auf der Oberfläche infizierter Zellen. NTHi, der mit Lipopeptiden und Lipooligosacchariden auf seiner Oberfläche Liganden für TLR2 trägt, kann über die vermehrt exprimierten TLR2 leichter die pulmonalen Zielzellen infizieren und stärkere inflammatorische Effekte hervorrufen als die NTHi-Monoinfektion (s. Abb. 25), wobei die intrazelluläre Signaltransduktion zumindest teilweise über ERK1/2 vermittelt ist. Dies kann eine Erklärung dafür sein, wie es zu Infektexazerbationen bei Patienten mit persistierenden bakteriellen Infekten kommt, und warum Exazerbationen, die mit Koinfektionen zweier respiratorischer Pathogene assoziiert sind, einen schlechteren Verlauf haben als Exazerbationen, die durch Monoinfektionen verursacht werden.

Abb. 25) Pathophysiologie der Koinfektion von Cpn und NTHi im humanen Lungengewebsmodell



5 Zusammenfassung

Nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) ist das am häufigsten isolierte Pathogen bei Exazerbationen der COPD. Akute Infektionen mit NTHi führen zur vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, chronische NTHi-Infektionen zu Fibroseinduktion und Emphysementstehung. *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) ist häufig verantwortlich für persistierende respiratorische Infektionen und kommt gehäuft bei Koinfektionen vor.

Unsere Fragestellung war, welche inflammatorischen und antiinflammatorischen Effekte eine Infektion mit NTHi hervorruft, ob eine Vorstimulation mit Cpn die Infektionsraten von NTHi verändert oder die inflammatorischen Effekte im humanen Lungengewebe bei Koinfektion moduliert und über welchen Mechanismus die Erreger-Zell-Interaktion abläuft.

Zu unserem Modell der Koinfektion gehörten Alveolarepithelzellen (AEZ), *Monocyte-derived Macrophages* (MDM) und humanes Lungengewebe, in denen inflammatorische Effekte durch beide Monoinfektionen und die Koinfektion untersucht wurden. Die Zytokinexpression wurde mittels ELISA und *in situ*-Hybridisierung untersucht. Die Infektionsraten wurden mit *in situ*-Hybridisierung auf Erreger-DNA ermittelt. Zum Nachweis intrazellulärer Signalpeptide führten wir Western Blots durch. Der Nachweis von TLR2 erfolgte mit Immunhistochemie.

Eine Infektion mit NTHi führt zu einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine, während die Expression antiinflammatorischer Mediatoren reduziert wird. Primäre Zielzellen der akuten NTHi-Infektion sind die Alveolarmakrophagen (AM), die sowohl die höchsten Infektionsraten als auch die stärkste Stimulierbarkeit bezüglich der Expression proinflammatorischer Zytokine zeigen. Die verminderte Expression von TGF- β nach NTHi-Infektion ist zu begründen durch eine vermehrte Expression des TGF- β -Pseudorezeptors BAMBI, der TGF- β bindet und inaktiviert. Dies zeigt, wie Pathogene in Gewebeumbauprozesse eingreifen, und stellt einen möglichen Mechanismus der Emphysementstehung bei Patienten mit rezidivierenden bakteriellen Infekten bei COPD dar.

Eine Vorstimulation mit Cpn erhöht die Infektionsraten von NTHi in AEZ und AM. Eine Modulation der NTHi-Infektion durch Cpn zeigt sich auch im signifikanten Anstieg der IL-8-Sekretion nach Koinfektion bezogen auf die NTHi-Monoinfektion. Dabei scheint die Verstärkung der TLR2-Expression nach Infektion mit Cpn ein Mechanismus der Erreger-Zell-Interaktion zu sein. Für die Koinfektion von Cpn und NTHi bestätigte sich damit die Hypothese der TLR2-vermittelten Steigerung proinflammatorischer Effekte im humanen Lungengewebe, wobei die intrazelluläre Signaltransduktion zumindest teilweise über ERK1/2 vermittelt ist.

Diese Modulation der Pathogen-Erkennung und -Interaktion kann eine Erklärung dafür sein, wie es zu Infektexazerbationen bei COPD-Patienten mit persistierenden bakteriellen Infekten kommt, und warum Exazerbationen durch Koinfektionen zweier respiratorischer Pathogene einen schlechteren Verlauf haben als Exazerbationen durch Monoinfektionen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Airene S, Surcel HM, Alakarppa H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P, Laurila A: Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes. *Infect Immun* 1999;67:1445-1449.
- 2 Airene S, Surcel HM, Tuukkanen J, Leinonen M, Saikku P: Chlamydia pneumoniae inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand J Immunol* 2002;55:390-398.
- 3 Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F: Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* 2006;11 Suppl:S32-S36.
- 4 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
- 5 An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, Liu S, Wang W, Guo Z, Guo J, Qin Z, Cao X: Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 2002;106:38-45.
- 6 Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD, Millar AB: Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:241-245.
- 7 Arva E, Andersson B: Induction of phagocyte-stimulating cytokines by in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with Haemophilus influenzae. *Scand J Immunol* 1999;49:411-416.
- 8 Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, Greenberg SB: Nontypeable Haemophilus influenzae in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2114-2119.
- 9 Barlow G, Nathwani D: Is antibiotic resistance a problem? A practical guide for hospital clinicians. *Postgrad Med J* 2005;81:680-692.

- 10 Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI: Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994;58:686-699.
- 11 Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, Sethi S: Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines. *Infect Immun* 2005;73:2728-2735.
- 12 Berenson CS, Wrona CT, Grove LJ, Maloney J, Garlipp MA, Wallace PK, Stewart CC, Sethi S: Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:31-40.
- 13 Blasi F, Damato S, Cosentini R, Tarsia P, Raccanelli R, Centanni S, Allegra L: *Chlamydia pneumoniae* and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment. *Thorax* 2002;57:672-676.
- 14 Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M: TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 2005;175:5390-5395.
- 15 Boxall C, Holgate ST, Davies DE: The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *Eur Respir J* 2006;27:208-229.
- 16 Bresser P, Out TA, van Alphen L, Jansen HM, Lutter R: Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic *haemophilus influenzae* airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:947-952.
- 17 Bresser P, van Alphen L, Habets FJ, Hart AA, Dankert J, Jansen HM, Lutter R: Persisting *Haemophilus influenzae* strains induce lower levels of interleukin-6 and interleukin-8 in H292 lung epithelial cells than nonpersisting strains. *Eur Respir J* 1997;10:2319-2326.
- 18 Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT: *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis* 1998;4:571-579.

- 19 Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S, Look DC: Haemophilus influenzae from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:85-91.
- 20 Chollet-Martin S, Montravers P, Gibert C, Elbim C, Desmonts JM, Fagon JY, Gougerot-Pocidalo MA: High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* 1993;61:4553-4559.
- 21 Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, St GJ, III, Marrs CF, Gilsdorf JR: Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect Immun* 2000;68:4430-4440.
- 22 Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D: Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99:303-310.
- 23 Doerner AM, Zuraw BL: TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* 2009;10:100.
- 24 Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, Clark R, Dalhoff K, Zabel P, Vollmer E: Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 2003;119:103-108.
- 25 Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B: Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005;6:68.
- 26 Droemann D, Rupp J, Goldmann T, Uhlig U, Branscheid D, Vollmer E, Kujath P, Zabel P, Dalhoff K: Disparate innate immune responses to persistent and acute Chlamydia pneumoniae infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:791-797.

- 27 Dromann D, Rupp J, Rohmann K, Osbahr S, Ulmer AJ, Marwitz S, Roschmann K, Abdullah M, Schultz H, Vollmer E, Zabel P, Dalhoff K, Goldmann T: The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae. *Respir Res* 2010;11:67.
- 28 Erkan L, Uzun O, Findik S, Katar D, Sanic A, Atici AG: Role of bacteria in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2008;3:463-467.
- 29 Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe KF: Update in chronic obstructive pulmonary disease 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1056-1065.
- 30 Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G: Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 1998;187:487-496.
- 31 Flanders KC: Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004;85:47-64.
- 32 Forsgren J, Samuelson A, Borrelli S, Christensson B, Jonasson J, Lindberg AA: Persistence of nontypeable Haemophilus influenzae in adenoid macrophages: a putative colonization mechanism. *Acta Otolaryngol* 1996;116:766-773.
- 33 Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL: Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 1998;243:359-366.
- 34 Frick AG, Joseph TD, Pang L, Rabe AM, St GJ, III, Look DC: Haemophilus influenzae stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2000;164:4185-4196.
- 35 Galdiero M, Galdiero M, Finamore E, Rossano F, Gambuzza M, Catania MR, Teti G, Midiri A, Mancuso G: Haemophilus influenzae porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* 2004;72:1204-1209.
- 36 Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M: TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2007;35:661-664.

- 37 Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC: Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 1996;64:1614-1620.
- 38 Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M: *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* 2001;103:351-356.
- 39 Goldmann T, Vollmer E, Gerdes J: What's cooking? detection of important biomarkers in HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. *Am J Pathol* 2003;163:2638-2640.
- 40 Goldmann T, Wiedorn KH, Kuhl H, Olert J, Branscheid D, Pechkovsky D, Zissel G, Galle J, Muller-Quernheim J, Vollmer E: Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2002;198:91-95.
- 41 Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP: A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990;161:618-625.
- 42 Groeneveld K, van Alphen L, Eijk PP, Visschers G, Jansen HM, Zanen HC: Endogenous and exogenous reinfections by *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the effect of antibiotic treatment on persistence. *J Infect Dis* 1990;161:512-517.
- 43 Haranaga S, Yamaguchi H, Ikejima H, Friedman H, Yamamoto Y: *Chlamydia pneumoniae* infection of alveolar macrophages: a model. *J Infect Dis* 2003;187:1107-1115.
- 44 Hayashi S: Latent adenovirus infection in COPD. *Chest* 2002;121:183S-187S.
- 45 Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo C, Cappuccio AL, Lee MJ, Grayston JT: Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 3:S447-S448.

- 46 Jahn HU, Krull M, Wuppermann FN, Klucken AC, Rosseau S, Seybold J, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N: Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 2000;182:1678-1687.
- 47 Ketterer MR, Shao JQ, Hornick DB, Buscher B, Bandi VK, Apicella MA: Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* 1999;67:4161-4170.
- 48 Khair OA, Davies RJ, Devalia JL: Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1996;9:1913-1922.
- 49 Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Tarraf H, Davies RJ: Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1994;7:2109-2116.
- 50 Krakauer T: 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* 2002;9:126-131.
- 51 Krull M, Klucken AC, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J, Hippenstiel S, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N: Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 1999;162:4834-4841.
- 52 Krull M, Kramp J, Petrov T, Klucken AC, Hocke AC, Walter C, Schmeck B, Seybold J, Maass M, Ludwig S, Kuipers JG, Suttorp N, Hippenstiel S: Differences in cell activation by *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect Immun* 2004;72:6615-6621.
- 53 Kuo CC, Chi EY, Grayston JT: Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect Immun* 1988;56:1668-1672.
- 54 Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT: *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995;8:451-461.

- 55 Lee DK, Khoo KC, Dushianthan A, Currie GP: Are colonial *Haemophilus influenzae* responsible for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease after all? *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:194-195.
- 56 Li JD: Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens. *J Pharmacol Sci* 2003;91:1-7.
- 57 Lin Y, Zhang M, Barnes PF: Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;66:1121-1126.
- 58 Look DC, Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S: Modulation of airway inflammation by *Haemophilus influenzae* isolates associated with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:482-483.
- 59 Maass M, Dalhoff K: Transport and storage conditions for cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1793-1796.
- 60 Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L: Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 2006;80:267-277.
- 61 Murphy TF: Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:129-134.
- 62 Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S: Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:266-272.
- 63 Murphy TF, Kirkham C: Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol* 2002;2:7.
- 64 Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Muller AM, Muller-Navia J: HOPE fixation: a novel

- fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 2001;197:823-826.
- 65 Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL: Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1114-1121.
- 66 Prebeck S, Kirschning C, Durr S, da Costa C, Donath B, Brand K, Redecke V, Wagner H, Miethke T: Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:3316-3323.
- 67 Punturieri A, Copper P, Polak T, Christensen PJ, Curtis JL: Conserved nontypeable *Haemophilus influenzae*-derived TLR2-binding lipopeptides synergize with IFN-beta to increase cytokine production by resident murine and human alveolar macrophages. *J Immunol* 2006;177:673-680.
- 68 Ratner AJ, Lysenko ES, Paul MN, Weiser JN: Synergistic proinflammatory responses induced by polymicrobial colonization of epithelial surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3429-3434.
- 69 Redecke V, Dalhoff K, Bohnet S, Braun J, Maass M: Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:721-727.
- 70 Rohmann K, Tschernig T, Pabst R, Goldmann T, Dromann D: Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease. *Cell Tissue Res* 2010.
- 71 Rupp J, Droemann D, Goldmann T, Zabel P, Solbach W, Vollmer E, Branscheid D, Dalhoff K, Maass M: Alveolar epithelial cells type II are major target cells for *C. pneumoniae* in chronic but not in acute respiratory infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;41:197-203.
- 72 Rupp J, Kothe H, Mueller A, Maass M, Dalhoff K: Imbalanced secretion of IL-1beta and IL-1RA in *Chlamydia pneumoniae*-infected mononuclear cells from COPD patients. *Eur Respir J* 2003;22:274-279.

- 73 Sachse F, von Eiff C, Stoll W, Becker K, Rudack C: Induction of CXC chemokines in A549 airway epithelial cells by trypsin and staphylococcal proteases - a possible route for neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Immunol* 2006;144:534-542.
- 74 Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, Bentley JK, Lukacs NW, LiPuma JJ, Hershenon MB: H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB J* 2006;20:2121-2123.
- 75 Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999;274:17406-17409.
- 76 Sethi S: Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2000;117:286S-291S.
- 77 Sethi S: Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2000;117:380S-385S.
- 78 Sethi S: Coinfection in exacerbations of COPD: a new frontier. *Chest* 2006;129:223-224.
- 79 Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF: New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002;347:465-471.
- 80 Sethi S, Murphy TF: Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:336-363.
- 81 Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF: Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2000;118:1557-1565.
- 82 Sethi S, Wrona C, Grant BJ, Murphy TF: Strain-specific immune response to Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:448-453.

- 83 Shirey KA, Jung JY, Carlin JM: Up-regulation of gamma interferon receptor expression due to Chlamydia-toll-like receptor interaction does not enhance signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *Infect Immun* 2006;74:6877-6884.
- 84 Shuto T, Imasato A, Jono H, Sakai A, Xu H, Watanabe T, Rixter DD, Kai H, Andalibi A, Linthicum F, Guan YL, Han J, Cato AC, Lim DJ, Akira S, Li JD: Glucocorticoids synergistically enhance nontypeable Haemophilus influenzae-induced Toll-like receptor 2 expression via a negative cross-talk with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 2002;277:17263-17270.
- 85 Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD: Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8774-8779.
- 86 Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A: Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;14:1015-1022.
- 87 Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El Ebiary M, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R: Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1498-1505.
- 88 St GJ, III, Falkow S: Haemophilus influenzae adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 1990;58:4036-4044.
- 89 Swanson KA, Zheng Y, Heidler KM, Zhang ZD, Webb TJ, Wilkes DS: Flt3-ligand, IL-4, GM-CSF, and adherence-mediated isolation of murine lung dendritic cells: assessment of isolation technique on phenotype and function. *J Immunol* 2004;173:4875-4881.
- 90 Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-451.

- 91 Tang LL, Zhang Z, Zheng JS, Sheng JF, Liu KZ: Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6:1176-1181.
- 92 Tulic MK, Hurrelbrink RJ, Prele CM, Laing IA, Upham JW, Le SP, Sly PD, Holt PG: TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *J Immunol* 2007;179:132-140.
- 93 Uhlig U, Uhlig S, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: HOPE technique enables Western blot analysis from paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2004;200:469-472.
- 94 Von Hertzen L, Alakarppa H, Koskinen R, Liippo K, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P: Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect* 1997;118:155-164.
- 95 Wang B, Cleary PP, Xu H, Li JD: Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable Haemophilus influenzae via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Infect Immun* 2003;71:5523-5530.
- 96 Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM: Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *J Immunol* 2002;168:810-815.
- 97 Ward ME: The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. *APMIS* 1995;103:769-796.
- 98 Watanabe T, Jono H, Han J, Lim DJ, Li JD: Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3563-3568.
- 99 Wilson R, Dowling RB, Jackson AD: The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa. *Eur Respir J* 1996;9:1523-1530.
- 100 Wu L, Skinner SJ, Lambie N, Vuletic JC, Blasi F, Black PN: Immunohistochemical staining for Chlamydia pneumoniae is increased in lung

tissue from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1148-1151.

- 101 Xu F, Xu Z, Zhang R, Wu Z, Lim JH, Koga T, Li JD, Shen H: Nontypeable *Haemophilus influenzae* induces COX-2 and PGE2 expression in lung epithelial cells via activation of p38 MAPK and NF-kappa B. *Respir Res* 2008;9:16.
- 102 Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Tondella ML, Talkington DF: Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2003;71:614-620.
- 103 Zhou J, An H, Xu H, Liu S, Cao X: Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *Immunology* 2005;114:522-530.

6.1 Elektronische Datenbanken

<http://www.goldcopd.org>

7 Danksagung

Diese Arbeit hätte ich ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht in diesem Ausmaß alleine schaffen können und ich möchte an dieser Stelle einigen Menschen danken, die mich bei der Arbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. K. Dalhoff für die Bereitstellung des Themas danken sowie für seine wirklich hervorragende Betreuung bei allen methodischen und inhaltlichen Fragen.

Außerdem danke ich meinem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. P. Zabel für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und des Materials.

Dann danke ich Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp und Herrn PD Dr. med. Daniel Drömann für ihre Hilfestellung bei den großen und kleinen Problemen der experimentellen Arbeit und ihr Verständnis bei allen technischen Fragen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei PD Dr. rer. nat. Torsten Goldmann aus dem Institut für Klinische und Experimentelle Pathologie am Forschungszentrum Borstel für die Unterstützung bei *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie bedanken.

Ich danke auch der Klinik für Chirurgie des UK-SH, Campus Lübeck, besonders Herrn Prof. Dr. med. P. Kujath, für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und Materialgewinnung.

Für meine Einarbeitung in die Laborarbeit und ihre praktische Mithilfe im Labor danke ich außerdem Frau Ute Knuppertz und Frau Heike Sauerbier, sowie Frau Anke Hellberg, Frau Angela Gravenhorst, Frau Kristin Wischnat und Herrn Sebastian Burmester.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, besonders meinen Eltern, die immer für mich da sind, und die mir mit ihrer Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Persönliches:

Name: Kristina Rohmann
Geburtsdatum: 18.09.1982
Geburtsort: Osnabrück

Schulbildung:

1989-1993 Kardinal-von-Galen-Grundschule, Laggenbeck
1993-2002 Städt. Goethe-Gymnasium Ibbenbüren, Europaschule

Studium der Humanmedizin:

WS 2002/03 – SS 2005 Studium an der RWTH Aachen
WS 2005/06 – SS2008 Studium an der Medizinischen Universität zu Lübeck,
Ärztliche Prüfung am 31.10.2008

seit 2006 Experimentelle Doktorarbeit zum Thema „Die angeborene Immunität in der humanen Lunge“ bei Herrn Prof. Dr. med. K. Dalhoff, Medizinische Klinik III, Universität zu Lübeck

seit November 2008 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik III (Innere Medizin, Pneumologie), UK-SH, Campus Lübeck

Sonstige Qualifikationen im medizinischen Bereich:

seit 2007 Kursleitung bei der „Studentischen Arbeitsgemeinschaft Notfallmedizin (StAN)“

2008 Science-Preis der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP) für die Arbeit „*Chlamydia pneumoniae* verstärkt die TLR2-Expression im humanen Lungengewebe und führt zu vermehrter IL-8-Produktion bei Koinfektion mit *Haemophilus influenzae*“

9 Publikationsliste

Innate Immunity in host-pathogen interaction in the human lung

Kristina Rohmann, Thomas Tschernig, Reinhard Pabst, Torsten Goldmann, Daniel Drömann

Cell and Tissue Research 2010, doi:10.1007/s00441-010-1048-7

The TGF-beta-Pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae

Daniel Droemann, Jan Rupp, Kristina Rohmann, Sinia Osbahr, Artur J Ulmer, Sebastian Marwitz, Kristina Roschmann, Mahdi Abdullah, Holger Schultz, Ekkehard Vollmer, Peter Zabel, Klaus Dalhoff, Torsten Goldmann,

Respiratory Research 2010, 11:67 doi:10.1186/1465-9921-11-67

Haemophilus influenzae (NTHi) up-regulates acute inflammation in human lung tissue and causes downregulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) – a possible role of NTHi in remodeling processes in human lung tissue

Kristina Rohmann, Jan Rupp, Torsten Goldmann, Peter Zabel, Klaus Dalhoff, Daniel Drömann

ERS 2010 (Barcelona, E-Communication)

Die Infektion mit Haemophilus influenzae führt TLR2-vermittelt zu vermehrter Interleukin-8 (IL-8) Expression in humanem Lungengewebe

Kristina Rohmann, Jan Rupp, Peter Zabel, Klaus Dalhoff, Torsten Goldmann, Daniel Drömann

DGP 2010 (Hannover, Vortrag)

Chlamydia pneumoniae enhances infection with Haemophilus influenzae, up-regulates TLR2-expression in human lung tissue and leads to enhanced chemokine production after coinfection – a possible mechanism for COPD exacerbations

Kristina Rohmann, Jan Rupp, Daniel Drömann, Peter Zabel, Klaus Dalhoff, Torsten Goldmann

ERS 2008 (Berlin, Oral Presentation)

Chlamydia pneumoniae verstärkt die TLR-Expression im humanen Lungengewebe und führt zu vermehrter Interleukin-8 (IL-8) Produktion bei Koinfektion mit Haemophilus influenzae

Kristina Rohmann, Jan Rupp, Daniel Drömann, Torsten Goldmann, Klaus Dalhoff

DGP 2008 (Lübeck, Poster, ausgezeichnet mit dem DGP-Science-Preis)

Coinfection of Chlamydia pneumoniae and Haemophilus influenzae enhances interleukin-8 (IL-8) production in human Macrophages and Alveolar Epithelial Cells

Kristina Rohmann, Jan Rupp, Daniel Droemann, Klaus Dalhoff

ERS 2007 (Stockholm, Poster)