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

Die funktionelle Bedeutung des Lungenepithels in der Entstehung chronischer Lungenveränderungen bei bakterieller Infektion

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Sünja Osbahr
aus Kiel

Lübeck 2014

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Jan Rupp
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Sven Krengel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.10.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.10.2014

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung 1

1.2 Nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae* 3

1.3 Die Entstehung von Hypoxie im Rahmen der COPD 5

1.4 Die Bedeutung von Hypoxie und Hypoxie-induzierten Signalwegen für Entzündungsvorgänge 6

1.5 Vascular Endothelial Growth Factor und die Bedeutung für pulmonale Erkrankungen 9

1.6 Endothelin-1 und die Bedeutung für pulmonale Erkrankungen 11

1.7 Zielsetzung der Arbeit 14

2. Materialien 16

2.1 Geräte, Labormaterialien und Software 16

2.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Kits 17

2.3 Antikörper, Primer und siRNA 19

2.4 Puffer für Western Blot 20

2.5 Bakterienstamm 21

2.6 Zelllinie und Zellkulturmedien 22

3. Methoden 23

3.1 Infektionsmodell mit A549-Zellen 23

3.1.1 Kultivierung der Zellen 23

3.1.2 Anzucht von NTHi 24

3.1.3 Infektion der Zellen mit NTHi 25

3.1.4 Transfektionsversuch 25

3.1.5 Probengewinnung für RT-PCR und ELISA 26

3.2 Das humane Lungengewebsmodell 26

3.2.1 Patientenkollektiv 27

3.2.2 Infektion des Lungengewebes und Probengewinnung 27

3.2.3 Homogenisieren der Lungenstücke 28

3.3 Analyse der Expression von Zielgenen 28

3.3.1 RNA-Isolation 28
3.3.2 Reverse Transkription 29
3.3.3 *Real-time* PCR 30
3.4 Nachweis von Proteinen 31
3.4.1 Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot 31
3.4.2 Stripping der Nitrozellulosemembran 33
3.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay 33
3.5 Life/Death-Färbung 34
3.6 Statistik 35

4. Ergebnisse 36
4.1 Bestimmung der Zellvitalität 24 h nach der Infektion mit NTHi 36
4.2 Nachweis hypoxischer Kulturbedingungen und einer effizienten Transfektion durch HIF-1α siRNA 37
4.3 Analyse der VEGF mRNA-Expression 38
4.4 Analyse der ET-1 mRNA-Expression 40
4.5 Untersuchung der VEGF-Sekretion 42
4.6 Analyse der mRNA-Expression von ET-Rezeptor A und B 43
4.7 Untersuchung der TGF-β-Sekretion 45
4.8 Nachweis der Expression zellulärer Marker 45
4.9 Analyse der Expression von VEGF und ET-1 mRNA in humanem Lungengewebe 48

5. Diskussion 50
5.1 Einfluss von NTHi und Hypoxie auf die Expression von VEGF und ET-1 mRNA sowie die Sekretion von VEGF 50
5.2 Einfluss von NTHi auf die Expression von VEGF und ET-1 mRNA in humanem Lungengewebe 56
5.3 Einfluss von NTHi auf die Expression von ET_A- und ET_B-Rezeptor mRNA 58
5.4 Auswirkungen der NTHi-Infektion auf die Sekretion von TGF-β 59
5.5 Einfluss von NTHi auf die Expression von E-Cadherin und Vimentin 60
5.6 Schlussbetrachtung 62

6. Zusammenfassung 63

7. Literaturverzeichnis 64

8. Anhänge 77

8.1. Tabelle I: Stadieneinteilung der COPD nach GOLD 77

8.2 Abbildung I: Einverständniserklärung der Lungengewebsstudie 78

9. Präsentationen und Publikationen 79

9.1 Publikationen 81

9.2 Präsentationen 81

10. Danksagungen 80

11. Lebenslauf 81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSMC	Zellen der glatten Bronchialmuskulatur
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming unit/koloniebildende Einheit
Cpn	*Chlamydia pneumoniae*
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET-1	Endothelin-1
ET_A-R	Endothelinrezeptor A
ET_B-R	Endothelinrezeptor B
FEV_1	forciertes exspiratorisches Volumen in einer Sekunde
FKS	Fetales Kälberserum
FVC	forcierte Vitalkapazität
GOLD	Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease
h	Stunde
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIF	hypoxie-induzierbarer Faktor
HOX	Hypoxie
HRE	hypoxia response element
HSV-1	Herpes simplex Virus-1
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
Konz.	Konzentration
Med.	Medium

min	Minute
mRNA	messenger RNA
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NO	Nitritoxid
NOX	Normoxie
NTHi	nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae*
O_2	Sauerstoff
PAFr	platelet-activating factor receptor
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TGF-β	Transforming growth factor β
Th1-Zellen	T-Helfer-1-Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V	Volt
WB	Western Blot

1. Einleitung

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) ist eine Erkrankung von weltweiter Bedeutung. Nach der Definition der *Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) ist die COPD „durch eine nicht reversible Atemwegsobstruktion gekennzeichnet, die für gewöhnlich progredient ist und mit einer überschießenden chronischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen und der Lunge auf schädliche Partikel oder Gase einhergeht“ [1]. Die chronische Entzündungsreaktion kann zu einer Parenchymdestruktion, resultierend in einem Emphysem, führen, und die normalen Abwehr- und Reparaturmechanismen stören. Eine zunehmende Fibrosierung der kleinen Atemwege und die Entstehung einer chronischen Atemwegsobstruktion ist die Folge [1]. Durch die Atemwegsobstruktion und die strukturellen Veränderungen wird im Verlauf der Erkrankung der Gasaustausch in der Lunge verschlechtert. Es entsteht eine Hypoxämie und später eine Hyperkapnie [2, 3]. Durch hypoxische Vasokonstriktion der kleinen pulmonalen Arterien kann sich eine pulmonale Hypertension, die bedeutendste kardiovaskuläre Komplikation der COPD, entwickeln [2, 3].

Klinisch im Vordergrund stehende Symptome sind chronischer Husten, Auswurf und Atemnot, die durch Hypersekretion und ziliäre Dysfunktion entstehen [3, 4].

Die Limitierung des exspiratorischen Atemflusses durch eine bestehende Atemwegsobstruktion wird zur Diagnose und zur Klassifikation der Erkrankung verwendet [3]. Die Messung erfolgt mittels Spirometrie. Nach der GOLD-Klassifikation erfolgt die Einteilung in vier Stadien anhand des forcierten exspiratorischen Volumens in einer Sekunde (FEV_1) nach Gabe eines Bronchodilatators und anhand der forcierten Vitalkapazität (FVC) [2] (s. Tabelle I im Anhang).

Die geschätzte Prävalenz der Erkrankung in der Gesamtbevölkerung liegt bei ca. 1 % in allen Altersgruppen sowie bei über 10 % der Bevölkerung ab dem 40. Lebensjahr [4]. Die COPD ist weltweit die vierthäufigste Todesursache. In Deutschland stand sie nach Angaben des statistischen Bundesamtes im Jahr 2002 an 7. Stelle der Todesursachen [4]. Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung einer COPD ist Nikotinabusus, bis zu 80 % der erkrankten Patienten sind oder waren Raucher [5]. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des Zigarettenkonsums und der Abnahme der Lungenfunktion ist nachgewiesen [6]. Jedoch vermindert sich die jährliche Abnahme der FEV_1 bei Rauchern

mit einer COPD im Stadium I oder II nach Beendigung des Zigarettenrauchens um die Hälfte [7]. Weitere wichtige Risikofaktoren für die Entstehung einer COPD sind Luftverschmutzung, berufliche Exposition gegenüber Chemikalien als Dämpfe, Rauch oder Reizstoffe, und genetische Störungen wie ein α_1-Antitrypsinmangel [3, 8].

Noch immer kontrovers wird die Beteiligung von respiratorischen Infekten und die Veränderung der bakteriellen Kolonisation der Lunge an der Entstehung der COPD diskutiert [9]. Im unteren Respirationstrakt gesunder Erwachsener können unter physiologischen Umständen keine Bakterien nachgewiesen werden [10]. Im Verlauf einer COPD kommt es jedoch zu einer verminderten mukoziliären Clearance sowie einer Abnahme der Infektabwehr, die es den Erregern erleichtert, sich in den unteren Atemwegen anzusiedeln [11]. Zigarettenrauchen scheint die Erregerabwehr zusätzlich negativ zu beeinflussen, Raucher besitzen eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen [12, 13]. Es wurde gezeigt, dass Raucher weniger Immunglobuline, insbesondere vom Typ IgG, besitzen [14]. Des Weiteren ist Rauchen assoziiert mit einer erhöhten Permeabilität des Atemwegsepithels und einer verminderten bakteriellen Clearance, welche dazu führt, dass Bakterien besser in das Epithel eindringen und sich niederlassen können [15, 16]. Zigarettenrauch vermindert die phagozytotische Aktivität von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen und CD8+ T-Zellen von Rauchern zeigen eine verminderte chemotaktische Aktivität [17-19]. Tabakexposition führt zudem zu einer Herunterregulation des Pathogen Recognition Receptors TLR2 [20]. Die Immunantwort auf gram-negative Bakterien wird supprimiert, indem die LPS-induzierte Expression des TLR4 in Th1-Zellen vermindert wird und eine verminderte Freisetzung von IFN-γ resultiert. Eine negative Korrelation der TLR4-Expression mit pack-years sowie eine positive Korrelation mit der FEV_1 wurden demonstriert [21].

Die Untersuchung von Lungengewebe von COPD-Patienten erbrachte in 38 % den Nachweis von nicht-typisierbaren *Haemophilus influenzae* (NTHi) [22]. In Lungengewebe von COPD-Patienten im Endstadium, die eine Lungentransplantation erhielten, konnte in bis zu 50 % NTHi nachgewiesen werden [23]. Bei dem Vergleich und der Interpretation von Kolonisierungsraten bei COPD-Patienten muss beachtet werden, dass diese einer jahreszeitlichen und krankheitsstadienabhängigen Schwankung unterliegen können [24].

Der stabilen Phase der Erkrankung steht das Auftreten einer akuten Exazerbation gegenüber. Diese ist definiert als eine „akute Verschlechterung, erkennbar an einer Zunahme von Atemnot, Husten, Auswurf, Obstruktion oder thorakaler Beklemmung

(selten Fieber), die eine Änderung der Behandlung erforderlich macht. Sie tritt besonders in den Stadien II bis IV der COPD auf, oft während der kalten Jahreszeit“ [4].

Eine akute Exazerbation kann durch nicht-infektiöse Ursachen ausgelöst werden, beispielsweise Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung, kalte Luft und Allergene, aber auch nicht-pulmonale Infektionen, Herzinsuffizienz und Lungenembolien [25]. 60-80 % der akuten Exazerbationen sind jedoch infektiöser Genese [25, 26]. Während bei der ambulant erworbenen Pneumonie *Streptococcus pneumoniae* der mit Abstand häufigste Erreger ist und andere Errreger wie z.B. *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Enterobacteriaceae sowie respiratorische Viren deutlich seltener auftreten [27], sind bei der akuten Exazerbation einer COPD *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und Viren, insbesondere Rhino-, Adeno-, Parainfluenza- und Influenzaviren die vorherrschenden Ursachen [25, 28-30]. In bronchialen Mukosabiopsien von Patienten, die aufgrund einer akuten Exazerbation intubiert werden mussten, konnte sogar in 87 % NTHi nachgewiesen werden [31]. Darüber hinaus sind auch Erreger wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* ursächlich für akute Exazerbationen [25, 30].

1.2 Nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae*

Nicht-typisierbare *Haemophilus influenzae* (NTHi) sind kleine gramnegative unbewegliche und im Gegensatz zu den *Haemophilus influenzae Typ b* unbekapselte Stäbchen. Sie werden zu den fakultativ pathogenen Keimen gezählt. Der Erreger verursacht insbesondere bei Kindern Infekte der oberen und unteren Atemwege wie Otitiden, Sinusitiden und Pneumonien sowie Infektionen der unteren Atemwege bei Patienten mit COPD [29]. NTHi scheint eine wichtige Rolle in der Progression der COPD zu spielen. So ist es nicht nur für akute Exazerbationen verantwortlich, sondern kolonisiert auch den unteren Respirationstrakt während klinisch stabiler Krankheitsphasen [29]. Exazerbationen einer COPD können entweder durch das exzessive Wachstum kolonisierender Bakterien [32] oder durch die Infektion mit neuen Bakterienstämmen auftreten [33]. Durch die Fähigkeit, über einen langen Zeitraum in den unteren Atemwegen von COPD-Patienten zu persistieren, gelingt auch nach erfolgter antimikrobieller Therapie die Isolation des Erregers. Des Weiteren bleibt der Erreger oft trotz negativer Kulturen noch durch molekulare Techniken nachweisbar [23, 32].

Bedeutende Pathogenitätsfaktoren von NTHi sind das Lipooligosaccharid (LOS), welches eine wichtige Funktion für die Adhäsion von NTHi und die Interaktion zwischen Bakterium und Wirtszelle besitzt [29] sowie die Bildung einer IgA-Protease. Diese zerstört die natürliche Barrierefunktion des mukosalen IgA [34]. Unter physiologischen Umständen werden IgA-Proteasen durch Anti-Proteasen neutralisiert, doch bei zunehmender Pathogenbelastung wird die Neutralisierungskapazität überschritten, es resultiert eine Schädigung des Gewebes. Darüber hinaus ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung ein möglicher Mechanismus, welcher NTHi in den unteren Atemwegen von COPD-Patienten zur Persistenz verhelfen kann. Ein Biofilm ist eine strukturierte Ansammlung bakterieller Zellen, die von einer selbst produzierten polymeren Matrix umgeben sind und an einer inaktiven oder lebenden Oberfläche anhaften [35, 36]. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung variiert zwischen einzelnen NTHi-Stämmen [37]. Möglicherweise erklärt dies die Persistenz einiger Stämme im Respirationstrakt von COPD-Patienten, während andere Stämme lediglich eine transiente Besiedlung verursachen [29].

Ein weiterer Mechanismus, der zur Persistenz von NTHi in den Atemwegen beitragen könnte, ist die Antigenvariation. Eine Akkumulation von Punktmutationen in dem Gen, das für das äußere Membranprotein P2 (outer membrane protein P2, OMP P2) von NTHi kodiert, stellt einen Drift der antigenen Struktur dar. Möglicherweise erlangen die Bakterien somit die Fähigkeit, den Antikörpern der Immunantwort zu entgehen und in den Atemwegen zu persistieren [38, 39]. Ebenso könnte ein Shift des Antigens, entstehend durch den Austausch von OMP P2-Genen zwischen einzelnen kolonisierenden NTHi-Stämmen, zur Persistenz beitragen [40].

Der initiale Schritt im Prozess der Kolonisierung der unteren Atemwege durch NTHi ist die Adhäsion der Bakterien an die Oberfläche von Epithelzellen [41]. NTHi exprimiert zahlreiche Adhäsine, unter anderem das Haemophilus adhesion protein (Hap), ein Autotransporter, und das Protein E, ein Lipoprotein der äußeren Bakterienmembran mit adhäsiven Eigenschaften [42-44]. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass Hap die Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen fördert [45] und mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin und Kollagen IV interagiert [46]. Sowohl Hap als auch das Protein E sind entscheidend für die Interaktion von NTHi mit Laminin in der Basalmembran der Wirtszelle [47]. Es wurde gezeigt, dass die Lamininschicht der Basalmembran bei Rauchern signifikant dicker ist als bei Nichtrauchern [48]. Dieses gesteigerte Vorhandensein von Laminin könnte den Weg für Laminin-bindende

respiratorische Pathogene ebnen und eine mögliche Erklärung für die erhöhte Inzidenz von NTHi in COPD-Patienten darstellen [47].

NTHi ist im humanen Respirationstrakt sowohl extrazellulär als auch intrazellulär nachzuweisen [31] und besitzt die Fähigkeit zur Invasion der Atemwege. Ein möglicher Eintrittsmechanismus in Epithelzellen ergibt sich durch die Interaktion eines Phosphorylcholin-Restes des Lipooligosaccharids mit dem humanen Platelet-activating factor receptor (PAFr). Diese Interaktion führt zu der Initiierung einer Signalkaskade, die letztendlich in der Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} resultiert [49]. Es wurde gezeigt, dass eine spezifische Inhibition des PAFr die Invasion von NTHi in Epithelzellen reduziert [50].

In vitro Experimente haben einen weiteren Mechanismus der Invasion aufgezeigt. NTHi kann ein zytoskelettales Rearrangement innerhalb des humanen Bronchialepithels induzieren, welches zu einer Internalisierung der Bakterien in nicht zilientragendes humanes Atemwegsepithel durch Makropinozytose führt [51].

NTHi trägt aber auch durch die Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen direkt zu entzündlichen Veränderungen der Atemwege bei. Eine akute pulmonale Infektion mit NTHi führt zu einer gesteigerten Expression des proinflammatorischen Zytokines Interleukin-1β (IL-1β) [52]. Das Endotoxin von *Haemophilus influenzae* induziert die Sekretion von IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor α (TNF-α) durch Bronchialepithelzellen [53, 54] und das äußere Membranprotein 6 (outer membrane protein 6, OMP 6) eine vermehrte Sekretion von IL-8, IL-10 and TNF-α durch humane Makrophagen [55]. Das Vorhandensein von NTHi im Rahmen einer COPD geht mit signifikanten Veränderungen der Konzentrationen von antimikrobiellen Proteinen wie Lysozym und LL-37 im humanen Atemwegssekret einher [56].

1.3 Die Entstehung von Hypoxie im Rahmen der COPD

Bei Fortschreiten der COPD entstehen strukturelle Lungenveränderungen und die Lungenfunktion nimmt ab [1]. Durch z.B. verminderte Ventilation, vermehrten Metabolismus oder dem Bedarf nicht angepasste Vaskularisation entstehen Areale mit verminderter Sauerstoffverfügbarkeit. Respiratorische Infektionen resultieren in einer weiteren Abnahme des verfügbaren Sauerstoffs in den betroffenen Arealen. Der Begriff „Hypoxie“ wird für gewöhnlich mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,5-3 % O_2 gleichgesetzt [57]. Funktionell besteht eine Hypoxie *in vivo* immer, wenn der

Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot übersteigt [57]. Bereits im gesunden Gewebe unterscheidet sich der Sauerstoffgehalt des Gewebes stark von dem Sauerstoffgehalt der atmosphärischen Luft und auch zwischen verschiedenen Geweben zeigt sich eine ausgeprägte Variationsbreite [58]. Während des Einatmens besteht in der atmosphärischen Luft ein Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von 160 mmHg, entsprechend einer Sauerstoffkonzentration von 20,9 %. Im Bereich der Trachea wird der Sauerstoffgehalt mit einem pO_2 von 150 mmHg gemessen und ist mit 19,7 % O_2 bereits leicht erniedrigt. In den Alveolen bestehen Sauerstoffpartialdrücke von lediglich 110 mmHg, entsprechend 14,5 % O_2. Im gesamten Lungengewebe wird im Median ein Sauerstoffpartialdruck von 42,8 mmHg, entsprechend 5,6 % O_2, gemessen [58, 59]. Betrachtet man den Sauerstoffgehalt im interstitiellen Gewebe, so liegt er unter physiologischen Bedingungen in der Lunge bei 7,6 ± 0,3 % O_2 und in der Leber gar nur bei 5,4 ± 0,7 % O_2 [58].

Im Rahmen pulmonaler Infekte, insbesondere mit dem pathophysiologischen Korrelat einer Lobärpneumonie, kommt es im Verlauf zu einer Ansammlung eitrigen Exsudates in den Alveolen, die zu einem starken Abfall der dort verfügbaren Sauerstoffkonzentration führen [60]. Bei chronischer Inflammation in den Atemwegen von Patienten mit zystischer Fibrose wurde in mukopurulentem Material sogar ein massiv herabgesetzter pO_2 von 2,5 mmHg gemessen [61]. Das inflammatorische Exsudat füllt die Alveolen aus und führt zu einer Verminderung des totalen Lungenvolumens und der funktionellen Residualkapazität [62, 63]. Der Volumenverlust resultiert in einer verminderten totalen Lungencompliance, die Atemarbeit steigt an. Ebenso spielt der vermehrte intrapulmonale Sauerstoffverbrauch durch Entzündungszellen und bakterielle Erreger in der Akutphase der Infektion eine zentrale Rolle in der Entstehung von „pulmonaler Hypoxie“ [63]. Durch relatives Versagen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion kommt es im Folgenden mit der Entstehung eines intrapulmonalen Shunts und der weiterhin guten Durchblutung minderbelüfteter Lungenbereiche zu einer arteriellen Hypoxämie [63].

1.4 Die Bedeutung von Hypoxie und Hypoxie-induzierten Signalwegen für Entzündungsvorgänge

Hypoxie ist der wichtigste Faktor für die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (HIF-1α) [57, 64, 65]. HIF ist ein heterodimerer Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor, der sich zusammensetzt aus dem konstitutiv exprimierten HIF-1β und einer hypoxie-induzierbaren α-Untereinheit, entweder HIF-1α oder HIF-2α [66, 67]. Die α-

Untereinheiten sind unter normalen Sauerstoffbedingungen instabil und werden kontinuierlich sowohl gebildet als auch abgebaut [57]. Unter Hypoxie oder Eisendeprivation werden Prolyl- und Asparaginylhydroxylasen inhibiert, so dass keine Degradation von HIF-1α erfolgt [57]. Der HIF-Komplex kann somit an Ziel-Promoterregionen binden und eine Transkription von Genen initiieren. Die komplexen Mechanismen der HIF-1α-Degradation und -Stabilisierung sind in Abbildung 1 dargestellt [57].

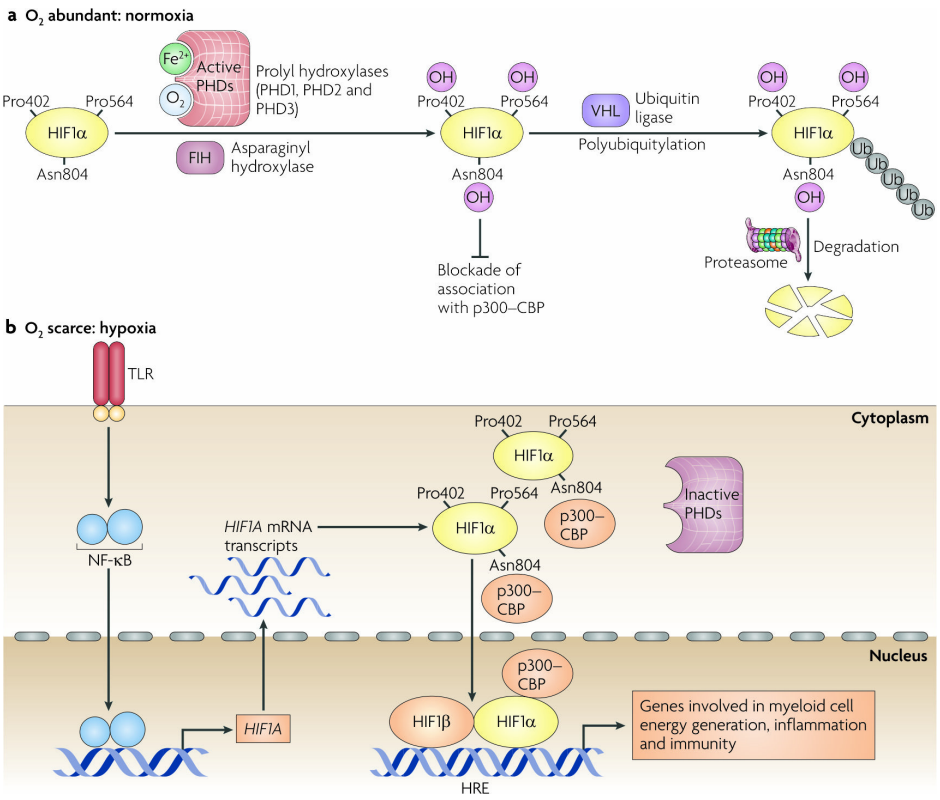


Abb. 1: Mechanismen der HIF-1α-Degradation und -Stabilisierung (Abbildung aus [57]): Die α-Untereinheit ist unter normalen Sauerstoffbedingungen instabil und wird kontinuierlich gebildet und auch abgebaut: HIF-1α wird an den Aminoresten 402 und 564 durch sauerstoffabhängige Prolyl-Hydroxylasen hydroxyliert. Dadurch kann es zu einer Polyubiquitination von HIF-1α durch das von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein (VHL) kommen. HIF-1α kann dann im Proteasom degradiert werden. Unter Hypoxie wird die Hydroxylierung durch Prolyl- und Asparaginylhydroxylasen inhibiert, so dass keine Degradation von HIF-1α erfolgt. Die konstitutive Genexpression von HIF-1α erfolgt durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) und eine darauf folgende Aktivierung von NF-κB. HIF-1α, in Assoziation mit dem p300-CREB-binding Protein (CBP), migriert in den Zellkern, um HIF-1β zu binden und einen heterodimeren Komplex zu bilden. Der HIF-Komplex bindet an Ziel-Promoterregionen, die als hypoxia response elements bezeichnet werden (HREs), und führt somit zu einer Transkription von Genen (frei übersetzt nach [57]).

HIF-1 wird in allen Säugetierzellen exprimiert und ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor bei Hypoxie [68]. Er reguliert die Transkription von über 100 Genen mit Funktionen in diversen zellulären und systemischen Antworten auf Stress, der durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen verursacht wird [57].
Neuere Arbeiten zeigen nun, dass HIF-1α nicht nur zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase benötigt wird, sondern eine zentrale Bedeutung bei entzündlichen Prozessen hat [57]. Bei der Aktivierung des Immunsystems unter Hypoxie besteht eine bedeutende wechselseitige Beziehung zwischen HIF-1α und NF-κB [57, 69, 70]. Es wurde postuliert, dass NF-κB durch HIF-1α aktiviert wird [71], doch auch die NF-κB abhängige Aktivierung von HIF-1α konnte nachgewiesen werden [72, 73]. Die Abwehr eindringender Mikroorganismen wird initial durch das angeborene Immunsystem ausgeführt. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei phagozytierende Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die in das betroffene Gewebe einwandern und sich dabei an wechselnde Sauerstoffumgebungen anpassen müssen [57]. Eine hohe Aktivität von HIF-1α fördert die phagozytierende Funktion von Makrophagen und kann eine Steigerung der Expression der induzierbaren Nitritoxid-Synthase (iNOS) mit resultierender verstärkter Abtötung von Bakterien induzieren [74]. HIF-1α führt zu einer erhöhten Produktion der Serinproteasen neutrophile Elastase und Cathepsin G, die sich in den Granula neutrophiler Granulozyten befinden und für die Fusion von Phagosomen zu Phagolysosomen benötigt werden [74]. HIF-1α zögert die Apoptose neutrophiler Granulozyten hinaus und stärkt so die Arbeit des angeborenen Immunsystems [71]. Auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α sowie Interleukin-1, -4, -6 und -12 wird durch HIF-1α gefördert [75].

Es gibt zunehmend Anhaltspunkte dafür, dass Bakterien selbst die Fähigkeit besitzen, HIF-1 zu aktivieren, wahrscheinlich durch einen erhöhten Sauerstoffkonsum und zelluläre Hypoxie in den Wirtszellen [68, 76], oder dass Bakterien direkt die Stabilisierung von HIF-1α beeinflussen [77]. So induziert *Chlamydia pneumoniae* in der frühen Phase einer Infektion eine Stabilisierung, wohingegen es in späteren Stadien der Infektion zu einer Degradation von HIF-1α kommt [77]. Des Weiteren wurde eine mögliche Konkurrenz von Bakterien und Wirtszellen um vorhandene Eisen-Ionen beschrieben, die über einen zellulären Eisenmangel und daraus resultierender Inhibition der Aktivität von Prolylhydroxylasen unmittelbar die Degradation von HIF-1α blockiert [78]. Auch wurde gezeigt, dass LPS direkt stabilisierende Effekte auf HIF-1α besitzt [75].

Im Verlauf einer COPD kommt es zur Zerstörung des alveolären Kapillarennetzwerkes, dies führt zu einem verminderten Sauerstofftransport und daraus resultierender alveolärer Hypoxie [79]. HIF-1, der Schlüsseltranskriptionsfaktor bei Hypoxie, reguliert unter anderem die Gene für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [80-83] und Endothelin-1 (ET-1) [83, 84], beides Faktoren mit bekanntem Effekt auf strukturelle Umbauprozesse der Atemwege [85, 86]. Es ist bekannt, dass Hypoxie in Alveolarepithelzellen zu einer vermehrten Sekretion von VEGF führt [87-89], die bisherigen Erkenntnisse bezüglich eines Einflusses von Hypoxie auf die Expression von ET-1 sind jedoch inkonsistent [87, 90-93]. Beide Faktoren spielen eine Rolle im Verlauf einer COPD, die genaue Bedeutung von VEGF und ET-1 in diesem Zusammenhang ist bisher jedoch noch nicht endgültig aufgeklärt [85, 90, 94-99].

1.5 Vascular Endothelial Growth Factor und die Bedeutung für pulmonale Erkrankungen

VEGF ist als Zytokin bekannt, welches multiple Funktionen in unterschiedlichen Organen besitzt. Zur VEGF-Familie werden VEGF-A, -B, -C, -D sowie der Placental Growth Factor gezählt, wobei VEGF-A das zentrale Mitglied der Familie ist und für gewöhnlich als „VEGF“ bezeichnet wird. VEGF ist ein Heparin-bindendes, dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45-46 kDa [100, 101]. Es existieren vier Isoformen, $VEGF_{165}$, $VEGF_{121}$, $VEGF_{189}$ und $VEGF_{206}$, die durch alternatives Splicen entstehen [102, 103]. Die am häufigsten vorkommende Isoform ist das homodimere, 165 Aminosäuren umfassende, $VEGF_{165}$, welches in einer löslichen Form sezerniert wird [104].

Initial wurde eine einzigartige Spezifität der Wirkungen von VEGF für vaskuläre Endothelzellen beschrieben [101], später jedoch demonstriert, dass VEGF auch diverse Effekte auf nicht-Endothelzellen ausübt. Das Vorkommen von VEGF mRNA wurde in vielen Organen nachgewiesen, wobei die Expression im Lungengewebe am stärksten ausgeprägt ist [105]. Diese ausgeprägte lokale Produktion in der Lunge bestätigend hat eine Studie gezeigt, dass die VEGF-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage 500-fach höher sind als die Plasmakonzentrationen der identischen Patienten [106].

In der Lunge sind Alveolarepithelzellen der Hauptproduktionsort, jedoch nicht der ausschließliche Ort der VEGF-Produktion [105-107]. Es wurde auf verschiedenen pulmonalen Zelltypen wie Alveolarepithelzellen Typ II, zilientragendem Bronchialepithel und Clara-Zellen die Expression der VEGF-Rezeptoren nachgewiesen [108]. Es wurde postuliert, dass VEGF eine autokrine oder parakrine Rolle für die humane

Alveolarepithelzellproliferation und die Differenzierung der Epithelzellen spielt [109]. Trotz aller Hinweise auf multiple Effekte ist noch sehr wenig über die definitive Wirkung von VEGF auf Alveolarepithelzellen bekannt.

VEGF ist für diverse sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse verantwortlich. Es ist ein potentes Mitogen, der zentrale Wachstums- und Überlebensfaktor für vaskuläre Endothelzellen [101, 110] und somit ein entscheidender Regulator der embryonalen Vaskulogenese sowie der adulten Angiogenese [111]. VEGF bewirkt eine Inhibition von Apoptose [100, 112-114] und besitzt bedeutende Funktionen in der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren durch Förderung der Angioneogenese [115]. Es wurde gezeigt, dass VEGF durch einen erhöhten Ca^{2+}-Einstrom und einer in der Folge erhöhten intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in Endothelzellen die vaskuläre Permeabilität erhöht [116-119]. Durch diese permeabilitätserhöhende Aktivität besitzt es eine wichtige Rolle in der Entstehung von inflammatorischen Prozessen [120]. Des Weiteren führt VEGF durch die Synthese von Nitritoxid (NO) in Endothelzellen *in vitro* zu einer Vasodilatation [121].

Die biologischen Effekte der VEGF-Familie werden über drei Rezeptoren vermittelt: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 [122-124]. VEGF bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2 [82]. VEGFR-3 wird durch VEGF-C gebunden, welcher in die Entwicklung lymphatischer Gefäße involviert zu sein scheint [124]. Die meisten Wirkungen von VEGF auf Endothelzellen, wie z.B. die Aktivierung der NO-Synthese, Prostacyclin-Freisetzung, Angiogenese, vaskuläre Permeabilitätserhöhung sowie Zellproliferation, werden über den VEGFR-2 vermittelt [120, 125].

VEGF spielt eine wichtige Rolle in diversen pulmonalen Erkrankungen. Bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren wurde eine Überexpression von VEGF im Plasma festgestellt [126]. VEGF hat eine große Bedeutung bei der Entstehung der pulmonalarteriellen Hypertonie [127]. Es wird auch mit der Pathogenese der Lungenfibrose in Verbindung gebracht [108, 128, 129], wobei die Aussagen zu Konzentrationsbestimmungen im Verlauf einer pulmonalen Fibrose noch inkonsistent scheinen [130, 131].

Betrachtet man die COPD, so muss festgestellt werden, dass die exakte Bedeutung von VEGF in diesem Zusammenhang noch immer größtenteils unklar zu sein scheint. Eine Studie demonstrierte eine signifikante Erhöhung der VEGF-Konzentration im induzierten Sputum von COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und wies eine

negative Korrelation zwischen VEGF-Konzentration und FEV_1 nach [98]. Auch andere Studien liefern Hinweise auf oder belegen einen eindeutigen Einfluss von VEGF auf das Remodeling der Atemwege im Verlauf einer COPD [85]. Dahingegen konnte in einer anderen Arbeit keine Erhöhung des zirkulierenden VEGF bei stabiler COPD im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden [99].

Ebenso ist die Studienlage bezüglich der Rolle von VEGF während einer Exazerbation inkonsistent. Einerseits wurde ein Konzentrationsanstieg von zirkulierendem VEGF während einer Exazerbation nachgewiesen und eine gleichzeitige Zunahme des systemischen Entzündungsmarkers CRP demonstriert [99], dahingegen zeigte sich im induzierten Sputum kein Konzentrationsanstieg im Vergleich zur stabilen Phase der COPD [98].

Kontrovers scheint auch die Rolle von VEGF im Rahmen eines Lungenemphysems. VEGF und die VEGF-Rezeptoren scheinen eine eher protektive Rolle in der Emphysementwicklung zu besitzen. Durch die experimentelle Blockade von VEGF-Rezeptoren konnte eine Emphysemverstärkung induziert werden [132]. Bei Emphysempatienten wurden erniedrigte Konzentrationen von VEGF im induzierten Sputum nachgewiesen und es wurde eine positive Korrelation zwischen diesen und der Lungenfunktion postuliert [133]. Im Hinblick auf die Pathologie des Lungenemphysems, in dessen Verlauf es zu einem Verlust von alveolären Strukturen und zum Zelluntergang kommt, könnte ursächlich für die positive Korrelation die bei fortschreitender Erkrankung limitierte Kapazität zur Synthese von VEGF sein.

VEGF-Antagonismus spielt bereits eine bedeutende Rolle in der Therapie von pulmonalen Karzinomen, so ist Bevacizumab, ein monoklonaler IgG-Antikörper gegen VEGF, Bestandteil der Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms [134]. Möglicherweise könnte die Inhibition von VEGF auch als Therapieoption weiterer pulmonaler Erkrankungen in der Zukunft im Fokus stehen, so wies eine Studie einen vermindernden Effekt von Bevacizumab auf das Remodeling der Atemwege bei Asthma nach [135]. Auch in nicht-pulmonalen Erkrankungen ist VEGF-Antagonismus von wichtiger Bedeutung, beispielsweise wird Bevacizumab als Bestandteil der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms eingesetzt [136] und in der Augenheilkunde ist der VEGF-Antagonist Aflibercept zur Therapie der feuchten Form der altersbedingten Makuladegeneration zugelassen [137].

1.6 Endothelin-1 und die Bedeutung für pulmonale Erkrankungen

Zu der Familie der Endotheline gehören Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3), die sich in ihrer Struktur und in der pharmakologischen Aktivität unterscheiden [138], wobei ET-1 die häufigste und am besten charakterisierte Isoform darstellt [139]. ET-1 ist ein Peptid aus 21 Aminosäuren, welches initial als individuelles Produkt von Endothelzellen beschrieben wurde [140].

ET-1 wird in zahlreichen Zelltypen diverser Organe produziert [141-143]. Die höchsten Konzentrationen dieses Faktors jedoch wurden in der Lunge nachgewiesen, wo es außer von Endothelzellen der Gefäße auch von Alveolarepithelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen der Gefäße produziert und freigesetzt wird [143-145].

Endothelin hat zahlreiche Effekte auf den gesamten Organismus: Es stimuliert die Proliferation von glatten Muskelzellen [146] und Fibroblasten [147], hat einen positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt auf das Myokard [148, 149] und führt zu einer Freisetzung von vasodilatatorischen Substanzen wie Prostacyclin und Nitritoxid [150-153]. Zudem fördert es eine Kontraktion der Uterusmuskulatur [154] und inhibiert die Reninfreisetzung aus dem Glomerulus [155]. Ein wichtiger Effekt des ET-1 ist die Konstriktion der glatten Muskulatur der Atemwege [156]. Am bedeutendsten ist jedoch die Wirkung als sehr potenter Vasokonstriktor [140, 157, 158]. Hier zeigen ET-1 und ET-2 eine deutlich höhere Potenz als das ET-3 [138], welches dahingegen als Vasodilatator potenter ist. ET-1 besitzt, wie oben beschrieben, ebenfalls eine vasodilatatorische Wirkung, deren Bedeutung jedoch gering ist, da in hohen Konzentrationen die Vasokonstriktion überliegt [152].

Endotheline wirken über die G-Protein-gekoppelten Endothelinrezeptoren A und B (ET_A-R, ET_B-R) [159]. Die ET_A-R mRNA wird am stärksten in der Lunge und im Herz exprimiert, niedrige Konzentrationen finden sich in diversen anderen Geweben [159]. Der ET_B-R wird in Endothelzellen exprimiert und findet sich unter anderem auch in den Zellen des Gehirns und der Niere [160]. Beide Endothelinrezeptoren sind auf glatten Muskelzellen nachweisbar [161], ET_B-Rezeptoren auch auf intramuralen autonomen Nerven der glatten Trachealmuskulatur [162]. Alveolarepithelzellen exprimieren sowohl den ET_A-R als auch den ET_B-R [86, 163], wobei eine vornehmliche Expression des ET_A-R gezeigt wurde [86]. Der ET_A-R besitzt eine höhere Selektivität für die Endothelin-Isoformen 1 und 2 als für das ET-3 [159], der ET_B-R hingegen zeigt keine Isoformen-Selektivität [164].

Endothelin-1 spielt eine Rolle bei diversen pulmonalen Erkrankungen, unter anderem Asthma bronchiale [165], pulmonaler Fibrose [166], pulmonaler Hypertonie, aber auch bei cystischer Fibrose und COPD [167] sowie Lungenkarzinomen [168]. Es wirkt pro-entzündlich und erhöht die Sekretion von IL-6 und IL-8 in Bronchialepithelzellen [169]. Eine erhöhte Konzentration von ET-1 wurde bei Patienten mit stabiler COPD sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Blut nachgewiesen [90, 94]. Die Konzentrationen von ET-1 steigen im Sputum und in einem geringeren Maße auch im Plasma während einer Exazerbation an. Die Veränderung der Plasmakonzentration von ET-1 korreliert mit der Veränderung der Sauerstoffsättigung während einer Exazerbation [97].

Inkonsistent sind die bisherigen Erkenntnisse zur Rolle von ET-1 bei pulmonaler Hypertonie im Rahmen einer COPD. Einerseits wurde in Studien kein Einfluss einer pulmonalen Hypertonie im Rahmen einer COPD auf die ET-1-Konzentration gezeigt [90, 94]. Dahingegen demonstrierte jedoch eine andere Studie deutlich erhöhte Konzentrationen von ET-1 bei COPD-Patienten mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zu COPD-Patienten ohne pulmonale Hypertonie und zeigte eine Korrelation des pulmonalarteriellen Druckes mit der Konzentration von CRP und ET-1 [95]. Auch im arteriellen Blut sowie in der Exspirationsluft konnten erhöhte ET-1 Konzentrationen bei pulmonaler Hypertonie im Rahmen einer COPD demonstriert werden [96].

Die außergewöhnliche Bedeutung von Endothelin in pathologischen pulmonalen Prozessen wird verdeutlicht, wenn man den erfolgreichen pharmakologischen Einsatz von Endothelin-Rezeptorantagonisten betrachtet. So wurde gezeigt, dass der Einsatz eines selektiven ET_B-Rezeptorantagonisten (BQ-788) die asthmatische Sofortreaktion und der Einsatz eines selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten (BQ-123) die asthmatische Spätreaktion blockiert [170]. Für Bosentan, einen oralen ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten, wurde ein präventiver Effekt bezüglich der pulmonalen Hypertonie und des pulmonalen vaskulären Remodelings nachgewiesen [171]. Die Gabe von Bosentan und weiterer ET-Rezeptorantagonisten ist zur Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie zugelassen und ist Bestandteil der Leitlinien der Deutschen Gesellschaften für Kardiologie und Pneumologie. Der ET-1 Rezeptorantagonist Tezosentan mildert ebenfalls die pulmonale Hypertonie ab [172].

ET-1 mediiert in der Zellkultur eine alveoläre epithelial-mesenchymale Transition. Unter dem Einfluss des Faktors kommt es in Alveolarepithelzellen zu einem Gewinn mesenchymaler und einem Verlust epithelialer Marker [86].

1.7 Zielsetzung der Arbeit:

NTHi besitzt eine zentrale Rolle bezüglich pulmonaler Infektionen im Verlauf einer COPD, der Erreger ist die häufigste infektiöse Ursache akuter Exazerbationen und kolonisiert den Respirationstrakt während chronisch stabiler Krankheitsphasen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von NTHi auf die Freisetzung der Wachstumsfaktoren VEGF und ET-1 durch Alveolarepithelzellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte aufgeklärt werden, ob eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie) die Freisetzung von VEGF und ET-1 beeinflusst. Die zentralen Hypothesen dieser Arbeit sind in Abbildung 2 zusammengefasst. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Führt die Infektion mit NTHi zu einer gesteigerten Expression von VEGF und/oder ET-1 in humanen Alveolarepithelzellen?

- Welchen Einfluss hat Hypoxie während der Infektion auf die Expression von VEGF und ET-1?

- Welche Rolle spielt der HIF-1α Signalweg für die Expression von VEGF und ET-1?

- Führt eine bakterielle Infektion und/oder Hypoxie zu einer veränderten Expression des epithelialen Zellmarkers E-Cadherin bzw. des mesenchymalen Zellmarkers Vimentin?

- Lassen sich die im Zellkulturmodell gewonnenen Erkenntnisse im humanen Lungengewebsmodell reproduzieren?

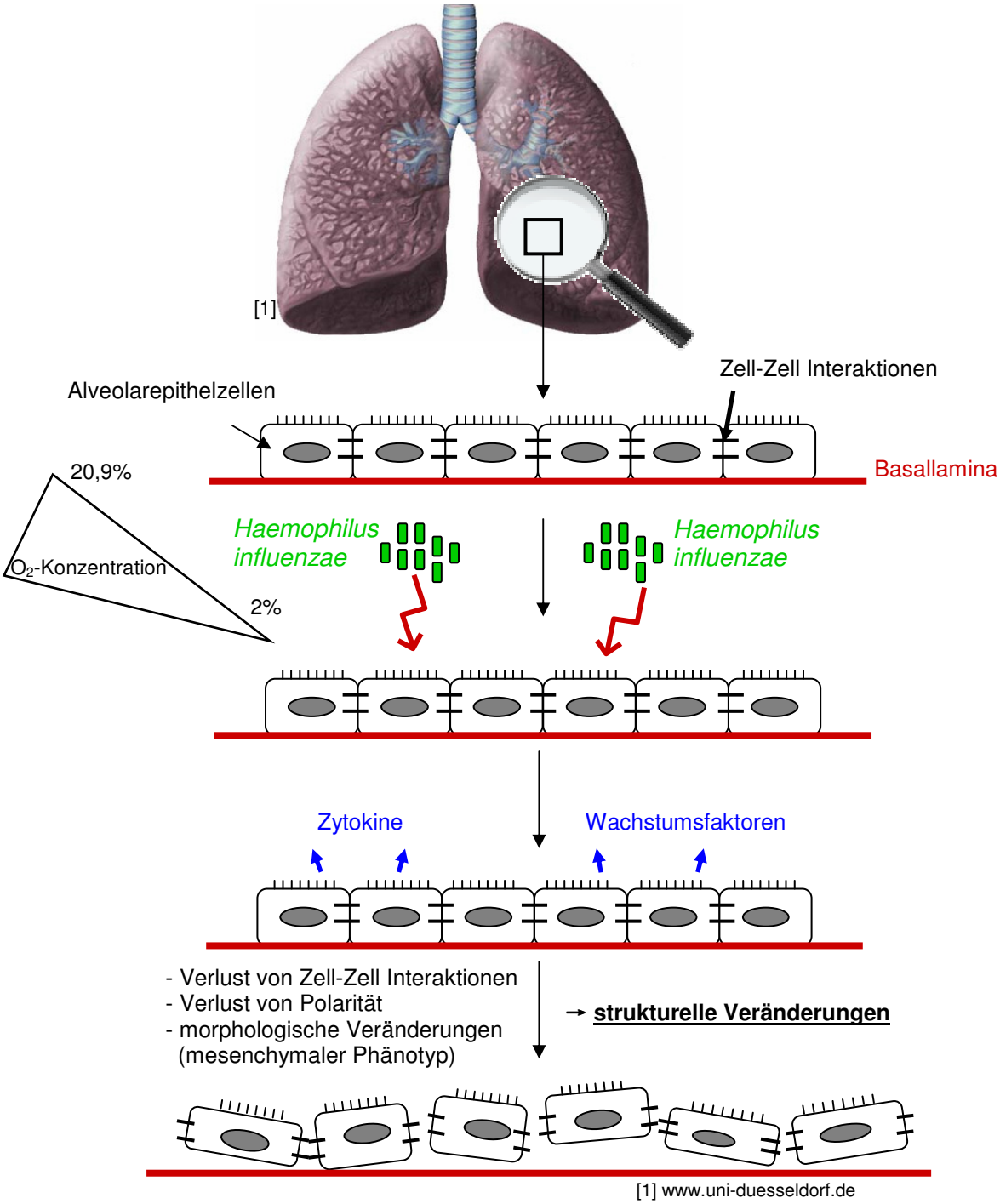


Abb. 2: In Lungenepithelzellen kommt es durch Infektionen mit NTHi und/oder Hypoxie zu einer vermehrten Expression und Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese führen zu einem Remodeling von Lungenepithelzellen. Im Rahmen des Remodelings kommt es zu einem Verlust charakteristischer Zellmerkmale und zu einer Transition der Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp.

2. Materialien

2.1 Geräte, Labormaterialien und Software

Geräte und Labormaterialien	Firma
Sicherheitswerkbänke:	
SterilGARD Hood Class II A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Antares	Biohit, Rosbach
EN 12469	Clean Air Techniek B.V., Woerden, Niederlande
Abluftanlage	Köttermann GmbH & Co.KG, Uetze
Brutschränke:	
Forma Series II 3131	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Forma Series II 3141	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
BB 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Jouan IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Hypoxic chamber THC08 124	Toepfter Lab Systems, Göppingen
Microplate Reader Modell 680	Bio-Rad Laboratories, München
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer Typ RMO	Gerhardt GmbH, Königswinter
Mikroskope:	
Axioskop 2, 25, 40	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen
Axiovert 25	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen
Standard 20	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Hassa, Lübeck
pH-Meter Mettler Toledo MP220	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Pipette Eppendorf Reference®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfen accu-jet®, accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Homogenisator Precellys® 24	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Programmable Thermal Controller pTC100™	MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA
Sicherheitsbrenner flammy L	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Thermostat 3401	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexgeräte REAX top/REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Waagen:	
Kern KB Feinwaage 600-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Western Blot-Geräte:	
Power Pac 3000, Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories, München
Glass Plates Mini-Protean®3System	Bio-Rad Laboratories, München
Mini-Protean® 3 Cell, Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Gießstand	Bio-Rad Laboratories, München
Abstandhalter	Bio-Rad Laboratories, München

Geräte und Labormaterialien	Firma
Western Blot Kämme Mini Protean3	Bio-Rad Laboratories, München
Röntgenkassette: BAS Cassette2040	Fujifilm, Düsseldorf

Software	Firma
Microplate Manager 5.2.1	Bio-Rad Laboratories, München
LightCycler Data Analysis	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft Office 2000	Microsoft Corporation, Redmond, USA
AxioVision Rel. 4.5	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Sigma Plot 2000	Systat, Erkrath
Bio-1D	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Kits

Verbrauchsmaterialien	Firma
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, St. Gilles, UK
Biosphere® Filter Tips (10, 100, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Cell Culture Plate (6 Well, 24 Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cell Scraper 25 cm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® Tissue Culture Flasks (175 cm^2)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cult Tube 12 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser (10 mm Durchmesser)	Menzel GmbH &Co KG, Braunschweig
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
Glasperlen ca. 3 mm	Karl Hecht Assistent, Sondheim
Hyperfilm™	Amersham, Buckinghamshire, UK
Impfschlinge, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kryoboxen Kunststoff	Hassa, Lübeck
LightCycler Capillaries® 20 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Multiply®-Pro Gefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger geschnitten mit Mattrand	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Plastikpipetten Cellstar® (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Plattierungsspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrol-Pinzette	J. Söllner, Deggendorf
Precellys® Keramik Kit 1.4/2.8 mm	PEQLAB Biotechnol. GmbH, Erlangen
Prot/Elec-Tips-Bulk for Protein Electrophoresis	Bio-Rad Laboratories, München
Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman® GmbH, Dassel
Reagiergefäß 1,5 ml („Eppendorfgefäß“)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Chemikalien	Firma
Acrylamid-Bis (40 %) Solution	Bio-Rad Laboratories, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Immobilon® Western HRP Substrate Luminol Reagent/ Peroxide Solution	Millipore, Billerica, MA, USA
Cycloheximid	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethidium-homodimer-2	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
FKS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Gentamicin	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Kodak X-Ray developer LX 24	Kodak, Stuttgart-Wangen
Kodak X-Ray fixer AL 4	Kodak, Stuttgart-Wangen
L-Glutamin (10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lipofectamin	Invitrogen, Darmstadt
nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Methanol	Merck, Darmstadt
Mounting Fluid	Oxoid GmbH, Wesel
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Opti-MEM®	Invitrogen, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
PBS	Nährmedienlabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
PCR Nucleotid Mix (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
rDNAse	Macherey-Nagel, Düren
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Salzsäure (25 %)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Syto 16	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Chemikalien	Firma
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-HCl	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tween 20pure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Kits	Firma
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NucleoSpin RNA II	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Quantikine Immunoassay Human VEGF	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
DuoSet® ELISA Development System human TGF-β1	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.3 Antikörper, Primer und siRNA

Antikörper	Ursprung	Firma
Primärantikörper:		
Anti-Endothelin-B Receptor Polyclonal Antibody	Kaninchen	Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA
Anti-Endothelin-A Receptor Polyclonal Antibody	Kaninchen	Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA
Anti-Human HIF-1α	Maus	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-β-Actin Antibody	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Aktin, α Smooth Muscle	Maus	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Anti-Vimentin	Maus	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Anti-E-Cadherin	Maus	BD Bioscience, Heidelberg
Sekundärantikörper:		
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody	Pferd	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Primer	Sequenz (5' > 3')	Firma
18S right	CCT CCA ATg gAT CCT CgT TA	TIB-MOLBIOL, Berlin
18S left	AAA Cgg CTA CCA CAT CCA Ag	TIB-MOLBIOL, Berlin
TGF-β 1	TCT gAg ATg gCA ggg ACT CT	TIB-MOLBIOL, Berlin
TGF-β 2	CTg gTC TCA AAT gCC Tgg AT	TIB-MOLBIOL, Berlin
VEGF 1	CCT TgC TgC TCT ACC TCC AC	TIB-MOLBIOL, Berlin
VEGF 2	CAC ACA ggA Tgg CTT gAA gA	TIB-MOLBIOL, Berlin
ET 1	gAA TTT TTg CCA AgC Agg AA	TIB-MOLBIOL, Berlin
ET 2	TgA CgC TgT TTC TCA Tgg TC	TIB-MOLBIOL, Berlin
ET a right	TTC TCA AGC TGC CAT TCC TT	MWG Biotech AG, Ebersberg
ET a left	TAT CCT GGC CAT TCC TGA AG	MWG Biotech AG, Ebersberg
ET b right	GTC TTA GTG GGT GGC GTC AT	MWG Biotech AG, Ebersberg
ET b left	GAC GCT TCT GGA GCA GGT AG	MWG Biotech AG, Ebersberg

siRNA	Sequenz (5' > 3')	Firma
HIF-1α Stealth RNAi	CCAGCCGCUGGAGACACAAUCAUAU AUAUGAUUGUGUCUCCAGCGGCUGG	Invitrogen, Darmstadt

2.4 Puffer für Western Blot

Puffer für Western Blot	
Trenngelpuffer	
Tris	18,1 g ad 60 ml Aqua dest.
HCL	ad pH 8,8
	ad 100 ml, 4 °C
Sammelgelpuffer	
Tris	6,0 g ad 60 ml Aqua dest.
HCL	ad pH 6,8
	ad 100 ml, 4 °C
Elphopuffer (5-fach, pH 8,3)	
Tris	15 g/l
Glycin	72 g/l
SDS	5 g/l
TBS (10-fach, pH 7,6)	
Tris	24,2 g/l
NaCl	80 g/l
T-TBS (1-fach)	
TBS (10-fach)	100 ml
Tween	1 ml
	ad 1 l Aqua dest.

Puffer für Western Blot	
Blotpuffer	
Tris	3 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
Aqua dest. (unsteril)	800 ml
Blockpuffer	
Trockenmilch	5 g
T-TBS	100 ml
Lysispuffer (pH 7,8)	
Tris-HCL	125 mmol
SDS	4%
DTT (1 M)	10%
Glycerol	20%
Bromphenolblau	
Trenngel für Western Blot (10 %)	
Aqua dest. (unsteril)	4,9 ml
1,5 M Tris/HCL	2,5 ml
Acrylamid-Bis	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
TEMED	5 µl
10 % APS	50 µl
Sammelgel für Western Blot (4 %)	
Aqua dest. (unsteril)	6,4 ml
0,5 M Tris/HCL	2,5 ml
Acrylamid- Bis	1 ml
10 % SDS	100 µl
TEMED	10 µl
10 % APS	50 µl
Stripping-Puffer	
Glycin (200 mM)	1,5 g ad 100 ml Aqua dest. ad pH 2,5

2.5 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Herkunft
Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)	Isolat Nr. B5144, im Juni 2002 aus der Blutkultur eines COPD-Patienten isoliert

2.6 Zelllinie und Zellkulturmedien

Zelllinie	Firma
A549-Zellen Nr. ACC 107 (Ursprung: Lungenkarzinom, besitzen charakteristische Merkmale von Alveolarepithelzellen Typ II)	DSMZ, Braunschweig

Zellkulturmedien	
Anzuchtmedium	
RPMI 1640 Medium	500 ml
Nicht-essenzielle Aminosäuren	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Fetales Kälberserum (FKS)	50 ml
Gentamicin	1 ml
Amphotericin B	4 ml
Infektions-Vorbereitungsmedium	
RPMI 1640 Medium	500 ml
Nicht-essenzielle Aminosäuren	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Fetales Kälberserum (FKS)	25 ml
Infektionsmedium	
RPMI 1640 Medium	500 ml
Nicht-essenzielle Aminosäuren	5 ml
L-Glutamin	5 ml

3. Methoden

3.1 Infektionsmodell mit A549-Zellen

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Durchführung der Zellkulturexperimente erfolgte mit A549-Zellen. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 175 cm^2 bei 37 °C und 5 % CO_2 in 25 ml Anzuchtmedium kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen geerntet und für die Infektionsversuche vorbereitet. Hierzu wurde das Anzuchtmedium abgenommen und entsorgt. Zum Waschen wurden 10 ml PBS auf die Zellen gegeben und nach vorsichtigem Schwenken der Flasche verworfen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 4 ml Trypsin für 5 min bei 37 °C, um die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, durch das Hinzugeben von 4 ml Anzuchtmedium wurde das Trypsin verdünnt. Es folgte die Zentrifugation für 1 min bei 4000 U/min, um eine Ablagerung der Zellen am Boden des Röhrchens in Form eines Pellet zu bewirken. Der Überstand aus Medium und Trypsin wurde verworfen und das Pellet wurde je nach Größe in 10-15 ml Vorbereitungsmedium gelöst. Aus dieser Zellsuspension wurde die exakte Zellzahl bestimmt, indem in einem Well einer 96-Well-Platte 90 µl Trypanblau mit 10 µl der Zellsuspension vermischt wurde. Es wurden nun 10 µl hiervon entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, in der die Zellzählung erfolgte. Durch das Mischen der Zellsuspension mit Vorbereitungsmedium wurde die für die Versuche benötigte Zellzahl von 2,5 x 10^5 Zellen je Well eingestellt und die Zellen wurden in 2 ml Vorbereitungsmedium je Well in 6-Well-Platten mit einer Fläche von 9,6 cm^2 je Well pipettiert. Sollten die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt gefärbt werden, so wurde vor dem Einpipettieren der Zellen ein rundes Deckgläschen von 10 mm Durchmesser auf den Boden des Wells gelegt, so dass die Zellen auf diesem Deckgläschen adhärierten.

Der Rest der Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturflaschen verteilt und bei 37 °C und 5 % CO_2 in jeweils 25 ml Anzuchtmedium inkubiert, um die Zellen für folgende Versuche zu kultivieren. Die Zellen in den 6-Well-Platten waren nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 adhärent und konnten für den weiteren Versuchsablauf verwendet werden.

Ein Standard-Versuchsansatz umfasste mindestens 6 Wells mit je $2{,}5x10^5$ Zellen/Well:

Tab. 1: Probenschema eines Standard-Versuchsansatzes	
Normoxie	Hypoxie
1. Kontrolle	5. Kontrolle
2. NTHi Konzentration 1	6. NTHi Konzentration 1
3. NTHi Konzentration 2	7. NTHi Konzentration 2

Gegebenenfalls wurde dieser Standardansatz um Ansätze für Färbungen o.ä. ergänzt.

3.1.2 Anzucht von *Haemophilus influenzae*

Nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae* (NTHi, in dieser Arbeit verwendet: Isolat B5144, 06/2002 von einem 60-jährigen COPD-Patienten mit Pneumonie isoliert, in der 16S rRNA-Sequenzierung wurde der Stamm Rd KW20 nachgewiesen) ist ein fakultativ intrazelluläres, gram-negatives Stäbchen. NTHi macht keine eigene Hämolyse, sondern benötigt für sein Wachstum die Faktoren Hämin („Faktor X“) und NAD („Faktor V“). Die Anzucht von NTHi erfolgte daher auf speziellem Agar, dem Kochblutagar. Dieser ist eine Variante des Blutagars, der durch kurzzeitiges Erhitzen des Blutagars auf 80 °C entsteht, wodurch die Lyse der vorhandenen Erythrozyten erreicht wird. Dabei werden Hämin und NAD in den Agar freigesetzt und können dort von den Bakterien verstoffwechselt werden.
Um die Bakterien für die Infektionsversuche zu erhalten, wurde täglich mit einer Plastiköse etwas Material von einer Agarplatte entnommen und es wurde eine neue Kochblutagarplatte beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 konnten koloniebildende Einheiten (colony forming units, cfu) von NTHi von der Agarplatte entnommen und für Infektionsversuche verwendet werden.
Um eine definierte Zahl koloniebildender Einheiten für die Infektion der Zellen zu erhalten, wurde mit Hilfe eines Densimeters ein McFarland-Standard eingestellt: Koloniebildende Einheiten wurden mit einer Plastiköse von der Agarplatte entnommen, in ein Glasröhrchen mit NaCl gegeben und sorgfältig vermischt. Es wurde die Trübung der NaCl-Bakterien-Suspension gemessen und somit die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in der Suspension bestimmt. Ziel war die Einstellung eines McFarland-Standards von 1, was einer Keimmenge von 3×10^8 cfu/ml entspricht. Für die Infektion der Zellen wurde die NaCl-Bakterien-Suspension in Infektionsmedium so verdünnt, dass die gewünschte Keimmenge für jedes Well in 1 ml Medium enthalten war.

3.1.3 Infektion der Zellen mit NTHi

Es erfolgte die Vorbereitung der Bakterien-Suspensionen.

Tab. 2: Schema der Infektion von A549-Zellen mit NTHi

Erreger	Keimzahl (cfu)/Zelle	Zellzahl/Well	Keimzahl (cfu)/Well	Absolute Menge
Kontrolle	0	$2{,}5x10^5$	0	1 ml Infektionsmedium
NTHi Konz.1	100	$2{,}5x10^5$	$2{,}5x10^7$	83,3 µl McFarland 1/Well
NTHi Konz.2	10	$2{,}5x10^5$	$2{,}5x10^6$	8,33 µl McFarland 1/ Well

Die Bakterien wurden mit Infektionsmedium gemischt, so dass für jedes mit NTHi zu infizierende Well insgesamt 1 ml Bakterien-Suspension zur Verfügung stand. Die Zellen, die in 6-Well-Platten 24 h zuvor für die Infektion vorbereitet worden waren, wurden aus dem Brutschrank genommen. Mikroskopisch wurde die Adhärenz und die Morphologie der Zellen kontrolliert. Das Vorbereitungsmedium wurde abpipettiert und verworfen. Die Bakteriensuspension, bzw. im nicht-infizierten Kontrollansatz ausschließlich Infektionsmedium, wurde auf die Wells gegeben. Die 6-Well-Platten wurden umgehend im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte immer eine parallele Inkubation identischer Proben unter normoxischen Bedingungen (20,9 % O_2) und unter hypoxischen Bedingungen (2 % O_2).

3.1.4 Transfektionsversuch

HIF-1α ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor, der für die Regulation zahlreicher hypoxie-induzierbarer Gene verantwortlich ist. Um das Ausmaß des Einflusses von HIF-1α auf die mRNA-Expression der in dieser Arbeit gemessen Wachstumsfaktoren VEGF und ET-1 sowie der Endothelinrezeptoren näher zu betrachten, wurden A549-Zellen vor der Infektion mit NTHi mit HIF-1α small interfering RNA (siRNA) transfiziert. Bei siRNA handelt es sich um kurze RNA-Stücke, die sich an die mRNA anlagern und zu einer gezielten post-transkriptionalen Abschaltung eines Genes führen.

Zunächst erfolgte das Ansetzen des Transfektionsansatzes: In ein steriles Plastikröhrchen wurden für jedes zu befüllende Well 250 µl Optimem und 5 µl Lipofectamin pipettiert. In ein zweites Röhrchen wurden für jedes Well 250 µl Optimem und 5 µl HIF-1α siRNA gegeben. Die beiden Ansätze wurden nach Ablauf einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur zusammen pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 20 min

bei Raumtemperatur. Für einen Ansatz des Transfektionsversuches wurden insgesamt 12 Wells benötigt, davon 8 Wells mit je 2,5 x 10^5 Zellen in 2 ml Vorbereitungsmedium für die gewöhnliche Infektion und Inkubation unter Normoxie bzw. Hypoxie sowie 4 Wells mit je 2,5 x 10^5 Zellen in 1,5 ml Infektionsmedium für die Transfektion. Zu jedem dieser 4 Wells erfolgte die Zugabe von 500 µl des Transfektionsansatzes. Alle Wells wurden zunächst unter Normoxie inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurden die 4 transfizierten Wells aus dem Brutschrank genommen. Das Medium wurde verworfen und es erfolgte die Gabe von 2 ml Vorbereitungsmedium in jedes Well. Anschließend wurden alle Zellen für weitere 24 h unter Normoxie inkubiert, dann folgte die Infektion der Zellen (s.u.). Die mit HIF-1α siRNA präinkubierten Zellen wurden nach der Infektion unter Hypoxie inkubiert.

3.1.5 Probengewinnung für RT-PCR und ELISA

Nach einer Inkubationszeit von 24 h unter Normoxie oder Hypoxie wurden die Zellen für Western Blot, Polymerase Chain Reaction (PCR) oder Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) geerntet. Die Zellüberstände wurden für die spätere Analyse mittels ELISA aus den Wells abpipettiert, in 10 ml Röhrchen gegeben und kurzzeitig auf Eis gestellt. Auf die Zellen wurde dann zur Gewinnung von Proben für Western Blot 500 µl Lysispuffer je Well oder für die Gewinnung von Proben für die PCR 350 µl RA 1 Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol je Well gegeben. Durch Schwenken sowie leichtes Rühren mit einer Transferpipette wurden die Puffer verteilt. Die Zellen wurden mit einer Transferpipette von der Platte genommen und in ein vorbereitetes 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden die Proben für Western Blot bei -20 °C, die Proben für die PCR bei -80 °C eingefroren. Die Überstände der Zellen wurden 10 min bei 3500 rpm gekühlt zentrifugiert, dann aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2 Das humane Lungengewebsmodell

Um die Bedingungen der Versuche möglichst realitätsnah zu gestalten, wurden die Zellkulturversuche auf ein humanes Lungengewebsmodell übertragen. Die verwendeten Lungenstücke stammten von Patienten, denen aufgrund einer pulmonalen Erkrankung Lungengewebe reseziert wurde (Ethikantrag 03/158, Universität zu Lübeck). Die Patienten wurden vor der Operation über die Studie aufgeklärt und haben der Verwendung des Lungengewebes schriftlich zugestimmt (Einwilligungserklärung s. Abbildung I im Anhang).

3.2.1 Patientenkollektiv

Tab. 3: Klinische Daten des Patientenkollektivs der Lungengewebsstudie

Lunge Nr.	Jahrgang	m/w	COPD (GOLD)	FEV1 FEV1/FVC	Raucher oder ehem. Raucher	Corticosteroide
1	1947	m	III	1,7 l (50 %) 58,8 %	ja	Budesonid inhalativ
2	1941	m	k.A	k.A	ja	nein
3	1944	m	III	k.A	ja	Fluticason inhalativ
4	1954	m	nein	3,25 l (82 %) 112 %	ja	nein
5	1934	m	k.A.	k.A.	nein	nein
6	1931	m	nein	2,15 l (69 %) 95 %	ja	nein
7	1935	m	nein	2,13 l (75 %) 94 %	ja	Prednisolon 5 mg/Tag oral (wg. rheumat. Arthritis)

3.2.2 Infektion des Lungengewebes und Probengewinnung

Das Lungengewebe wurde unmittelbar nach der Resektion aus dem Operationssaal abgeholt, auf Eis gelagert und in die Pathologie gebracht. Dort wurde es durch Pathologen gesichtet, die tumorfreies Lungengewebe vom Rand abschnitten und uns für die Studie zur Verfügung stellten. Dieses Stück Lungengewebe wurde in Infektionsmedium gelegt und umgehend in Stücke für die Stimulationsversuche zugeschnitten. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen Stücke von 25-30 mg mit einer kleinen Schere von dem Lungengewebe abgeschnitten, die Gewichtskontrolle erfolgte mit Hilfe einer Feinwaage. Die Lungengewebsstücke wurden in 1 ml Infektionsmedium je Well in 24-Well-Platten gelegt. Es folgte die Infektion mit NTHi, indem die Bakterien in das in den Wells enthaltene Infektionsmedium pipettiert wurden.

Tab. 4: NTHi-Konzentration bei der Infektion von Lungengewebe

Erreger	Keimzahl/Well	Absolute Menge/Well
NTHi Konz.1	$2{,}1 \times 10^6$ cfu	7 µl McFarland 1

Anschließend wurden die Platten unter Normoxie oder unter Hypoxie für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Wells abpipettiert und verworfen. Die Lungenstücke wurden mit einer sterilen Pinzette in 2 ml Precellys-Keramik-Kit Röhrchen transferiert, in denen für Western Blot-Proben 500 µl Lysis Puffer und für PCR-Proben 600 µl RA 1 Reagenz und 6 µl β-Mercaptoethanol vorgelegt worden waren. Anschließend wurden die Western Blot-Proben bei -20 °C, die PCR-Proben bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 Homogenisieren der Lungenstücke

Für die weitere Analytik erfolgte die Homogenisierung der Lungenstücke. Es wurde der Precellys Homogenisator der Firma PEQLAB verwendet. Die Proben wurden in dem Gerät für 17 sec bei 5000 rpm mit Hilfe spezieller Precellys-Keramik-Kit Röhrchen, die ein Gemisch aus Keramik-Aufschlusskügelchen von 1,4 und 2,8 mm Durchmesser enthalten, homogenisiert. Die Überstände der Proben für die PCR wurden im Anschluss an den Homogenisierungsvorgang in NucleoSpin® Filtersäulen überführt und die RNA-Isolation wurde nach Anleitung durch den Hersteller durchgeführt (s.u.).

3.3 Analyse der Expression von Zielgenen

3.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde unter strengen RNAse freien Bedingungen entsprechend der Arbeitsvorschrift des Herstellers mit Hilfe des RNA-Isolationskits „NucleoSpin® RNA II“ der Firma MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Zur Isolation der RNA wurden zuvor eingefrorene Proben auf Eis aufgetaut. Um die Viskosität zu reduzieren und das Lysat zu reinigen wurden die Proben in NucleoSpin® Filter Säulen pipettiert und in diesen 1 min mit 11000 rpm zentrifugiert. Dem Filtrat wurde eine äquivalente Menge (350 µl bei Zellproben bzw. 600 µl bei Lungenproben) 70 %-iges Ethanol zur Bindung der RNA hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde das Gemisch in NucleoSpin® RNA II Säulen mit Auffangbehälter, welche die RNA im Filter binden, überführt und 30 sec bei 11000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Es wurden 350 µl MDB-Puffer auf jede Säule gegeben, um die Membran zu entsalzen. Im Anschluss folgte die erneute Zentrifugation mit 11000 rpm für 1 min, um die Membran zu trocknen. Das Filtrat wurde wieder verworfen. Es wurde DNA-Reaktions-Mix angesetzt, indem für jede Isolation 10 µl rDNAse mit 90 µl Reaktionspuffer für rDNAse vermischt wurde. 95 µl dieses Mixes

wurde auf jede Säule geben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu verdauen. Anschließend wurde die Membran in drei Schritten gewaschen. Zunächst erfolgte die Zugabe von 200 µl RA2 und Zentrifugation 30 sec bei 11000 rpm, dann die Zugabe von 600 µl RA3 und Zentrifugation 30 sec bei 11000 rpm sowie zuletzt die Zugabe von 200 µl RA2 und Zentrifugation 2 min bei 11000 rpm. Das Filtrat wurde nach jedem Waschschritt verworfen. Die NucleoSpin® RNA II Säule wurde dann in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt, bevor die reine RNA durch Zugabe von 60 µl RNAse freiem Wasser auf die Membran und Zentrifugation bei 11000 rpm für 1 Minute eluiert wurde. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C eingefroren oder kurzzeitig auf Eis gelagert und umgehend für die RT-PCR verwendet.

3.3.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Dieser Schritt ist erforderlich, um die Genexpression von Zielgenen untersuchen zu können. Es wurde ein Mastermix angesetzt.

Tab. 5: Ansetzen des Mastermix für die Reverse Transkription

Reagenzien	Menge der Reagenzien für eine Probe
H_2O RNAse frei	6 µl
Reaktionspuffer	4 µl
Dinukleotid-Mix	2 µl
Random Primer	2 µl
Protector RNAse Inhibitor	0,5 µl
Transkriptor Reverse Transkriptase	0,5 µl
RNA der Probe	**5 µl**
	= 20 µl

Je nach Anzahl der umzuschreibenden Proben wurde die Menge der Reagenzien ausgerechnet und gemischt. Es wurden jeweils 15 µl des Mastermixes in vorbereitete und beschriftete 500 µl Reagiergefäße pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 5 µl RNA. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle, bestehend aus 15 µl des Mastermixes und 5 µl H_2O, mitgeführt. Die Reagiergefäße wurden kurz zentrifugiert und in den Programmable Thermal Controller eingesetzt, das Programm wurde gestartet:

Hybridisierung	25 °C	10 min
Transkription in cDNA	50 °C	60 min
Enzym-Inaktivierung	85 °C	50 min
Kühlung	4 °C	

Bei weiterer Verwendung innerhalb kurzer Zeit wurden die Proben auf Eis gelagert. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

3.3.3 *Real-time* PCR

Die *Real-time* PCR ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der mRNA-Expression in den zu untersuchenden Proben, indem der gesuchte Genabschnitt gezielt vervielfältigt wird. SYBR-Green, ein Cyanin-Farbstoff, wird bei der Synthese in die DNA-Doppelstränge eingelagert. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufes, der aus mehreren Zyklen besteht, wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung vorgenommen.

Es wurde zunächst ein Mastermix angesetzt:

Tab. 6: Ansetzen des Mastermix für die *Real-time* PCR

Reagenzien	Menge der Reagenzien für eine Probe
H_2O RNAse frei	12,6 µl
$MgCl_2$	2,4 µl
Fast Start SYBR Green MIX	2 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
cDNA der Probe	**2 µl**
	= 20 µl

Je nach Anzahl der zu analysierenden Proben wurde die Menge der Reagenzien ausgerechnet und gemischt. Jeweils 18 µl des Mastermixes wurden in eine 20 µl LightCycler Kapillare pipettiert. Es folgte die Zugabe von 2 µl cDNA in jede Kapillare. In jedem Versuch wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus 18 µl des Mastermixes und 2 µl H_2O, mitgeführt. Die Kapillaren wurden kurz zentrifugiert und in den LightCycler eingesetzt. Das Programm wurde gestartet:

Denaturierung	95 °C	10 sec
Amplifizierung (45 x)		
Denaturierung (Auftrennen der DNA-Doppelstränge)	95 °C	10 sec
Annealing (Anlagerung der Primer)	60 °C	5 sec
Extension (DNA-Synthese)	72 °C	10 sec
Kühlen	40 °C	15 sec

Nach Beendigung des Laufes aus 45 Zyklen wurden die Kapillaren aus dem Gerät entnommen und verworfen.

Auswertung: Für die Durchführung der *Real-time* PCR wurde das Programm LightCycler Data Analysis von Roche Diagnostics GmbH verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft® Office Excel. Benötigt wurde für diese Auswertung die *Real-time* PCR mit einem Housekeeping-Gen (18sRNA) sowie die *Real-time* PCR mit einem Zielgen (z.B. VEGF oder ET-1). Die Ergebnisse wurden immer auf die nicht-infizierte, normoxische Mediumkontrolle bezogen und als relativ quantitative Veränderung im Vergleich zu Kontrolle angegeben [173].

3.4 Nachweis von Proteinen

3.4.1 Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Mittels Western Blot erfolgte der direkte Nachweis von Proteinen. Die Probengewinnung für die Western Blot-Analyse erfolgte wie oben beschrieben. Zunächst erfolgte die Vorbereitung von Trenn- und Sammelgel nach Schema (s. Abschnitt 2.4). Zwei Glasplatten wurden fest in den Western Blot-Gießstand eingespannt. Das Trenngel wurde zwischen diese Glasplatten pipettiert und mit etwas Aqua dest. überschichtet. Nach 30 min wurde das Aqua dest. abgegossen und das Sammelgel wurde auf das nun polymerisierte Trenngel pipettiert. Es wurde ein kleiner Plastikkamm eingesetzt, um in dem Sammelgel Taschen für Proben und Marker zu schaffen. Nach einer erneuten Polymerisierungszeit von 30 min wurden die Gele in den Glasplatten aus dem Gießstand genommen und die Plastikkämme entfernt. Die Gele wurden in den Glasplatten in die Elektrophoresevorrichtung eingespannt. Diese Vorrichtung wurde in eine Pufferbox gestellt, in die Pufferbox wurde Elektrophoresepuffer gegeben, so dass die Gele vollständig bedeckt waren. Die vorher eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und 5 min bei 95 °C denaturiert. Marker (7 µl) und Proben (je 35 µl) wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde gestartet. Zunächst wurde über 15 min eine Spannung von 70 V angelegt, anschließend wurde die Spannung für 45 min auf 200 V erhöht. Mittels der Elektrophorese erfolgte die Auftrennung der in den Proben enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten um die Gele sowie das Sammelgel entfernt. Die Blotkassetten wurden mit Schaumstoff, einer Nitrozellulosemembran,

Blotpapier und den Gelen bestückt und in das Blotmodul eingesetzt. Das Blotmodul wurde mit auf 4 °C gekühltem Blotpuffer gefüllt. Um eine konsequente Kühlung zu gewährleisten, wurden dazu Kühlakkus um das Blotmodul gelagert. Der Blot wurde gestartet, es wurde eine Spannung von 75 V über 90 min angelegt. Während des Blots erfolgte die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran.

Nach dem Blot wurde die Nitrozellulosemembran in ein Gefäß mit 15 ml Blockpuffer transferiert und für 1 h auf dem Schüttler geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Nach dem Blocken wurde die Membran zweimal über je 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Der Primärantikörper wurde in 10 ml Blockpuffer verdünnt und sorgfältig gemischt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Am folgenden Tag wurde die Nitrozellulosemembran erneut gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde vorbereitet, indem auch dieser Antikörper in Blockpuffer verdünnt wurde. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und anschließend erneut zweimaliges, jeweils 15 min andauerndes, Waschen der Nitrozellulosemembran.

Zur Visualisierung der spezifisch durch die Antikörper markierten Proteine wurde für jede Nitrozellulosemembran 1,5 ml der Entwicklerlösung angesetzt. Zur Entwicklung wurde die Nitrozellulosemembran in eine Röntgenkassette gelegt und die Entwicklerlösung wurde auf die Membran pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurde die überflüssige Entwicklerflüssigkeit abgenommen. Eine Klarsichtfolie wurde luftblasenfrei über die Membran gelegt. In der Dunkelkammer erfolgte das Einlegen von Röntgenfilmpapier in die Röntgenkassette, nach einer je nach Proteingehalt der Probe variierenden Belichtungszeit wurde das Filmpapier aus der Kassette entnommen und in Entwicklerflüssigkeit gelegt. Das Filmpapier wurde in Fixierflüssigkeit transferiert, bis es durchsichtig wurde. Es wurde in Leitungswasser gespült und dann getrocknet. Der auf der Nitrozellulosemembran deutlich sichtbare Marker wurde auf dem Filmpapier angezeichnet, um die entstandenen Banden nach ihrem Molekulargewicht spezifischen Proteinen zuzuordnen. Für jede Probe wurde neben den Zielproteinen das Housekeeping-Protein β-Aktin bestimmt. Die Intensitäten der Banden wurden mit der Software Bio-1D densitometrisch gemessen. Die Banden der Zielproteine wurden gegen die Banden des Housekeeping-Proteins normalisiert. Um eine relative Quantifizierung der Zielproteine zu erhalten, wurde jeweils die Bande der Kontrolle als 100 % definiert.

Sichtbare Schnitte in den Abbildungen der Western Blots stehen nicht für Inkubation der Proben auf unterschiedlichen Gelen, aus den Röntgenfilmen wurden lediglich die Banden der für diese Arbeit nicht relevanten Proben heraus geschnitten.

3.4.2 Stripping der Nitrozellulosemembran

Um die Ergebnisse des spezifischen Proteinnachweises in Beziehung zu der jeweils von einer Probe aufgetragenen Proteinmenge zu setzen, wurde von denselben Nitrozellulosemembranen der Nachweis von β-Aktin angestrebt. Die Membran wurde zweimalig für jeweils 5 min auf dem Schüttler mit Glycin-Puffer (pH 2,5) inkubiert, dadurch wurden die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper von der Nitrozellulosemembran gelöst. Es folgte zweimaliges Waschen über jeweils 15 min mit Waschpuffer, anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit 15 ml Blockpuffer über 1 h geblockt, es folgten dann Waschvorgänge sowie die Inkubation mit dem Primär- und dem Sekundärantikörper wie oben bereits beschrieben.

3.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) erfolgte der Nachweis von sezernierten Proteinen in den Zellüberständen. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von VEGF und TGF-β1 bestimmt. Die Probengewinnung für den ELISA erfolgte wie oben beschrieben. Die Durchführung erfolgte mittels ELISA-Kits der Firma R&D Systems nach Anleitung des Herstellers.

Es wurde ein ELISA nach der Sandwich-Technik durchgeführt, dieser verwendet zwei Antikörper, den Capture-Antikörper und den Detection-Antikörper, durch die das nachzuweisende Antigen an unterschiedlichen Stellen gebunden wird.

Das Kit zum Nachweis von VEGF enthielt bereits in den Well-Platten gebundene Capture-Antikörper. Für den Nachweis von TGF-β1 wurde der Capture-Antikörper in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert, so dass er nach einer Inkubationszeit über Nacht dort gebunden wurde. Anschließend wurden die Well-Platten mit Waschpuffer gewaschen, es folgte das Blocken und erneutes Waschen, bevor die zu analysierende Probe auf die Platte gegeben und inkubiert werden konnte. Jede Probe wurde zweimalig verwendet, um aus den späteren Ergebnissen Mittelwerte zu bilden. Es wurde außerdem ein Leerwert und eine Standardreihe pipettiert. Während der Inkubationszeit wurde der Antikörper spezifisch an das in den Zellüberständen vorhandene Antigen gebunden. Es folgten Waschschritte und

die Zugabe des Detection-Antikörpers, der an einem anderen Epitop als der Capture-Antikörper an das nachzuweisene Antigen bindet. So entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Der Detection-Antikörper ist mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase) markiert, bzw. erfolgte beim ELISA zum Nachweis von TGF-β1 die gesonderte Hinzugabe des Enzyms. Nach einem erneuten Waschvorgang konnte das Zugeben des Substrates erfolgen. Das Substrat wird von dem an dem Detection-Antikörper vorhandenen Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis über einen Farbumschlag erfolgt. Nach 20 min wurde Stopplösung auf die Wells gegeben. Im Microplate Reader wurde photometrisch der entstandene Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und quantifiziert.

3.5 Life/Death-Färbung

Die Life/Death-Färbung wurde durchgeführt um nachzuweisen, dass die A549-Zellen nach der Infektion mit NTHi überleben und morphologisch intakt sind. Die Färbung besteht aus zwei Farbstoffen, SYTO 16 und Ethidium-homodimer-2. Unter dem Immunfluoreszenz-mikroskop stellen sich vitale Zellen durch SYTO 16 grün dar, avitale Zellen zeigen sich durch Ethidium-homodimer-2 rot angefärbt.

Zunächst wurde die Färbung vorbereitet. Es wurden in einem 1,5 ml Reagiergefäß 200 µl PBS mit 1 µl SYTO 16 und 1 µl Ethidium-homodimer-2 vermischt. Von den Zellen in den 6-Well-Platten wurde das Medium abgenommen. Um die Zellen zu waschen wurde PBS in die Wells gegeben, diese leicht geschwenkt und das PBS umgehend wieder entfernt. Die vorbereitete Färbung wurde auf die Deckgläser gegeben und 1 h in einer feuchten Kammer in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert, bevor ein erneuter Waschvorgang mit PBS durchgeführt wurde. Es wurde dann 1 %-iges Paraformaldehyd auf die Deckgläser gegeben und die Färbung wurde für 10 min bei Dunkelheit fixiert. Das Paraformaldehyd wurde anschließend abgenommen und verworfen. Mit einer Pinzette wurden die Deckgläser aus den Wells entnommen und mit der zellbedeckten Seite nach unten in Eindecklösung (Mounting Fluid) auf einen Objektträger aufgebracht. Die Zellen wurden unter dem Immunfluoreszenzmikroskop angesehen. Anhand der Auszählung von 10 Gesichtsfeldern je Deckglas wurde die prozentuale Vitalität der Zellen 24 h nach der Infektion mit NTHi bestimmt. Die Objektträger wurden anschließend bei -20 °C in Dunkelheit gelagert.

3.6 Statistik

Die Auswertung der mit ELISA, Western Blot und *Real-time* PCR ermittelten Daten erfolgte zunächst mit Hilfe von Microsoft® Office Excel. Es wurden die Mittelwerte, Standardfehler und Standardabweichungen ermittelt. Für die graphische Darstellung wurden die Daten in das Programm Sigma Plot 2000 übertragen. Die Daten sind, soweit nicht anders angegeben, dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Mit Hilfe von GraphPad Prism 6 wurden Signifikanzen ermittelt. Hierzu wurde der ANOVA bzw. der 2-way ANOVA angewandt. Als signifikant gilt ein Wert, wenn $p<0,05$ ist. Diese Werte sind in Abbildungen mit * gekennzeichnet. Als höchstsignifikant gilt ein Wert, wenn $p<0,01$ ist, höchstsignifikante Werte sind in Abbildungen mit ** gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Zellvitalität 24 h nach der Infektion mit NTHi

Um sicher zu stellen, dass die A549-Zellen nach der Infektion mit NTHi weiterhin vital und stoffwechselaktiv sind, wurde zunächst die Zellvitalität 24 h nach der Infektion durch Anwendung der Life/Death-Färbung und anschließender Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Hierbei wurde stets eine Kontrolle, in der die Zellen ausschließlich in Medium kultiviert und nicht mit Erregern stimuliert wurden, mitgeführt. Der Versuch wurde unter Normoxie durchgeführt. Um die prozentuale Vitalität der Zellen zu ermitteln wurden jeweils 10 Gesichtsfelder betrachtet und die Zellen gezählt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob durch das Hinzugeben von 1 % fetalem Kälberserum (FKS) zum Infektionsmedium ein Unterschied in der prozentualen Vitalität der Zellen resultiert. Es zeigte sich in zwei unabhängigen Versuchen, dass der FKS-Gehalt des Infektionsmediums keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen nach der Infektion hat. In den weiteren Experimenten wurde daher Infektionsmedium ohne FKS verwendet.

Tab. 7: Vitalität der Zellen 24 h nach Stimulation in Infektionsmedium ohne FKS (n=2)

Infektionsmedium ohne FKS	Vitalität der Zellen 24 h nach der Infektion
Mediumkontrolle	99 %
Haemophilus influenzae 100 cfu/Zelle	99 %
Haemophilus influenzae 10 cfu/Zelle	99 %

Tab. 8: Vitalität der Zellen 24 h nach Stimulation in Infektionsmedium mit 1 % FKS (n=2)

Infektionsmedium, 1 % FKS	Vitalität der Zellen 24 h nach der Infektion
Mediumkontrolle	99 %
Haemophilus influenzae 100 cfu/Zelle	99 %
Haemophilus influenzae 10 cfu/Zelle	99 %

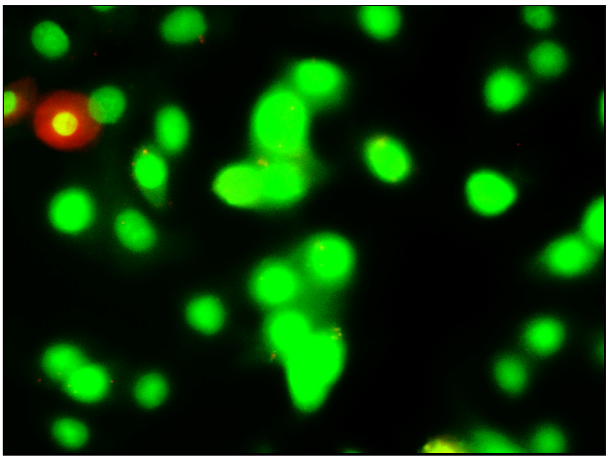


Abb. 3: Vitalität von A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit NTHi infiziert und über 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mittels Life/Death-Färbung gefärbt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-mikroskopie wurde die Zellvitalität bestimmt. Vitale Zellen sind grün angefärbt, avitale Zellen stellen sich rot dar. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment (n=2).

4.2 Nachweis hypoxischer Kulturbedingungen und einer effizienten Transfektion mit HIF-1α siRNA

Um nachzuweisen, dass in den unter Hypoxie kultivierten Proben die angestrebten hypoxischen Bedingungen bestehen, erfolgte der Nachweis der Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (HIF-1α) mittels Western Blot-Analyse.

Um das Ausmaß des Einflusses von HIF-1α auf die mRNA-Expression von VEGF und ET-1 näher zu betrachten, wurden A549-Zellen vor der Infektion mit HIF-1α small interfering RNA (siRNA) transfiziert. Mittels Western Blot wurde nachgewiesen, dass hierdurch die Stabilisierung von HIF-1α unter Hypoxie wirksam unterbunden werden kann (Abb. 4).

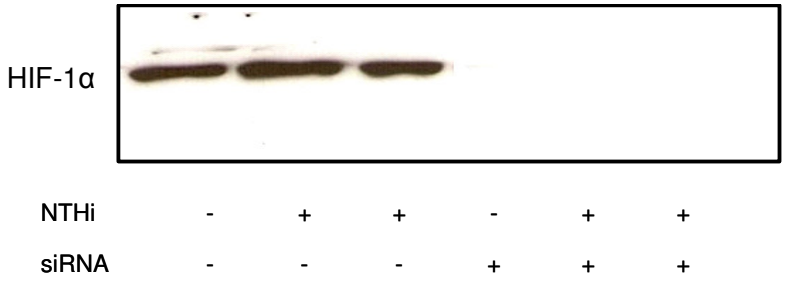


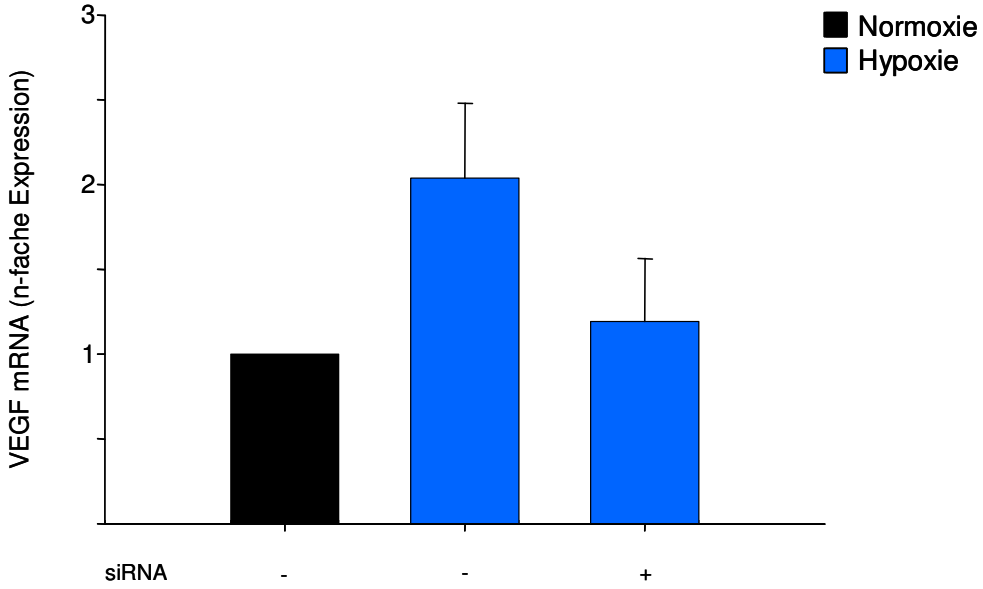
Abb. 4: Nachweis der Stabilisierung von HIF-1α unter Hypoxie sowie der Inhibition der Stabilisierung durch HIF-1α siRNA. A549-Zellen wurden für 24 h unter Hypoxie kultiviert. Mittels Präinkubation mit HIF-1α siRNA wurde die Stabilisierung von HIF-1α unterbunden (n=2).

4.3 Analyse der VEGF mRNA-Expression

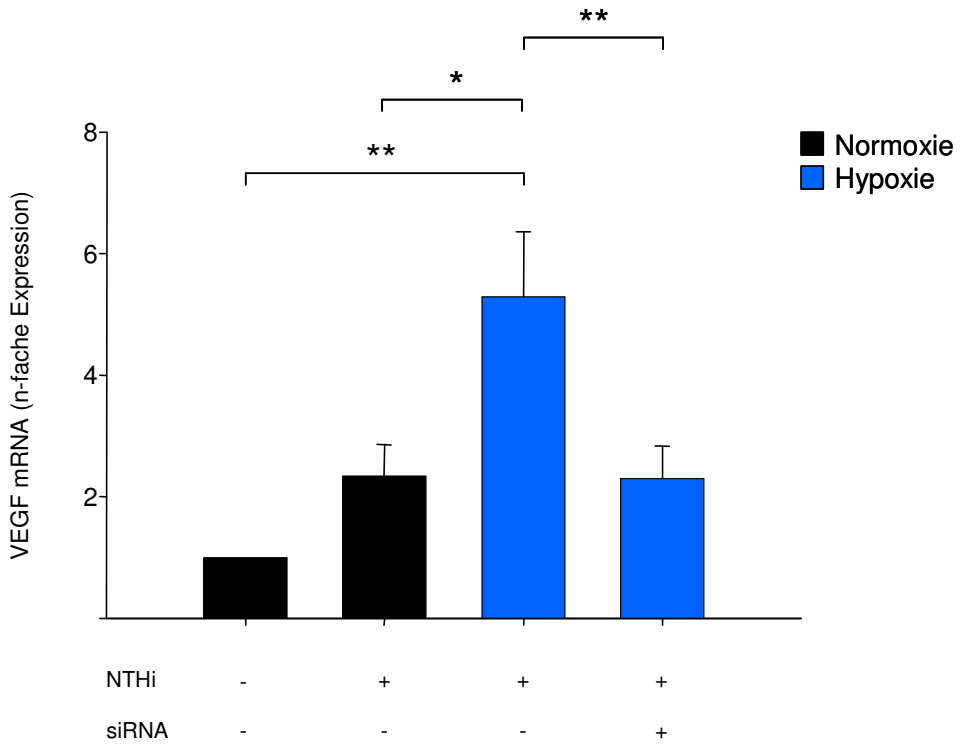
Mittels *Real-time* PCR wurde der Einfluss der Infektion mit NTHi sowie der Einfluss einer erniedrigten Sauerstoffkonzentration auf die Expression von VEGF mRNA in A549-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht. Es wurde jeweils eine nicht-infizierte, unter Normoxie inkubierte Mediumkontrolle mitgeführt.

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der VEGF mRNA-Expression zwischen der normoxischen Mediumkontrolle und nicht-infizierten Zellen, die unter Hypoxie (2 % O_2) inkubiert wurden (Abb. 5A). Ebenso führte auch die Infektion der Zellen mit NTHi nach einer Inkubationszeit von 24 h unter Normoxie (20,9 % O_2) zu keiner signifikanten Steigerung der Expression von VEGF mRNA (Abb. 5B/C). Die bakterielle Infektion unter hypoxischen Bedingungen resultierte jedoch in einem deutlichen Expressionsanstieg, der sich statistisch signifikant zeigte (Abb. 5B/C). Durch die Verwendung von HIF-1α siRNA in infizierten Proben unter Hypoxie zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung der Expression von VEGF mRNA (Abb. 5B/C).

A



B



C

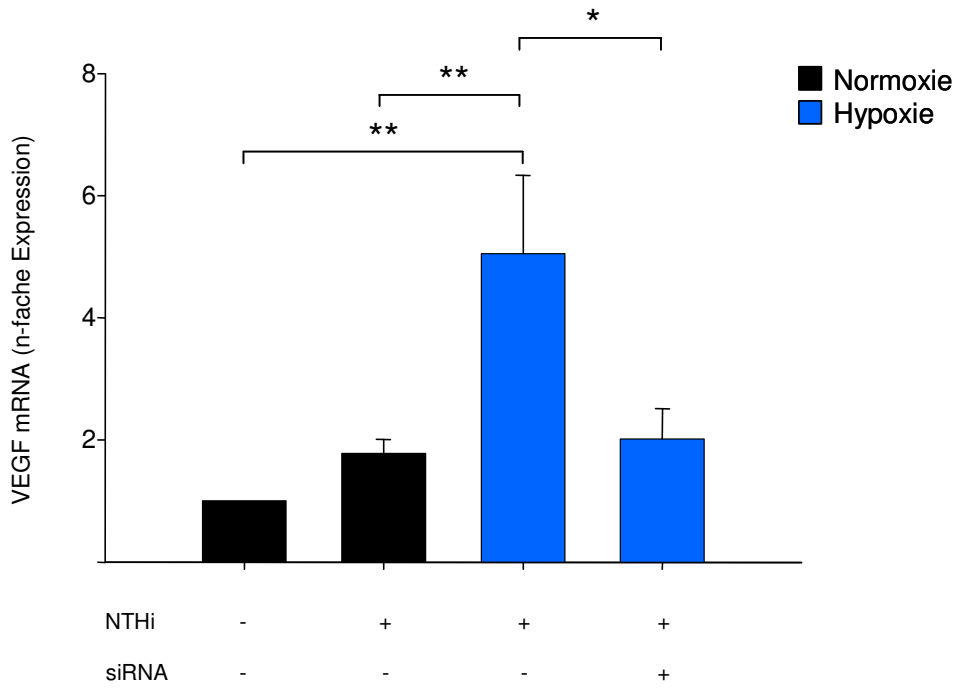


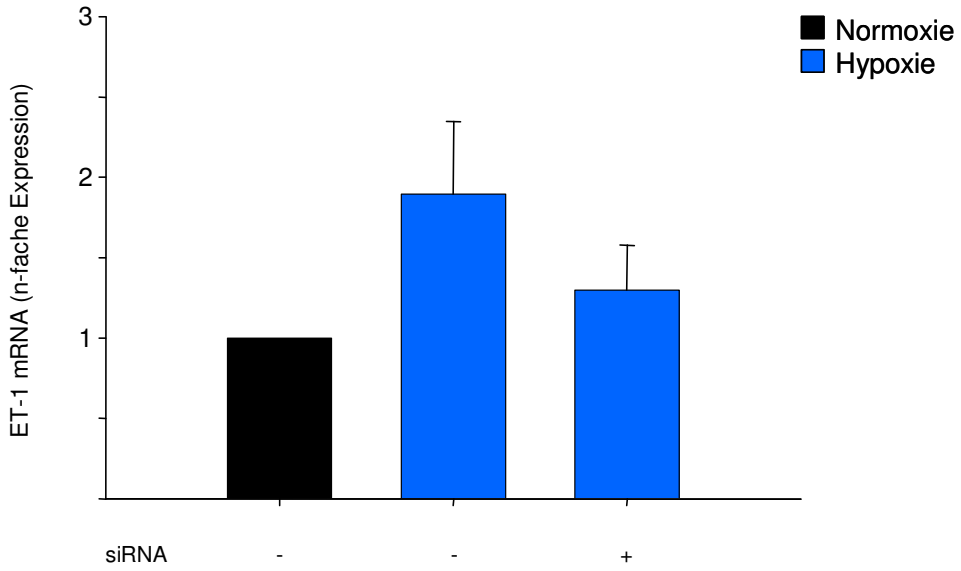
Abb. 5: Analyse der VEGF mRNA-Expression in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi 100 cfu/Zelle (B) bzw. 10 cfu/Zelle (C) und Inkubation über 24 h in Normoxie und Hypoxie. Präinkubation der Zellen mit HIF-1α siRNA. Bestimmung der VEGF mRNA-Expression mittels *Real-time* PCR (MW±SEM, n=10. *$p \leq 0{,}05$, **$p \leq 0{,}01$).

4.4 Analyse der ET-1 mRNA-Expression

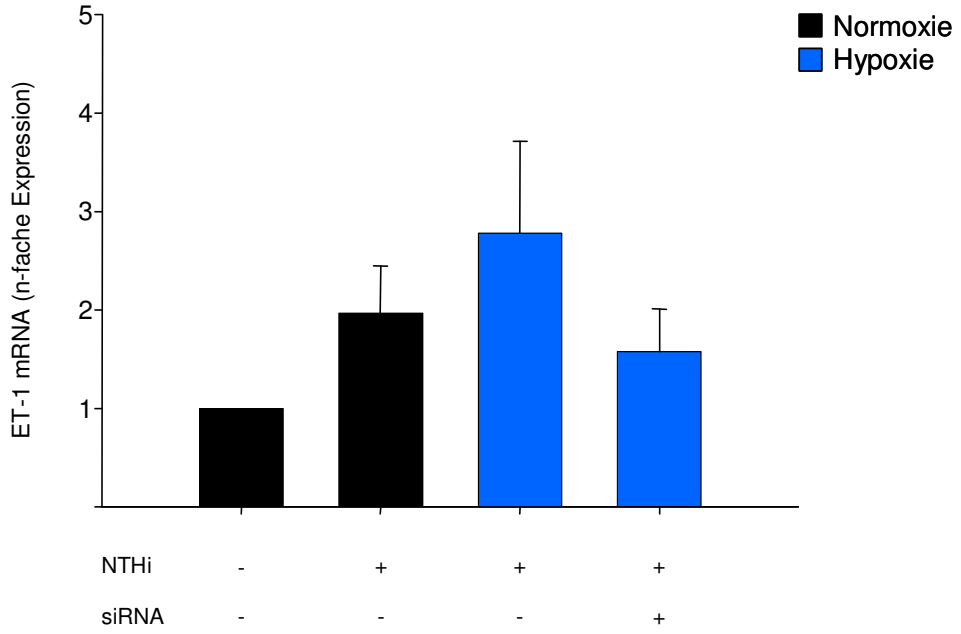
Mittels *Real-time* PCR wurde der Einfluss der Infektion mit NTHi sowie der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von ET-1 mRNA in A549-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht. Auch in diesen Versuchen wurde jeweils eine nicht-infizierte, unter Normoxie inkubierte Mediumkontrolle mitgeführt.

Weder die Infektion der Zellen mit NTHi noch die Inkubation unter Hypoxie resultierten in statistisch signifikanten Veränderungen der Expression von ET-1 mRNA (Abb. 6A-C).

A



B



C

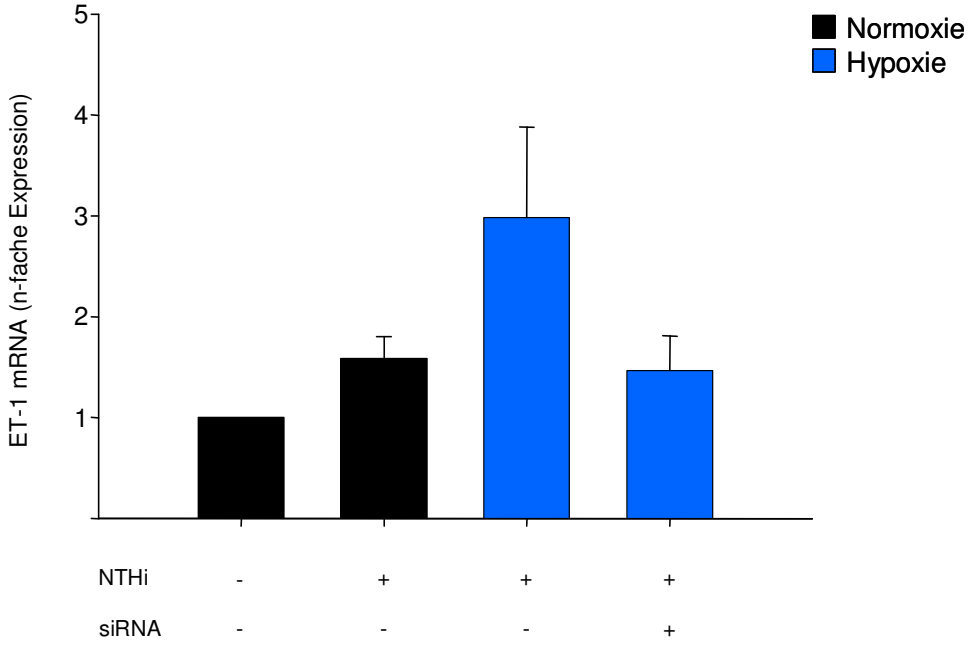


Abb. 6: Analyse der ET-1 mRNA-Expression in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi 100 cfu/Zelle (B) bzw. 10 cfu/Zelle (C) und Inkubation über 24 h in Normoxie und Hypoxie. Präinkubation der Zellen mit HIF-1α siRNA. Bestimmung der ET-1 mRNA-Expression mittels *Real-time* PCR (MW±SEM, n=10. *$p \leq 0{,}05$).

4.5 Untersuchung der VEGF-Sekretion

Basierend auf den Ergebnissen der Analysen mittels *Real-time* PCR wurde der direkte Nachweis von VEGF in Zellüberständen von A549-Zellen 24 h nach der Infektion mit NTHi mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) angestrebt.

In einer normoxischen, nicht-infizierten Mediumkontrolle konnten niedrige VEGF-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Infektion der Zellen mit NTHi (100 cfu/Zelle) führte unter Normoxie zu keinem signifikanten Anstieg der Sekretion von VEGF. Verglichen mit der normoxischen Mediumkontrolle zeigten nicht-infizierte Zellen unter Hypoxie einen signifikanten Anstieg der VEGF-Sekretion, nach bakterieller Infektion unter Hypoxie zeigte sich eine nochmals verstärkte Sekretion (Abb. 7). Durch den Einsatz von HIF-1α siRNA gelang es, einen deutlichen Abfall der VEGF-Sekretion unter Hypoxie herbeizuführen. Interessanterweise wurde die VEGF-Sekretion dabei unter die Ausgangswerte der nicht-infizierten Zellen unter normoxischer Inkubation vermindert (Abb. 8).

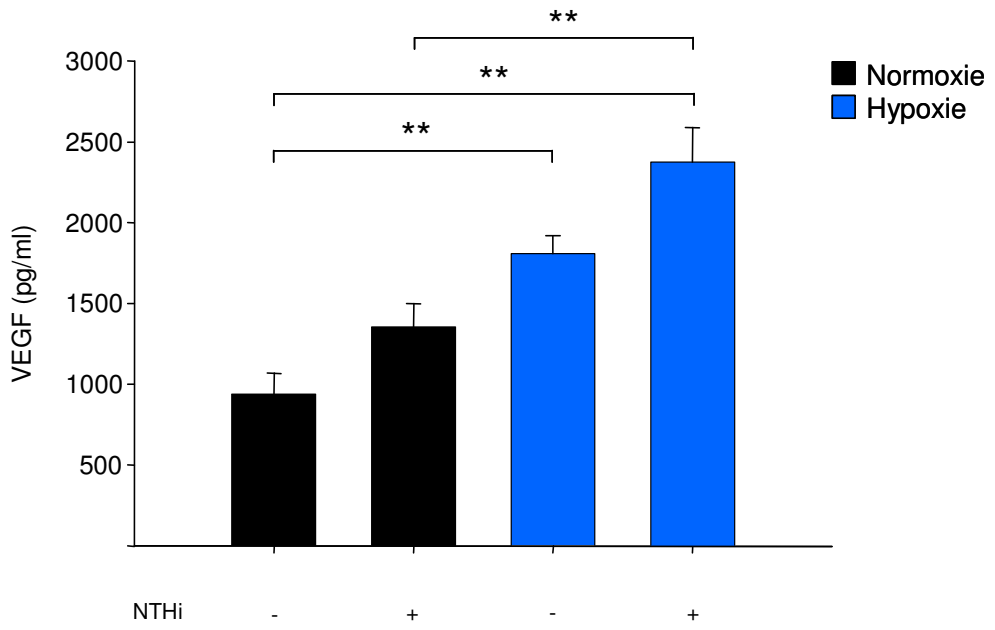


Abb. 7: Analyse der VEGF-Sekretion in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Bestimmung der VEGF-Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA (MW±SEM, n=5. **p ≤ 0,01).

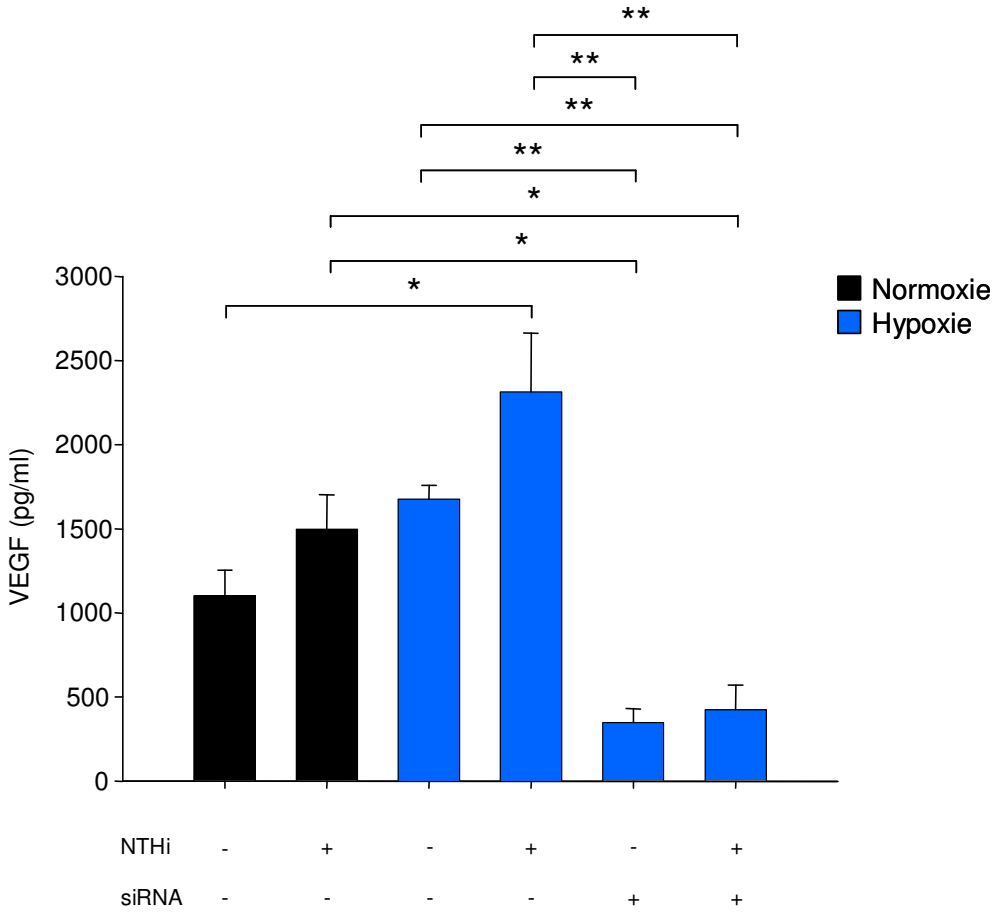


Abb. 8: Analyse der VEGF-Sekretion in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Präinkubation der Zellen mit HIF-1α siRNA. Bestimmung der VEGF-Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA (MW±SEM, n=3. *p ≤ 0,05).

4.6 Analyse der mRNA-Expression von ET-Rezeptor A und B

Mit Hilfe der *Real-time* PCR wurde die Expression der Endothelinrezeptoren A und B in A549-Zellen analysiert. Für beide Rezeptoren zeigten sich durch die Infektion mit NTHi oder die Inkubation unter Hypoxie keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression (Abb. 9/10).

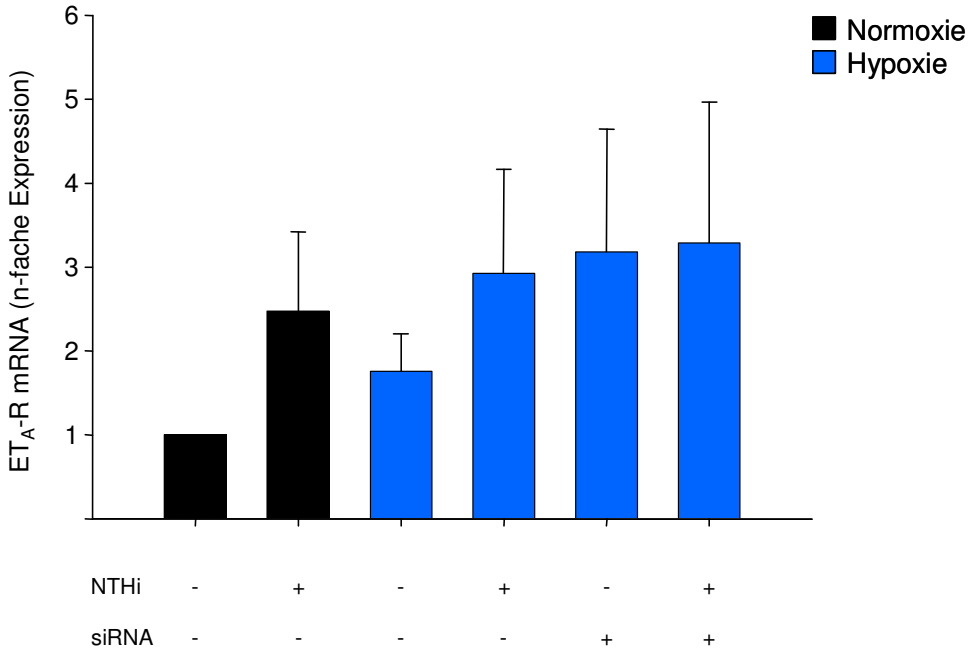


Abb. 9: Analyse der ET_A-Rezeptor mRNA-Expression in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Präinkubation der Zellen mit HIF-1α siRNA. Bestimmung der ET_A-Rezeptor mRNA-Expression mittels *Real-time* PCR (MW±SEM, n=6).

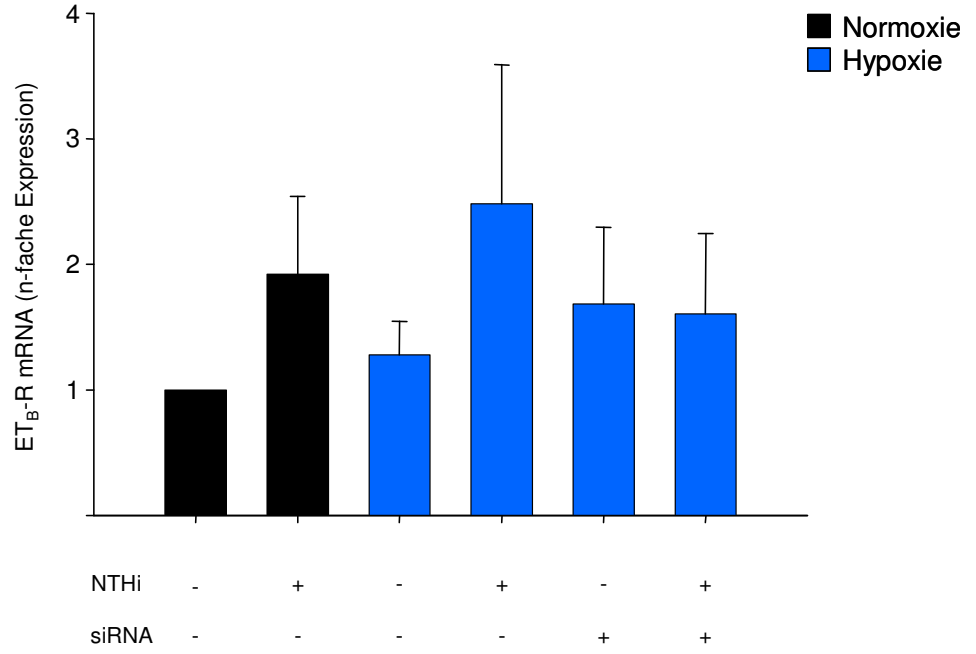


Abb. 10: Analyse der ET_B-Rezeptor mRNA-Expression in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Präinkubation der Zellen mit HIF-1α siRNA. Bestimmung der ET_B-Rezeptor mRNA-Expression mittels *Real-time* PCR (MW±SEM, n=6).

4.7 Untersuchung der TGF-β-Sekretion

Mittels ELISA wurde die Konzentration von TGF-β in den Überständen von A549-Zellen 24 h nach der Infektion mit NTHi analysiert. Hierbei zeigten sich weder unter Normoxie noch unter Hypoxie statistisch signifikante Veränderungen der TGF-β-Konzentration (Abb.11).

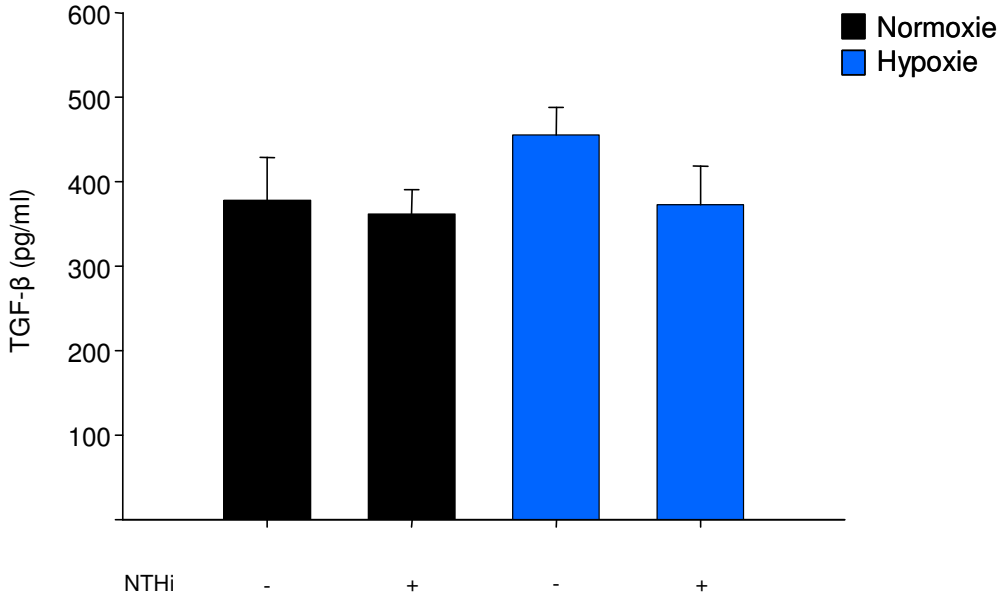


Abb. 11: Analyse der Sekretion von TGF-β in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Bestimmung der Konzentration von TGF-β in den Zellüberständen mittels ELISA (MW±SEM, n=4. *$p \leq 0,05$, **$p \leq 0,01$).

4.8 Nachweis der Expression zellulärer Marker

Um festzustellen, ob es durch die bakterielle Infektion von Alveolarepithelzellen zu strukturellen und morphologischen Veränderungen der Epithelzellen kommt, wurde 24 h nach der Infektion von A549-Zellen mit NTHi (100 cfu/Zelle) die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin sowie des mesenchymalen Markers Vimentin mittels Western Blot untersucht.

Unstimulierte Zellen exprimierten sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie den epithelialen Marker E-Cadherin. Die Infektion der Zellen mit NTHi, Inkubation unter Hypoxie oder eine bakterielle Stimulation unter Hypoxie resultierten in keiner statistisch signifikanten Veränderung der Expression von E-Cadherin (Abb. 12/13).

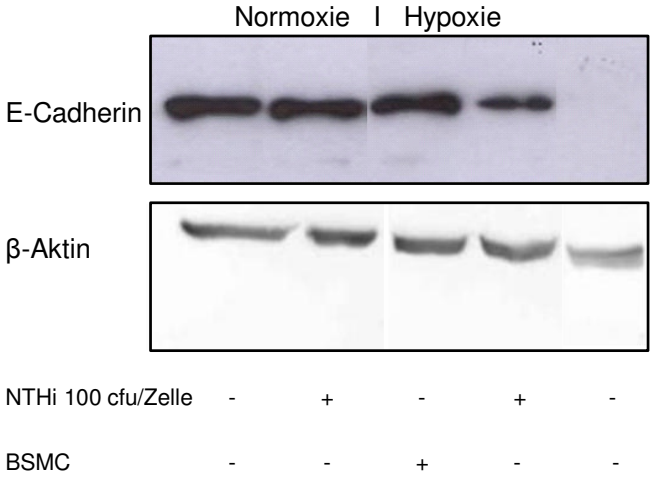


Abb. 12: Expression von E-Cadherin in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Bestimmung der Expression von E-Cadherin mittels Western Blot (Repräsentatives Experiment, n=4). Zellen der glatten Bronchialmuskulatur (BSMC) wurden als Negativkontrolle verwendet. β-Aktin wurde als Housekeeping-Protein in allen Proben bestimmt.

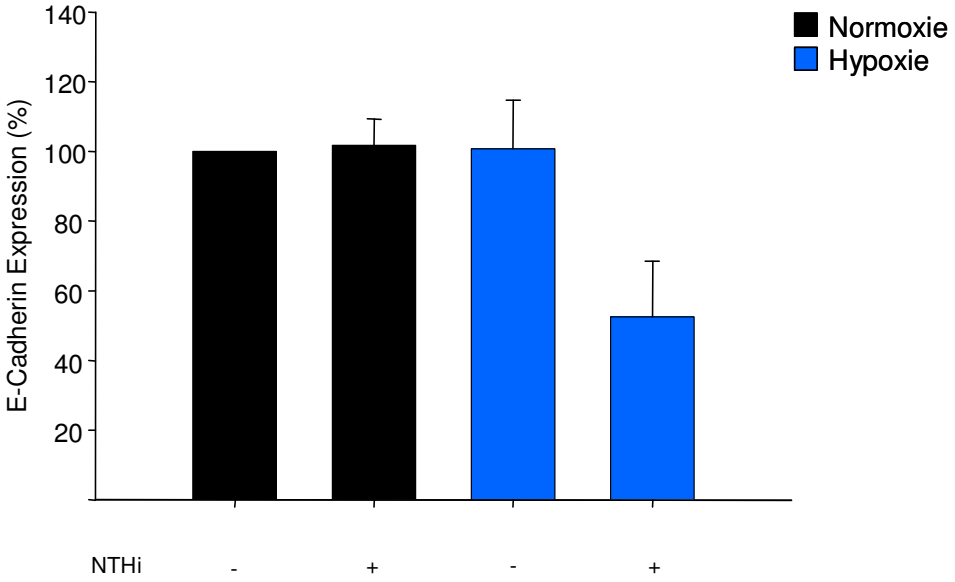


Abb. 13: Expression von E-Cadherin in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Bestimmung der Expression von E-Cadherin mittels Western Blot (MW±SEM, n=4).

Die Expression von Vimentin konnte in unstimulierten A549-Zellen nachgewiesen werden. Durch die bakterielle Infektion mit NTHi, Inkubation unter Hypoxie oder eine bakterielle Stimulation unter Hypoxie zeigten sich auch für Vimentin keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression (Abb. 14/15).

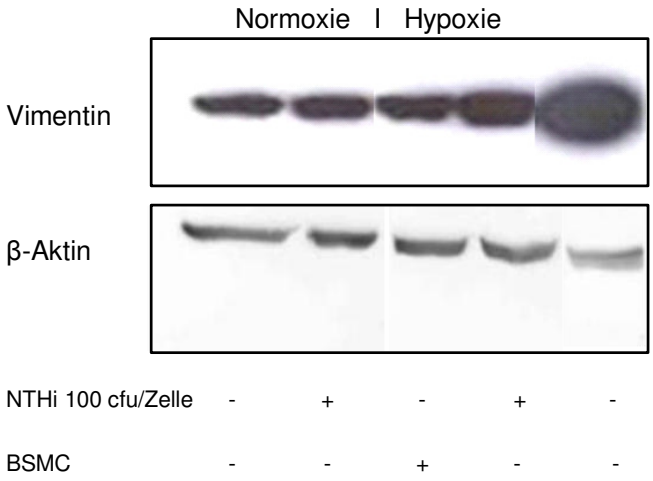


Abb. 14: Expression von Vimentin in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Bestimmung der Expression von Vimentin mittels Western Blot (Repräsentatives Experiment, n=4). Zellen der glatten Bronchialmuskulatur (BSMC) wurden als Positivkontrolle verwendet. β-Aktin wurde als Housekeeping-Protein in allen Proben bestimmt.

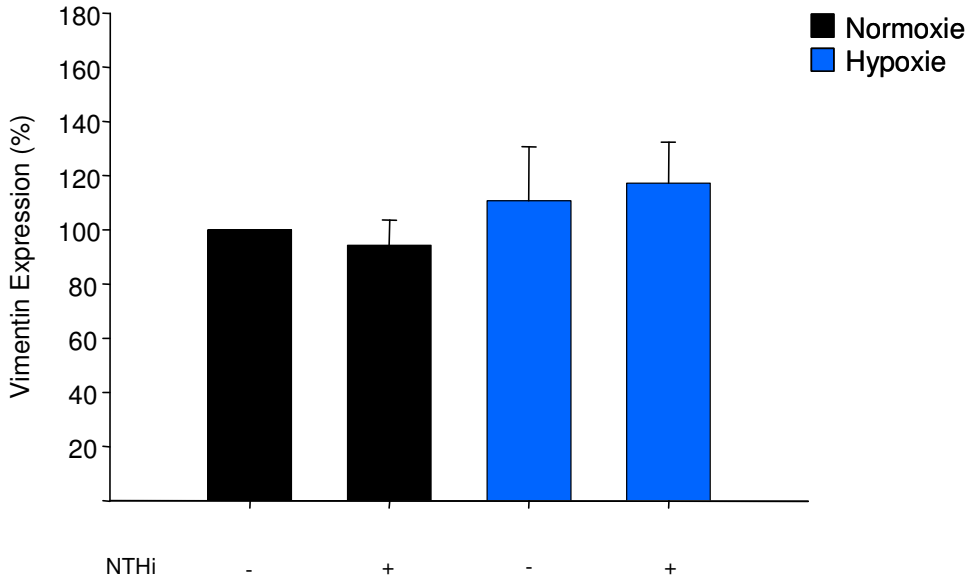


Abb. 15: Expression von Vimentin in A549-Zellen. Infektion von A549-Zellen mit NTHi und Inkubation über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie. Bestimmung der Expression von Vimentin mittels Western Blot (MW±SEM, n=4).

4.9 Analyse der Expression von VEGF und ET-1 mRNA in humanem Lungengewebe

Um neben den Zellkulturmodellen die Befunde in einem komplexeren Lungenmodell überprüfen zu können, wurden die Versuchsbedingungen auf ein humanes Lungengewebsmodell übertragen.

Kleine Stücke von humanem Lungengewebe wurden mit NTHi infiziert. 24 h nach der Infektion wurde die Expression von ET-1 und VEGF mRNA mittels *Real-time* PCR analysiert. Aufgrund der nicht standardisierten Bedingungen bei der Verwendung von menschlichem Lungengewebe von verschiedenen Patienten zeigte sich ein hoher Standardfehler in den Ergebnissen. Es konnten keine statistischen Signifikanzen für die Veränderungen der Expression von VEGF- und ET-1 mRNA durch Infektion mit NTHi, Inkubation unter Hypoxie oder eine bakterielle Stimulation unter Hypoxie nachgewiesen werden (Abb. 16/17).

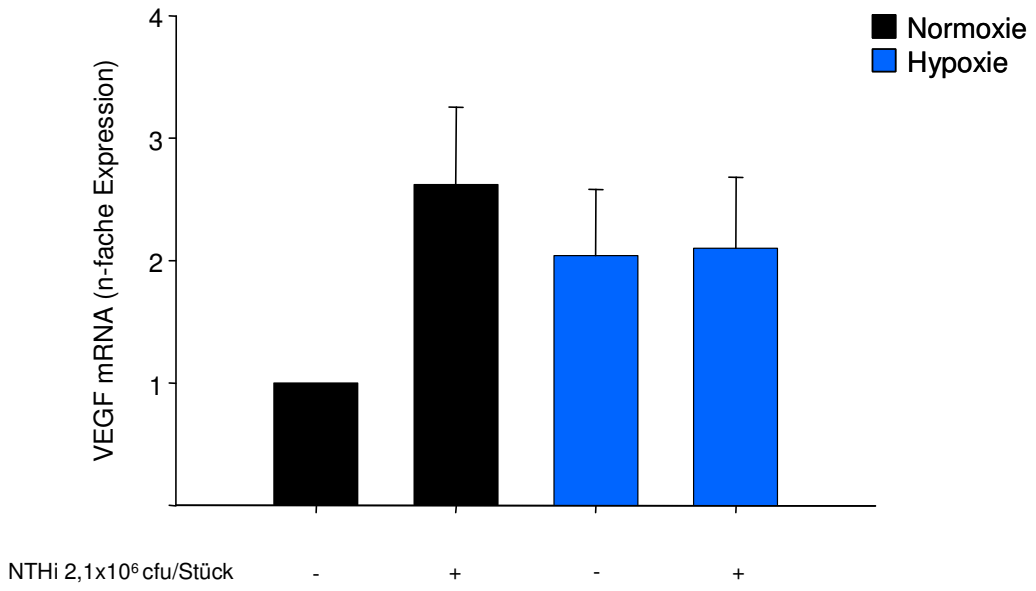


Abb. 16: Analyse der VEGF mRNA-Expression in humanem Lungengewebe. Stücke von humanem Lungengewebe wurden mit NTHi infiziert und über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert. Bestimmung der Expression von VEGF mRNA mittels *Real-time* PCR (MW±SEM, n=7. *$p \leq 0{,}05$).

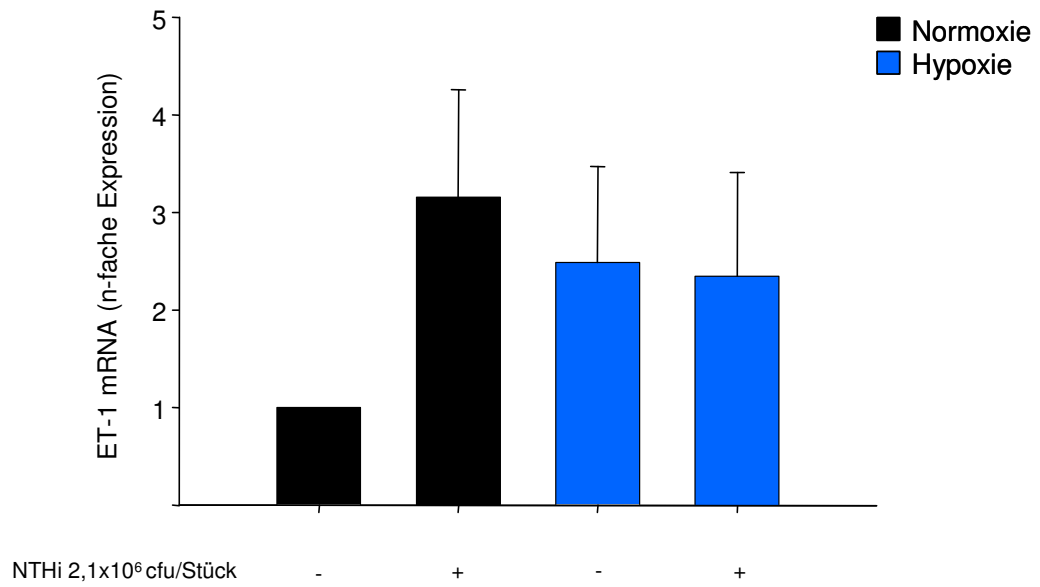


Abb. 17: Analyse der ET-1 mRNA-Expression in humanem Lungengewebe. Stücke von humanem Lungengewebe wurden mit NTHi infiziert und über 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert. Bestimmung der Expression von ET-1 mRNA mittels *Real-time* PCR (MW±SEM, n=7).

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Infektion von Alveolarepithelzellen mit NTHi auf die Expression von VEGF und ET-1 zu untersuchen. Ein zentraler Fokus wurde hierbei auf die Auswirkungen von Hypoxie gelegt. Um einen Anhalt für die Veränderung von Zellcharakteristika durch bakterielle Infektion und Hypoxie zu erhalten, wurde die Expression eines epithelialen und eines mesenchymalen Markers untersucht.

5.1 Einfluss von NTHi und Hypoxie auf die Expression von VEGF und ET-1 mRNA sowie die Sekretion von VEGF

Diese Arbeit zeigt, dass eine Infektion mit NTHi unter Hypoxie in Alveolarepithelzellen zu einer signifikanten Induktion der VEGF mRNA-Expression und der Sekretion von VEGF führt. Durch die Verwendung von HIF-1α siRNA in infizierten Proben unter Hypoxie zeigte sich eine signifikante Verminderung der Expression von VEGF mRNA und der Sekretion von VEGF, wobei die Sekretion von VEGF unter die Ausgangswerte normoxischer, nicht-infizierter Zellen vermindert wurde.

Bei der Untersuchung der Expression von ET-1 mRNA ließen sich durch Infektion mit NTHi und Inkubation unter Hypoxie keine statistisch signifikanten Veränderungen nachweisen.

Die Induktion von VEGF durch Bakterien wurde demonstriert [174-176]. So induziert *Pseudomonas aeruginosa* die Synthese von VEGF in Epithelzellen der Atemwege [174], *Streptococcus pneumoniae* fördert die Sekretion von VEGF durch neutrophile Granulozyten [176] und das LPS von *Escherichia coli* induziert VEGF in limbalen Fibroblasten [175].

Die Sekretion von ET-1 ist durch Viren induzierbar [177]. Zudem wurde die Induktion von ET-1 durch Bakterien postuliert: in humanen monozytären Zellen wurde die Induktion von ET-1 durch *Chlamydia pneumoniae* demonstriert [178] und für LPS, das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* sowie die gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Rhodococcus equi* wurde eine stimulierende Wirkung auf die Produktion von ET-1 in murinen Makrophagen nachgewiesen [179].

In dieser Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Anstieg von VEGF mRNA durch eine Infektion mit NTHi unter Normoxie nachgewiesen werden. Eine Infektion unter Hypoxie resultierte jedoch in einer signifikanten Induktion. Es wäre sinnvoll, für diese Versuche

eine Erhöhung der Fallzahl anzustreben um zu prüfen, ob sich dadurch auch unter Normoxie signifikante Veränderungen der Expression nach bakterieller Infektion zeigen.
Bei der Untersuchung der Expression von ET-1 mRNA ließen sich durch Infektion mit NTHi und Inkubation unter Hypoxie keine statistisch signifikanten Veränderungen nachweisen. Auch für diese Versuche wäre eine Erhöhung der Fallzahl sinnvoll. Möglich wäre auch, dass die Induktion von ET-1 mRNA eine andere Kinetik aufweist, somit wäre z.B. auch die ergänzende Untersuchung der Expression zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoll.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich erstmals auf die Analyse der VEGF und ET-1 mRNA-Expression sowie die Sekretion von VEGF durch Alveolarepithelzellen als Folge einer Infektion mit NTHi.
Die Rolle von VEGF in der Lunge ist kontrovers, da es sowohl physiologische als auch pathologische Wirkungen hat und in der Lunge sowohl eine protektive als auch eine schädliche Wirkung besitzt [180]. Wie oben dargestellt sind VEGF und ET-1 beteiligt an diversen pulmonalen Erkrankungen [126-129, 132, 165-168, 181], doch die Rolle von VEGF und ET-1 im Rahmen einer COPD ist noch nicht endgültig definiert [90, 94-99]. Es stellt sich jedoch dar, dass es deutliche Hinweise auf die Beteiligung von ET-1 und VEGF an der Pathogenese der COPD gibt. Unklar sind der Beitrag dieser Faktoren zu der Entstehung des pulmonalen Remodelings im Verlauf einer COPD sowie dessen exakter Mechanismus.
Remodeling der Atemwege beinhaltet eine Verdickung und einen Umbau der Atemwege im Sinne fibrotischer Veränderungen, eine Hypertrophie der glatten Muskulatur und eine gesteigerte Angiogenese [182-184]. Bisherige Studien geben insbesondere Auskunft über das pulmonal-vaskuläre Remodeling durch den Einfluss von VEGF und ET-1 [139, 180, 185]. Dabei kommt es zu einer Verdickung der Gefäßwände, Verengung der Lumina und daraus resultierend zu einem Anstieg des pulmonalen vaskulären Widerstandes. Diese Arbeit hingegen konzentriert sich vollständig auf die Wirkungen dieser Faktoren auf pulmonale Epithelzellen und beleuchtet somit neue Aspekte.
Betrachtet man die in unserer Arbeit erhaltenen Ergebnisse, so könnte die in einigen der oben genannten Studien demonstrierte Induktion von VEGF im Rahmen einer COPD eine Folge der bakteriellen Infektionen sein, die während der Erkrankung rezidivierend auftreten. Bei 38 % der COPD Patienten wurde in einer klinisch stabilen Krankheitsphase NTHi nachgewiesen [22]. Während der Erkrankung treten Exazerbationen auf, die in 60-

80 % durch Infektionen verursacht werden, in etwa 50 % sind Bakterien ursächlich [5, 25, 26, 186]. *Haemophilus influenzae* ist der häufigste bakterielle Verursacher einer akuten Exazerbation [29]. Die persistierenden und rezidivierenden Infektionen, einhergehend mit hypoxischen Bedingungen, könnten über den in unserer Arbeit nachgewiesenen Anstieg von VEGF beteiligt an einem Remodeling der Atemwege sein.

Es ist bewiesen, dass VEGF und ET-1 nicht die einzigen Faktoren sind, die ursächlich für ein Remodeling der Atemwege sind, sondern dieser Prozess ist durch das komplizierte Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren bedingt. Es ist unter anderem bekannt, dass das Endotoxin von *Haemophilus influenzae* in humanen Bronchialepithelzellen die Sekretion von IL-6 und IL-8 induziert [54]. Auch ET-1 besitzt eine induzierende Wirkung auf IL-6 und IL-8 [169]. Für IL-8 wurde, ebenso wie für VEGF und ET-1 in einigen Studien, ein Konzentrationsanstieg bei Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen. Es wurde im Vergleich zu VEGF eine noch stärkere Korrelation der IL-8 Konzentration mit einer Atemwegsobstruktion postuliert, somit zeigen sich auch für dieses Zytokin deutlich Hinweise auf eine Funktion im Remodeling der Atemwege [98].

Es ist sicher erforderlich, zum Beginn der Aufklärung der Mechanismen des Remodelings einzelne Faktoren zu betrachten, so wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Dennoch sollte bewusst sein, dass ein komplexes Zusammenspiel multipler Faktoren für den aufwändigen Prozess des pulmonalen Remodelings erforderlich ist.

Ein weiterer zu betrachtender Aspekt ist die Sauerstoffkonzentration, unter der die Versuchsdurchführung erfolgte. Die in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen als Normoxie bezeichneten Bedingungen entsprechen der Sauerstoffkonzentration in der atmosphärischen Luft. Diese differieren jedoch von der normalen Sauerstoffkonzentration im Gewebe, der für jedes Gewebe individuellen Gewebe-Normoxie [58]. Die in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse sind daher nur bedingt auf physiologische Verhältnisse übertragbar. Eine Anpassung der Zellkulturbedingungen an die Gewebe-Normoxie der Lunge wäre eine mögliche Konsequenz.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hypoxie-Versuchen wurde während der Infektion ein erniedrigter Sauerstoffgehalt von 2 % O_2 eingestellt. Bei vielen Erkrankungen kommt es in der Lunge zu hypoxischen Arealen [187]. Die COPD ist assoziiert mit lokaler pulmonaler und systemischer Inflammation [188]. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Abnahme der Lungenfunktion und zur Zerstörung des alveolären

Kapillarennetzwerkes, diese führen zu einem verminderten Sauerstofftransport und daraus resultierender alveolärer Hypoxie [79].

Es wurde demonstriert, dass ET-1 selbst die Stabilität von HIF-1α, dem Schlüssel-Transkriptionsfaktor unter hypoxischen Bedingungen, erhöht, resultierend in einem gesteigerten Vorhandensein des Transkriptionsfaktors sowohl unter Normoxie als auch, in einem höheren Ausmaß, unter Hypoxie. ET-1 imitiert somit zelluläre Hypoxie, die HIF-1α stabilisiert [189]. In Ovarialkarzinomzellen wurde nachgewiesen, dass ET-1, vermutlich über diesen Mechanismus, die Expression von VEGF induziert [189].

In dieser Arbeit zeigt sich durch den Einsatz von HIF-1α siRNA die Inhibition der VEGF mRNA-Expression auf eine Konzentration, die annähernd der unter Normoxie entspricht. Es konnte keine signifikante Veränderung der ET-1 mRNA-Expression durch HIF-1α siRNA gezeigt werden. Der Nachweis der Inhibition von VEGF mRNA lässt auf den HIF-1 Signalweg als verantwortlichen Weg für die Expression von VEGF schließen. Es gibt Hinweise darauf, dass auch andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Adaptation der Lunge auf Hypoxie spielen, aufgrund der gewonnenen Ergebnisse scheint jedoch für VEGF der HIF-1 Signalweg der bedeutendste zu sein. Eine frühere Studie demonstrierte ebenfalls eine abgeschwächte VEGF-Expression unter Hypoxie durch den Einsatz von HIF-1α siRNA [190].

In vivo Versuche an Ratten zeigten unter Hypoxie einen vermehrten Nachweis von VEGF im bronchoalveolären Sekret [89]. Des Weiteren ist bekannt, dass Hypoxie in Alveolarepithelzellen zu einer vermehrten Sekretion von VEGF führt, auch für die in dieser Arbeit verwendeten A549-Zellen wurde dieser Nachweis bereits erbracht [87-89]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikante VEGF-Induktion durch Infektion mit NTHi unter Hypoxie.

Interessanterweise zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen der VEGF-Sekretion nach Präinkubation der Alveolarepithelzellen mit HIF-1α siRNA eine Suppression der VEGF-Konzentration unter die Ausgangswerte nicht-infizierter Zellen unter Normoxie. Eine mögliche Erklärung könnte eine HIF-abhängige basale Freisetzung von VEGF durch Alveolarepithelzellen sein.

Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich eines Einflusses von Hypoxie bzw. Hypoxämie auf die ET-1-Konzentration sind inkonsistent. Einerseits wurde ein Anstieg des Plasma-ET-1 bei Hypoxämie postuliert [90-92], dahingegen zeigte eine *in vitro* Studie, dass Hypoxie zu einer reduzierten ET-1-Produktion in Alveolarepithelzellen führt [93]. Auch wurde eine Erniedrigung der ET-1-Sekretion durch A549-Zellen bei Hypoxie beschrieben,

wohingegen eine Sekretionssteigerung durch mikrovaskuläre Endothelzellen gezeigt wurde [87]. Sicher scheint, dass die Plasma-Konzentration von ET-1 bei Hypoxämie erhöht ist. Grenzen einer Messung der Plasma-Konzentration sind jedoch die nicht mögliche Definition des exakten Ursprungsortes und der produzierenden Zellen.
Im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben genannten Studien zeigen sich in dieser Arbeit durch Inkubation unter Hypoxie keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression von ET-1 mRNA in Alveolarepithelzellen. Die Sekretion von ET-1 wurde von uns nicht untersucht. Da insbesondere die Versuche von Signorelli et al. unter mit denen unserer Arbeit vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, bleibt die endgültige Bedeutung von Hypoxie für die ET-1-Expression weiterhin unklar [87].

Der in dieser Arbeit gezeigte statistisch signifikante Anstieg der VEGF mRNA-Expression durch die Infektion mit NTHi unter Hypoxie könnte einerseits durch eine schlichte Addition der Effekte entstehen. Wie oben dargestellt gibt es jedoch zunehmend Anhaltspunkte dafür, dass mikrobielle Pathogene selbst, auch unter normoxischen Bedingungen, die Fähigkeit besitzen, HIF-1α zu aktivieren oder dass Bakterien direkt die Stabilisierung von HIF-1α beeinflussen [68, 76, 77, 191]. Diese Arbeit konzentriert sich erstmals auf die Untersuchung von NTHi in diesem Zusammenhang.
Bezüglich des Zusammenspiels von Bakterien und Hypoxie wurde eine ausgeprägte Anpassungsfähigkeit der Bakterien an Veränderungen der Umweltbedingungen demonstriert. Hypoxie scheint die Expression von Virulenzgenen zu steigern. Bei *Staphylococcus aureus* konnte unter Hypoxie eine vermehrte Expression eines interzellulären Adhäsionsmoleküles, das für die Biofilmbildung erforderlich ist, nachgewiesen werden [192]. Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine durch Hypoxie induzierte erhöhte Produktion von Alginat, einem an der Biofilmbildung beteiligten Polysaccharid, nachgewiesen [61]. Auch *Haemophilus influenzae* besitzt die Fähigkeit, als Biofilm zu wachsen [193]. Möglich wäre auch für NTHi eine Zunahme der Biofilmbildung unter Hypoxie, wie sie für die anderen Bakterienspezies beschrieben wurde, und eine damit einhergehende gesteigerte Resistenz und eine stärkere Wirkung auf die infizierten Zellen.
Ein weiterer Mechanismus, durch den es unter Hypoxie zu einer verstärkten Wirkung von NTHi auf Alveolarepithelzellen kommen könnte, ist der Weg über den Platelet-Activating Factor receptor (PAFr). Der PAFr ist ein Rezeptor, der die Interaktion von Bakterien mit Epithelzellen vermittelt. Er wird auch auf der Oberfläche von Epithelzellen der Atemwege exprimiert [194]. NTHi adhäriert an Bronchialepithelzellen und invadiert diese über eine

Interaktion des Lipooligosaccharides mit dem PAFr [50]. Eine unter Hypoxie auftretende und HIF-1α abhängige gesteigerte Expression des PAFr führt zu einer erhöhten bakteriellen Translokation durch intestinale Epithelzellen, so dass eine Invasion der Serosa und intestinaler Blutgefäße möglich wird [195]. Diese bisherigen Erkenntnisse beruhen auf Untersuchungen des intestinalen Gewebes, doch sie könnten auf pulmonale Erkrankungen mit inflammatorischen und hypoxischen Bedingungen übertragbar sein. So wurde gezeigt, dass die Reduktion der PAFr-Expression in Alveolarepithelzellen die Invasionsfähigkeit von *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* vermindert [196].

Auch die Expression viraler Gene wird durch Änderungen von Umweltbedingungen beeinflusst, viele Viren zeigen eine gesteigerte Replikation unter Hypoxie, doch auch hemmende Effekte auf die Virusreplikation sind beschrieben. So zeigt das Herpes simplex Virus-1 (HSV-1) in unter Hypoxie kultivierten Tumorzellen eine gesteigerte Replikation und Hypoxie führt zu einer Induktion des Kaposi-Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV, HHV-8) [197, 198]. Das KSHV weist funktionelle virale hypoxia response elements (HREs) in Promoterregionen auf [199]. HIF aktiviert Zielgene über die Bindung an HREs [57], so dass die Promoter des KSHV unter Hypoxie durch erhöhte Level von HIF-1α und/oder HIF-2α aktiviert werden können [199]. Auch das humane Parvovirus B19 zeigt in unter Hypoxie kultivierten primären Erythroidzellen eine erhöhte Synthese des viralen Kapsid-Proteins sowie eine erhöhte Virusreplikation und -produktion [200]. In der B19-Promoterregion wurde eine HIF-binding site nachgewiesen und die Bindung von HIF wurde demonstriert [200]. Für das lymphozytäre Choriomeningitis-Virus wurden unter Hypoxie eine erhöhte Transkription von Virus-RNA und erhöhte Level viralen Proteins über einen HIF-abhängigen Mechanismus nachgewiesen sowie eine erhöhte Formation infektiöser Virionen unter Hypoxie gezeigt [201]. Das Respiratory Syncytial Virus (RSV) führt über die Freisetzung von NO zu einer Stabilisierung von HIF-1α in Bronchialepithelzellen, die Produktion von VEGF wird gesteigert und es entsteht das für RSV charakteristische Ödem der Atemwege [202].

HIF-1 spielt des Weiteren eine Rolle in der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren sowie der Tumorangiogenese [203, 204]. Auch bei viralen Infektionen, in deren Rahmen es zu der Entwicklung von Tumoren kommen kann, wurde ein Zusammenhang mit HIF-1α demonstriert. So stabilisiert das Hepatitis B Virus Protein X (Hbx), welches eine Rolle in der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms bei einer Hepatitis B-Infektion spielt, HIF-1α und fördert die Angiogenese in der Karzinomentstehung [205]. Die Infektion mit

dem Hepatitis C Virus (HCV) stabilisiert ebenfalls HIF-1α und führt über eine gesteigerte VEGF-Synthese zu einer Neovaskularisation [206].

Es zeigt sich somit deutlich, dass HIF-1α ein zentraler Faktor in der Regulation mikrobieller Infektionen und anderer pathogener Veränderungen ist. Der in dieser Arbeit demonstrierte deutliche Anstieg von VEGF mRNA bei Infektion mit NTHi unter Hypoxie lässt entsprechend dieser früheren Erkenntnisse vermuten, dass auch NTHi eine direkte Wirkung auf die HIF-1 Aktivierung bzw. Stabilisierung besitzt. Wie oben dargestellt liefert diese Arbeit Hinweise auf den HIF-1 Signalweg als verantwortlichen Weg für die VEGF-Induktion unter Hypoxie, so dass eine direkte Interaktion von NTHi mit HIF-1 ursächlich für einen Anstieg der Faktoren sein könnte. Der exakte Mechanismus dieser Induktion von HIF-1α ist derzeit noch unklar, möglich wäre z.B. analog zu in Studien mit *Bartonella henselae* und *Staphylococcus aureus* gewonnenen Ergebnissen eine verstärkte zelluläre Hypoxie nach bakterieller Stimulation [68, 76]. Um diesbezüglich weitere Hinweise zu erhalten, müsste auch die HIF-1α Expression unter Normoxie untersucht werden.

5.2 Einfluss von NTHi auf die Expression von VEGF und ET-1 mRNA in humanem Lungengewebe

Die Infektion von Lungengewebsstücken mit NTHi oder eine Inkubation unter Hypoxie führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Expression von VEGF und ET-1 mRNA. Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen somit die in der Zellkultur nachgewiesene signifikante Induktion von VEGF mRNA durch Infektion mit NTHi unter Hypoxie nicht.

Es könnte sein, dass die bakterielle Infektion im Gewebe ausgeprägter hypoxische Bedingungen induziert als in einer Zellkultur und deutliche Hypoxie somit bereits in den unter Normoxie infizierten Proben besteht.

Auch die zusätzliche Stimulation anderer Zellen könnte eine Abweichung der Ergebnisse erklären. Bei einer Stimulation von Gewebsstücken werden nicht nur Alveolarepithelzellen stimuliert. Die in der PCR gemessene VEGF und ET-1 mRNA-Expression spiegelt die Induktion im Gewebeverband wieder. Es wurde gezeigt, dass auch Makrophagen ET-1 produzieren [144]. So wurde in der akuten *ex vivo* Infektion von Lungengewebe mit dem intrazellulären atypischen Bakterium *Chlamydia pneumoniae* eine vorwiegende Infektion von Alveolarmakrophagen nachgewiesen [207]. Auch akute *ex vivo* Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* zeigten, dass, trotz einer Beteiligung von Alveolarepithelzellen, Alveolarmakrophagen die zentralen Zellen der Abwehr und der hauptsächliche Ursprung proinflammatorischer Zytokine in pulmonalen Infektionen sind [208]. Auch für NTHi

wurde gezeigt, dass Alveolarmakrophagen in einer akuten Infektion verglichen mit Alveolarepithelzellen zu einem höheren Anteil infiziert sind [22], so dass deutliche Hinweise darauf bestehen, dass Alveolarmakrophagen die wichtigsten Zielzellen einer akuten pulmonalen Infektion sein könnten.
Im Rahmen einer Infektion mit NTHi kommt es zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF-α. Für verschiedene Zellen und Gewebe wurde gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine direkt einen Anstieg von VEGF oder ET-1 induzieren können. So wurde in Mesothelzellen des Peritoneums ein Anstieg von VEGF nach Stimulation der Zellen mit IL-1α oder TNF-α nachgewiesen und in umbilikalvenösen Endothelzellen wurde ein Anstieg von VEGF mRNA durch IL-1α demonstriert [209, 210]. Auch die Stimulation peritonealer Makrophagen mit TNF-α und IL-1 und die Stimulation Neutrophiler mit LPS oder TNF-α resultierten in einer Induktion von VEGF [211, 212]. In vaskulären glatten Muskelzellen wurde eine vermehrte Freisetzung von ET-1 durch die Kombination von TNF-α und Interferon-γ nachgewiesen [213]. Die Inkubation humaner Bronchialepithelzellen mit IL-1α und -β oder TNF-α führte zu einer signifikanten Steigerung von ET-1 und IL-1β und TNF-α erhöhten die Freisetzung von ET in Lungen von Ratten [214, 215]. Dies wären somit auch in den Versuchen unserer Arbeit mögliche Mechanismen der VEGF- und ET-1-Induktion durch Infektion mit NTHi.

Auffällig waren in den Versuchen unserer Arbeit die starken Konzentrationsunterschiede der Faktoren im Vergleich der einzelnen Experimente. Ursächlich hierfür könnte die Individualität der Lungengewebsproben sein. Die verwendeten Lungenstücke stammen von Patienten, denen aufgrund einer pulmonalen Erkrankung Lungengewebe reseziert wurde. Für unsere Versuche wurde makroskopisch tumorfreies Gewebe verwendet, aktive inflammatorische Prozesse waren nicht bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass Lungen von COPD-Patienten auch während einer klinisch stabilen Krankheitsphase in vielen Fällen mit Bakterien besiedelt sind [22], daher muss die Möglichkeit einer bereits bestehenden inflammatorischen Reaktion in dem untersuchten Gewebe in Betracht gezogen werden.
Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die Patienten, von denen die Lungenstücke stammen, sich in unterschiedlichen Krankheitsstadien z.B. einer COPD befinden und, möglicherweise durch bereits stattgehabtes Remodeling der Lunge, starke Differenzen in der Lungenfunktion bestehen.

Ergänzend zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wäre eine Fixierung der Gewebsstücke und z.B. immunhistochemische Färbungen erforderlich, um eine Differenzierung der Expression von VEGF und ET-1 durch die verschiedenen Zelltypen zu ermöglichen und die durch NTHi induzierte Entzündungsreaktion im Gewebe detaillierter zu charakterisieren [207]. Des Weiteren müssten die Versuche in einer hohen Fallzahl wiederholt werden, um einen Einfluss individueller Faktoren, wie z.B. einer vorbestehenden Infektion des Gewebes, minimieren zu können.

5.3 Einfluss von NTHi auf die Expression von ET_A- und ET_B-Rezeptor mRNA

Diese Arbeit zeigt für beide Endothelinrezeptoren weder durch Infektion mit NTHi noch durch Inkubation unter Hypoxie statistisch signifikante Veränderungen der Expression. Auch die Transfektion der Zellen mit HIF-1α siRNA resultierte nicht in signifikanten Veränderungen der Expression des ET_A-R oder des ET_B-R.

Alveolarepithelzellen exprimieren beide Endothelinrezeptoren, überwiegend ist jedoch die Expression des ET_A-Rezeptors [86]. Es wurde gezeigt, dass ET-1 über den ET_B-Rezeptor die Funktion der Alveolarepithelzellen verschlechtert [163] und über eine durch den ET_A-Rezeptor mediierte TGF-β-Produktion eine epithelial-mesenchymale Transition induziert [86]. Beide Rezeptoren scheinen somit in eine Abnahme der Lungenfunktion involviert zu sein. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten *Real-time* PCR ist lediglich eine semi-quantitative Bestimmung der transkriptionellen Aktivität möglich. Die transkriptionelle Aktivität kann sich vom Expressionsmuster unterscheiden, eine Aussage über die überwiegende Expression eines Rezeptortyps ist daher mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich. Ergänzend müssten weitere Methoden wie z.B. Färbungen angewandt werden.

Für die Expression beider Rezeptoren wurde eine Bedeutung des HIF-1α Signalweges postuliert [189, 216]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch durch Blockade des HIF-1α Signalweges keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression beider Endothelinrezeptoren.

5.4 Auswirkungen der NTHi-Infektion auf die Sekretion von TGF-β

In Ergänzung zu der Entwicklung der Expression von VEGF und ET-1 und der Sekretion von VEGF wurde in dieser Arbeit die Sekretion des Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1) durch A549-Zellen nach einer Infektion mit NTHi untersucht. Es zeigten sich hierbei weder unter Normoxie noch unter Hypoxie signifikante Veränderungen der Konzentration von TGF-β1.

TGF-β ist ein multifunktionelles Protein, welches Wachstum, zelluläre Differenzierung, Apoptose, Wundheilung und multiple weitere Prozesse kontrolliert. Es besitzt somit sowohl funktionsfördernde als auch funktionsmindernde Funktionen im Gewebe und ist ein wichtiger Mediator für das Remodeling von Gewebe. Für TGF-β ist eine fibrose-induzierende Wirkung bekannt und es ist in die Entwicklung einer epithelial-mesenchymalen Transition involviert [86, 217-220]. In bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Patienten mit einer idiopathischen pulmonalen Fibrose finden sich erhöhte Konzentrationen von TGF-β1 [221]. Es wurde gezeigt, dass eine durch ET-1 induzierte epithelial-mesenchymale Transition über einen Anstieg von TGF-β1 entsteht [86]. Dieser Mechanismus der epithelial-mesenchymalen Transition wird durch diese Arbeit nicht bestätigt. Eine mögliche Erklärung für eine Verminderung der Sekretion von TGF-β1 wurde postuliert [22]. In Lungengewebe von COPD-Patienten wurde eine, durch die Infektion mit NTHi induzierte, vermehrte Expression des TGF-β-Pseudorezeptors BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) nachgewiesen [22]. Dieser Rezeptor stellt einen Pseudorezeptor dar, der TGF-β1 bindet und die Signalübertragung über die TGF-β-Rezeptoren inhibiert [222]. Durch die Bindung von TGF-β an den BAMBI könnte die Verminderung von TGF-β bei vermehrter Expression des BAMBI erklärt werden [22]. Es ist möglich, dass ein Anstieg des BAMBI als ein Schutz vor exzessivem Überschuss an TGF-β dienen könnte, der über dessen fibrogene Wirkung das Gewebe schädigen könnte [22].

In dieser Arbeit zeigten sich durch eine bakterielle Infektion oder Hypoxie keine statistisch signifikanten Konzentrationsänderungen von TGF-β1. Es kann somit durch die Ergebnisse dieser Arbeit keine der oben genannten Aussagen früherer Studien bestätigt werden.

5.5 Einfluss von NTHi auf die Expression von E-Cadherin und Vimentin

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unstimulierte Zellen unter Normoxie den epithelialen Marker E-Cadherin und den mesenchymalen Marker Vimentin exprimieren. Die Infektion der Zellen mit NTHi, Inkubation unter Hypoxie oder eine bakterielle Stimulation unter hypoxischen Bedingungen resultierten in keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Expression von E-Cadherin und Vimentin.

Eine Erhöhung der Fallzahl und eine Verlängerung der Inkubationszeiten wären für diese Versuche sinnvoll und würden möglicherweise zu statistisch signifikanten Veränderungen der Expression führen.

E-Cadherin ist ein transmembranes Protein, das von Epithelzellen exprimiert wird. Die extrazelluläre Domäne besteht aus mehreren Ca^{2+}-bindenden Teilbereichen. Durch die Bindung von Calcium-Ionen ist die extrazelluläre Domäne in der Lage, mit den extrazellulären Domänen eines E-Cadherin-Moleküles der benachbarten Zelle zu interagieren und an diese zu adhärieren [223]. Der zytoplasmatische Teil von E-Cadherin interagiert mit zytoplasmatischen Proteinen, den Cateninen, welche wiederum mit dem Aktin Zytoskelett innerhalb einer Zelle interagieren, dieser Mechanismus verstärkt die Adhäsion [224]. E-Cadherin schafft somit eine feste Adhäsion und eine epitheliale Stabilität. Es unterbindet die Dissoziation von Epithelzellen und gewährleistet den Erhalt der Zellpolarität [223]. Es wurde wiederholt gezeigt, dass die Expression von E-Cadherin im Rahmen einer Transition von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen abnimmt [218, 225-228].

Für andere Gewebe wurde der induzierende Einfluss von LPS auf eine epithelial-mesenchymale Transition über Smad2/3 und TGF-β [229] sowie über den TLR4 beschrieben [230]. Der Einfluss von Bakterien auf die Entwicklung einer epithel-mesenchymalen Transition in Alveolarepithelzellen scheint bisher noch unklar. Auch diese Arbeit liefert diesbezüglich keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Ergänzend zu einer Erweiterung der durchgeführten Versuche mit erhöhter Fallzahl und verlängerten Inkubationszeiten wäre die Untersuchung der Expression weiterer epithelialer Marker wie z.B. Cytokeratin und Zonula occludens-1, für die eine Expressionsabnahme während einer epithelial-mesenchymalen Transition vorbeschrieben ist, sinnvoll [231].

Humanes Vimentin ist ein Intermediärfilament Typ III [232], welches ein Element des Zytoskelettes darstellt. Das Zytoskelett, ein Netzwerk aus Intermediärfilamenten innerhalb des Zytoplasmas von Epithelzellen, ist für die Ordnung und Organisation des Zytoplasmas

verantwortlich, so dass eine mechanische Stabilität der Zellen besteht. Vimentin wird von mesenchymalen Zelltypen und diversen transformierten Zelllinien und Tumorzellen produziert [233] und es wird als Marker für einen mesenchymalen Zelltyp und als Marker für Sarkome verwendet [234]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von Vimentin im Rahmen einer Transition von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen ansteigt [218, 231]. Alveolarepithelzellen werden somit als Ursprung von Lungenfibroblasten, die durch eine epithelial-mesenchymale Transition entstehen, gesehen [227].

Weitere mesenchymale Marker, deren Expressionsanstieg im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transition beschrieben wurde, sind α-SMA und Desmin [231].

Eine frühere Studie demonstrierte, dass Hypoxie in Alveolarepithelzellen eine epithelial-mesenchymale Transition mit einer Abnahme der E-Cadherin-Expression und einer Zunahme der Vimentin-Expression induziert [235]. Es wurde postuliert, dass dieser Prozess abhängig ist von TGF-β1, involviert ist auch der HIF-1 Signalweg [235]. In unserer Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hypoxie zeigte sich nicht als ausreichendes Stimulans, um eine Abnahme der E-Cadherin-Expression zu induzieren, auch das Zusammenspiel von Hypoxie und NTHi resultierte nicht in statistisch signifikanten Veränderungen. Des Weiteren zeigte sich keine Abhängigkeit von TGF-β1. Zu beachten ist jedoch, dass die Versuchsbedingungen nicht identisch waren und deshalb eine eingeschränkte Vergleichbarkeit vorliegt. In unserer Arbeit wurde Hypoxie gleichgesetzt mit einem Sauerstoffgehalt von 2 %, die Inkubationszeit betrug 24 h. In der Arbeit von Zhou et al. wurde Hypoxie definiert mit einem Sauerstoffgehalt von 1,5 %, die Inkubation erfolgte über 8 Tage [235]. Es wäre somit interessant, auch die Versuche unserer Arbeit mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen und längeren Inkubationszeiten zu betrachten.

Des Weiteren könnte auch in diesem Zusammenhang die vermutete direkte Wirkung von Bakterien auf die Aktivierung von HIF-1 von Bedeutung sein [68, 76], übereinstimmend mit der zuvor beschriebenen Beteiligung des HIF-1 Signalweges für die Hypoxie-induzierte epithelial-mesenchymale Transition in Alveolarepithelzellen [235]. Um einen Hinweis auf den direkten Einfluss von NTHi auf die HIF-1-Expression zu erhalten, wäre ergänzend zu den Versuchen dieser Arbeit der Nachweis von HIF-1 unter Hypoxie bzw. unter Hypoxie und Infektion mit NTHi sinnvoll.

5.6 Schlussbetrachtung

Der Verlauf einer COPD ist gekennzeichnet durch rezidivierende und/oder persistierende respiratorische Infektionen. NTHi kolonisiert den Respirationstrakt während chronisch-stabiler Krankheitsphasen und ist der vorherrschende bakterielle Erreger akuter Exazerbationen. In den Infektionsmodellen führt eine Infektion mit NTHi unter Hypoxie zu einer signifikant gesteigerten VEGF mRNA-Expression sowie einer signifikant gesteigerten Sekretion von VEGF. Analysen der zellulären Marker E-Cadherin und Vimentin zeigten bei dem in dieser Arbeit angewandten Versuchsaufbau keine statistisch signifikanten Veränderungen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Infektionen mit NTHi über das gesteigerte Vorhandensein von VEGF und daraus resultierende, noch weitgehend unklare Mechanismen, zu strukturellen Lungenveränderungen beitragen und somit zum Fortschreiten einer COPD führen könnten.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Infektion von Alveolarepithelzellen (A549-Zellen) mit nicht-typisierbaren *Haemophilus influenzae* (NTHi), die im Rahmen einer COPD sowohl rezidivierend als auch persistierend auftritt, zu einer Induktion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Endothelin-1 (ET-1), beides vasoaktive Faktoren mit bekanntem Effekt auf das Remodeling der Atemwege, führt. Des Weiteren wurde der Einfluss von Hypoxie, die als eine Folge der reduzierten Ventilation der kleinen Luftwege während einer Entzündung im Gewebe auftreten kann, auf die Expression von VEGF und ET-1 untersucht.
Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF mRNA sowie die Sekretion von VEGF durch A549-Zellen im Rahmen einer bakteriellen Infektion unter Hypoxie signifikant ansteigen. Durch die Verwendung von siRNA gegen den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1α (HIF-1α) zeigte sich eine signifikante Verminderung der Expression von VEGF mRNA und der Sekretion von VEGF. Die Untersuchung der Expression von ET-1 mRNA zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen. Unter der Verwendung eines humanen Lungengewebsmodells konnte für VEGF und ET-1 mRNA keine statistisch signifikante Induktion durch NTHi und Hypoxie gezeigt werden.

Um das durch NTHi induzierte Remodeling in A549-Zellen genauer zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der Expression des epithelialen Zellmarkes E-Cadherin und des mesenchymalen Zellmarkers Vimentin mittels Western Blot. Weder die Infektion mit NTHi noch die Inkubation unter Hypoxie führte dabei zu statistisch signifikanten Veränderungen der Konzentration von E-Cadherin und Vimentin. Interessanterweise hatte die Infektion von A549-Zellen mit NTHi auch keinen Einfluss auf die Sekretion von TGF-β, den bisher am besten beschriebenen Mediator der epithelial-mesenchymalen Transition in Lungengewebe.
Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass bakterielle Infektionen der Lunge in einer Umgebung mit reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit zur Induktion des vasoaktiven Faktors VEGF führen, der das Remodeling von Lungenepithelzellen triggern kann. Insbesondere im Verlauf einer COPD, der durch rezidivierende oder persistierende bakterielle Infektionen gekennzeichnet ist, könnte dieser Ablauf eine essenzielle Bedeutung haben und einen Beitrag zum pulmonalen Funktionsverlust leisten.

7. Literaturverzeichnis

1. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Lung Disease*. Revised 2011, Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease.
2. Rabe, K.F., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(6): p. 532-55.
3. Pauwels, R.A., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(5): p. 1256-76.
4. *Nationale Versorgungsleitlinie COPD* Version 1.9 Januar 2012 basierend auf der Fassung vom Februar 2006, Programm für Nationale VersorgungsLeitlinien (Träger: BÄK, KBV, AWMF).
5. Sethi, S., *Infectious exacerbations of chronic bronchitis: diagnosis and management.* J Antimicrob Chemother, 1999. **43 Suppl A**: p. 97-105.
6. Burrows, B., et al., *Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function.* Am Rev Respir Dis, 1977. **115**(2): p. 195-205.
7. Scanlon, P.D., et al., *Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 381-90.
8. *Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society.* Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(5 Pt 2): p. S77-121.
9. Sethi, S., *Bacterial infection and the pathogenesis of COPD.* Chest, 2000. **117**(5 Suppl 1): p. 286S-91S.
10. Rosell, A., et al., *Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease.* Arch Intern Med, 2005. **165**(8): p. 891-7.
11. Sethi, S., *New developments in the pathogenesis of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(2): p. 113-9.
12. Monso, E., et al., *Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis.* Eur Respir J, 1999. **13**(2): p. 338-42.
13. Bagaitkar, J., D.R. Demuth, and D.A. Scott, *Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection.* Tob Induc Dis, 2008. **4**: p. 12.
14. Gonzalez-Quintela, A., et al., *Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities.* Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 42-50.
15. Jones, J.G., et al., *Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers.* Lancet, 1980. **1**(8159): p. 66-8.
16. Drannik, A.G., et al., *Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after Pseudomonas aeruginosa infection.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(11): p. 1164-71.
17. Stringer, K.A., et al., *Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(6): p. L1572-9.
18. Hodge, S., et al., *Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(6): p. 748-55.

19. Koch, A., et al., *Modification of surface antigens in blood CD8+ T-lymphocytes in COPD: effects of smoking.* Eur Respir J, 2007. **29**(1): p. 42-50.
20. Versteeg, D., et al., *Toll-like receptor 2 and 4 response and expression on monocytes decrease rapidly in patients undergoing arterial surgery and are related to preoperative smoking.* Shock, 2009. **31**(1): p. 21-7.
21. Knobloch, J., et al., *The T-helper cell type 1 immune response to gram-negative bacterial infections is impaired in COPD.* Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(2): p. 204-14.
22. Dromann, D., et al., *The TGF-beta-Pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae.* Respir Res, 2010. **11**: p. 67.
23. Moller, L.V., et al., *Haemophilus influenzae in lung explants of patients with end-stage pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 950-6.
24. Soler, N., et al., *Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J, 1999. **14**(5): p. 1015-22.
25. Decramer, M., W. Janssens, and M. Miravitlles, *Chronic obstructive pulmonary disease.* Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1341-51.
26. Sethi, S., *Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis.* Chest, 2000. **117**(5 Suppl 2): p. 380S-5S.
27. *Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen (akute Bronchitis, akute Exazerbation einer chronischen Bronchitis, Influenza und andere respiratorische Virusinfektionen) sowie ambulant erworbener Pneumonie*. 2009, S3-Leitlinie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und des Kompetenznetzwerkes CAPNETZ.
28. Mackay, A.J. and J.R. Hurst, *COPD Exacerbations: Causes, Prevention, and Treatment.* Med Clin North Am, 2012. **96**(4): p. 789-809.
29. Murphy, T.F., *Respiratory infections caused by non-typeable Haemophilus influenzae.* Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(2): p. 129-34.
30. Papi, A., et al., *Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(10): p. 1114-21.
31. Bandi, V., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(11): p. 2114-9.
32. Murphy, T.F., et al., *Persistent colonization by Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(3): p. 266-72.
33. Sethi, S., et al., *New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med, 2002. **347**(7): p. 465-71.
34. van Alphen, L., H.M. Jansen, and J. Dankert, *Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways.* Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(6): p. 2094-9; discussion 2099-100.
35. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
36. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development.* Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 49-79.

37. Murphy, T.F. and C. Kirkham, *Biofilm formation by nontypeable Haemophilus influenzae: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili.* BMC Microbiol, 2002. **2**: p. 7.
38. Duim, B., et al., *Antigenic drift of non-encapsulated Haemophilus influenzae major outer membrane protein P2 in patients with chronic bronchitis is caused by point mutations.* Mol Microbiol, 1994. **11**(6): p. 1181-9.
39. Duim, B., et al., *Fine mapping of outer membrane protein P2 antigenic sites which vary during persistent infection by Haemophilus influenzae.* Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4673-9.
40. Hiltke, T.J., et al., *Horizontal transfer of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease.* J Infect Dis, 2003. **188**(1): p. 114-7.
41. Gorter, A.D., et al., *Stimulation of the adherence of Haemophilus influenzae to human lung epithelial cells by antimicrobial neutrophil defensins.* J Infect Dis, 1998. **178**(4): p. 1067-74.
42. Henderson, I.R. and J.P. Nataro, *Virulence functions of autotransporter proteins.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1231-43.
43. Ronander, E., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae adhesin protein E: characterization and biological activity.* J Infect Dis, 2009. **199**(4): p. 522-31.
44. Ronander, E., et al., *Identification of a novel Haemophilus influenzae protein important for adhesion to epithelial cells.* Microbes Infect, 2008. **10**(1): p. 87-96.
45. St Geme, J.W., 3rd, M.L. de la Morena, and S. Falkow, *A Haemophilus influenzae IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells.* Mol Microbiol, 1994. **14**(2): p. 217-33.
46. Fink, D.L., B.A. Green, and J.W. St Geme, 3rd, *The Haemophilus influenzae Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV.* Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4902-7.
47. Hallstrom, T., et al., *Haemophilus influenzae protein E binds to the extracellular matrix by concurrently interacting with laminin and vitronectin.* J Infect Dis, 2011. **204**(7): p. 1065-74.
48. Amin, K., et al., *Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study.* Thorax, 2003. **58**(2): p. 135-42.
49. Swords, W.E., et al., *Binding of the non-typeable Haemophilus influenzae lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling.* Cell Microbiol, 2001. **3**(8): p. 525-36.
50. Swords, W.E., et al., *Non-typeable Haemophilus influenzae adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor.* Mol Microbiol, 2000. **37**(1): p. 13-27.
51. Ketterer, M.R., et al., *Infection of primary human bronchial epithelial cells by Haemophilus influenzae: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry.* Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 4161-70.
52. Rotta Detto Loria, J., et al., *Haemophilus Influenzae Infection Upregulates the NLRP3 Inflammasome and Leads to Caspase-1-Dependent Secretion of Interleukin-1beta - A Possible Pathway of Exacerbations in COPD.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66818.
53. Khair, O.A., R.J. Davies, and J.L. Devalia, *Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells.* Eur Respir J, 1996. **9**(9): p. 1913-22.

54. Khair, O.A., et al., *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**(12): p. 2109-16.
55. Berenson, C.S., et al., *Outer membrane protein P6 of nontypeable Haemophilus influenzae is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines.* Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2728-35.
56. Parameswaran, G.I., S. Sethi, and T.F. Murphy, *Effects of Bacterial Infection on Airway Antimicrobial Peptides and Proteins in COPD.* Chest, 2011. **140**(3): p. 611-7.
57. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(9): p. 609-17.
58. Carreau, A., et al., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia.* J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
59. Le, Q.T., et al., *An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1507-14.
60. Thomas, C., *Spezielle Pathologie.* F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1996.
61. Worlitzsch, D., et al., *Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients.* J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 317-25.
62. Hanly, P. and R.B. Light, *Lung mechanics, gas exchange, pulmonary perfusion, and hemodynamics in a canine model of acute Pseudomonas pneumonia.* Lung, 1987. **165**(5): p. 305-22.
63. Light, R.B., *Pulmonary pathophysiology of pneumococcal pneumonia.* Semin Respir Infect, 1999. **14**(3): p. 218-26.
64. Ivan, M., et al., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing.* Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
65. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
66. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
67. Weidemann, A. and R.S. Johnson, *Biology of HIF-1alpha.* Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 621-7.
68. Werth, N., et al., *Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens.* PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11576.
69. Taylor, C.T., *Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation.* J Physiol, 2008. **586**(Pt 17): p. 4055-9.
70. Rius, J., et al., *NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha.* Nature, 2008. **453**(7196): p. 807-11.
71. Walmsley, S.R., et al., *Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity.* J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 105-15.
72. Frede, S., et al., *Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB.* Biochem J, 2006. **396**(3): p. 517-27.
73. Belaiba, R.S., et al., *Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4691-7.
74. Peyssonnaux, C., et al., *HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes.* J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1806-15.

75. Peyssonnaux, C., et al., *Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis.* J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7516-9.
76. Kempf, V.A., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections.* Circulation, 2005. **111**(8): p. 1054-62.
77. Rupp, J., et al., *Chlamydia pneumoniae directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells.* Cell Microbiol, 2007. **9**(9): p. 2181-91.
78. Hartmann, H., et al., *Hypoxia-independent activation of HIF-1 by enterobacteriaceae and their siderophores.* Gastroenterology, 2008. **134**(3): p. 756-67.
79. Tuder, R.M., et al., *Hypoxia and chronic lung disease.* J Mol Med (Berl), 2007. **85**(12): p. 1317-24.
80. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.* Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
81. Tuder, R.M., B.E. Flook, and N.F. Voelkel, *Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide.* J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1798-807.
82. Voelkel, N.F., R.W. Vandivier, and R.M. Tuder, *Vascular endothelial growth factor in the lung.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(2): p. L209-21.
83. Semenza, G.L., *Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease.* Respir Res, 2000. **1**(3): p. 159-62.
84. Tipoe, G.L., et al., *Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia.* Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2006. **4**(3): p. 199-218.
85. Kranenburg, A.R., et al., *Enhanced bronchial expression of vascular endothelial growth factor and receptors (Flk-1 and Flt-1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax, 2005. **60**(2): p. 106-13.
86. Jain, R., et al., *Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(1): p. 38-47.
87. Signorelli, S., et al., *Differential effects of hypoxic stress in alveolar epithelial cells and microvascular endothelial cells.* Cell Physiol Biochem, 2010. **25**(1): p. 135-44.
88. Clerici, C. and C. Planes, *Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **296**(3): p. L267-74.
89. Pham, I., et al., *Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L1133-42.
90. Fujii, T., et al., *Plasma endothelin-1 level in chronic obstructive pulmonary disease: relationship with natriuretic peptide.* Respiration, 1999. **66**(3): p. 212-9.
91. Faller, M., et al., *Regulation of endothelin-1 at rest and during a short steady-state exercise in 21 COPD patients.* Pulm Pharmacol Ther, 1998. **11**(2-3): p. 151-7.
92. Spiropoulos, K., et al., *Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma.* Respir Med, 2003. **97**(8): p. 983-9.
93. Crestani, B., et al., *Hypoxia reduces endothelin production by rat alveolar type II cells in primary culture.* Eur Respir J, 1998. **11**(2): p. 392-9.

94. Bacakoglu, F., et al., *Plasma and bronchoalveolar lavage fluid levels of endothelin-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension.* Respiration, 2003. **70**(6): p. 594-9.
95. Kwon, Y.S., et al., *Plasma C-reactive protein and endothelin-1 level in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension.* J Korean Med Sci, 2010. **25**(10): p. 1487-91.
96. Carratu, P., et al., *Exhaled and arterial levels of endothelin-1 are increased and correlate with pulmonary systolic pressure in COPD with pulmonary hypertension.* BMC Pulm Med, 2008. **8**: p. 20.
97. Roland, M., et al., *Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax, 2001. **56**(1): p. 30-5.
98. Kristan, S.S., et al., *Airway angiogenesis in stable and exacerbated chronic obstructive pulmonary disease.* Scand J Immunol, 2012. **75**(1): p. 109-14.
99. Valipour, A., et al., *Circulating vascular endothelial growth factor and systemic inflammatory markers in patients with stable and exacerbated chronic obstructive pulmonary disease.* Clin Sci (Lond), 2008. **115**(7): p. 225-32.
100. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
101. Plouet, J., J. Schilling, and D. Gospodarowicz, *Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells.* Embo J, 1989. **8**(12): p. 3801-6.
102. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.* J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
103. Houck, K.A., et al., *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.* Mol Endocrinol, 1991. **5**(12): p. 1806-14.
104. Lahm, T., et al., *The critical role of vascular endothelial growth factor in pulmonary vascular remodeling after lung injury.* Shock, 2007. **28**(1): p. 4-14.
105. Monacci, W.T., M.J. Merrill, and E.H. Oldfield, *Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues.* Am J Physiol, 1993. **264**(4 Pt 1): p. C995-1002.
106. Kaner, R.J. and R.G. Crystal, *Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung.* Mol Med, 2001. **7**(4): p. 240-6.
107. Maniscalco, W.M., et al., *Vascular endothelial growth factor mRNA increases in alveolar epithelial cells during recovery from oxygen injury.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(4): p. 377-86.
108. Fehrenbach, H., et al., *Alterations in the immunohistochemical distribution patterns of vascular endothelial growth factor receptors Flk1 and Flt1 in bleomycin-induced rat lung fibrosis.* Virchows Arch, 1999. **435**(1): p. 20-31.
109. Brown, K.R., et al., *VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(4): p. L1001-10.
110. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.* Science, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.
111. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 359-71.
112. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction*

pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30336-43.
113. Gerber, H.P., V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13313-6.
114. Voelkel, N.F., et al., *Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension.* Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S251-6.
115. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.* J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
116. Bates, D.O. and F.E. Curry, *Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway.* Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 2): p. H687-94.
117. Brock, T.A., H.F. Dvorak, and D.R. Senger, *Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca2+ and von Willebrand factor release in human endothelial cells.* Am J Pathol, 1991. **138**(1): p. 213-21.
118. He, P. and F.E. Curry, *Depolarization modulates endothelial cell calcium influx and microvessel permeability.* Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 2): p. H1246-54.
119. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
120. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
121. Ku, D.D., et al., *Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries.* Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. H586-92.
122. Terman, B.I., et al., *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(3): p. 1579-86.
123. de Vries, C., et al., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor.* Science, 1992. **255**(5047): p. 989-91.
124. Kukk, E., et al., *VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development.* Development, 1996. **122**(12): p. 3829-37.
125. He, H., et al., *Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src.* J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25130-5.
126. Kaya, A., et al., *The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients.* Respir Med, 2004. **98**(7): p. 632-6.
127. Mata-Greenwood, E., et al., *Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(1): p. L222-31.
128. Fehrenbach, H., et al., *Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: light, fluorescence, and electron microscopy.* Anat Rec, 1999. **254**(1): p. 61-73.
129. Ando, M., et al., *Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* Lung, 2010. **188**(3): p. 247-52.

130. Meyer, K.C., A. Cardoni, and Z.Z. Xiang, *Vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with diffuse parenchymal lung disease.* J Lab Clin Med, 2000. **135**(4): p. 332-8.
131. Koyama, S., et al., *Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(3): p. 382-5.
132. Kasahara, Y., et al., *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema.* J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1311-9.
133. Kanazawa, H., et al., *Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Med, 2003. **114**(5): p. 354-8.
134. *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms*. 2011, Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft
135. Yuksel, H., et al., *Role of vascular endothelial growth factor antagonism on airway remodeling in asthma.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2013. **110**(3): p. 150-5.
136. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* 2012, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.
137. Heier, J.S., et al., *Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration.* Ophthalmology, 2012. **119**(12): p. 2537-48.
138. Inoue, A., et al., *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2863-7.
139. Fagan, K.A., I.F. McMurtry, and D.M. Rodman, *Role of endothelin-1 in lung disease.* Respir Res, 2001. **2**(2): p. 90-101.
140. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.* Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
141. Rockey, D.C., et al., *Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells.* Hepatology, 1998. **27**(2): p. 472-80.
142. Shinmi, O., et al., *Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain.* Biochem Biophys Res Commun, 1989. **164**(1): p. 587-93.
143. Resink, T.J., et al., *Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(3): p. 1303-10.
144. Ehrenreich, H., et al., *Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages.* J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1741-8.
145. Mattoli, S., et al., *Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **3**(2): p. 145-51.
146. Komuro, I., et al., *Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells.* FEBS Lett, 1988. **238**(2): p. 249-52.
147. Takuwa, N., et al., *A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts.* J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7856-61.
148. Ishikawa, T., et al., *Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria.* Am J Physiol, 1988. **255**(4 Pt 2): p. H970-3.

149. Ishikawa, T., et al., *Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide.* Pflugers Arch, 1988. **413**(1): p. 108-10.
150. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
151. de Nucci, G., et al., *Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9797-800.
152. Warner, T.D., et al., *Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit.* J Cardiovasc Pharmacol, 1989. **13 Suppl 5**: p. S85-8; discussion S102.
153. Liu, S., et al., *Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein jinase B/Akt.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49929-35.
154. Bousso-Mittler, D., et al., *Functional endothelin/sarafotoxin receptors in the rat uterus.* Biochem Biophys Res Commun, 1989. **162**(3): p. 952-7.
155. Rakugi, H., et al., *Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli.* Biochem Biophys Res Commun, 1988. **155**(3): p. 1244-7.
156. Uchida, Y., et al., *Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor.* Eur J Pharmacol, 1988. **154**(2): p. 227-8.
157. Wagner, O.F., et al., *Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells.* J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16066-8.
158. Topouzis, S., et al., *Modulation by endothelium of the responses induced by endothelin-1 and by some of its analogues in rat isolated aorta.* Br J Pharmacol, 1991. **102**(2): p. 545-9.
159. Arai, H., et al., *Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.* Nature, 1990. **348**(6303): p. 730-2.
160. Huggins, J.P., J.T. Pelton, and R.C. Miller, *The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine.* Pharmacol Ther, 1993. **59**(1): p. 55-123.
161. Ergul, A., et al., *Characterization of endothelin receptor subtypes on airway smooth muscle cells.* Exp Lung Res, 1995. **21**(3): p. 453-68.
162. Takimoto, M., et al., *Contraction of smooth muscle by activation of endothelin receptors on autonomic neurons.* FEBS Lett, 1993. **324**(3): p. 277-82.
163. Comellas, A.P., et al., *Endothelin-1 impairs alveolar epithelial function via endothelial ETB receptor.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(2): p. 113-22.
164. Sakurai, T., et al., *Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor.* Nature, 1990. **348**(6303): p. 732-5.
165. Sofia, M., et al., *Increased endothelin-like immunoreactive material on bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma and patients with interstitial lung disease.* Respiration, 1993. **60**(2): p. 89-95.
166. Swigris, J.J. and K.K. Brown, *The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis.* BioDrugs, 2010. **24**(1): p. 49-54.
167. Chalmers, G.W., et al., *Sputum endothelin-1 is increased in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J, 1999. **13**(6): p. 1288-92.
168. Ahmed, S.I., et al., *Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(4): p. 422-31.

169. Mullol, J., et al., *Endothelin-1 induces GM-CSF, IL-6 and IL-8 but not G-CSF release from a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B).* Neuropeptides, 1996. **30**(6): p. 551-6.
170. Uchida, Y., et al., *Involvement of endothelins in immediate and late asthmatic responses of guinea pigs.* J Pharmacol Exp Ther, 1996. **277**(3): p. 1622-9.
171. Kim, H., et al., *Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension.* Eur Respir J, 2000. **15**(4): p. 640-8.
172. Lourenco, A.P., et al., *Haemodynamic and neuroendocrine effects of tezosentan in chronic experimental pulmonary hypertension.* Intensive Care Med, 2012. **38**(6): p. 1050-1060.
173. Winer, J., et al., *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro.* Anal Biochem, 1999. **270**(1): p. 41-9.
174. Martin, C., et al., *Pseudomonas aeruginosa induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo.* Eur Respir J, 2011. **38**(4): p. 939-46.
175. Rodriguez-Martinez, S., et al., *Lipopolysaccharide from Escherichia coli induces the expression of vascular endothelial growth factor via toll-like receptor 4 in human limbal fibroblasts.* Exp Eye Res, 2006. **83**(6): p. 1373-7.
176. van Der Flier, M., et al., *Streptococcus pneumoniae induces secretion of vascular endothelial growth factor by human neutrophils.* Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4792-4.
177. Carr, M.J., et al., *Distribution of immunoreactive endothelin in the lungs of mice during respiratory viral infection.* Eur Respir J, 1998. **11**(1): p. 79-85.
178. Virok, D., et al., *Infection of U937 monocytic cells with Chlamydia pneumoniae induces extensive changes in host cell gene expression.* J Infect Dis, 2003. **188**(9): p. 1310-21.
179. Wahl, J.R., et al., *Murine macrophages produce endothelin-1 after microbial stimulation.* Exp Biol Med (Maywood), 2005. **230**(9): p. 652-8.
180. Kanazawa, H., *Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.* Med Sci Monit, 2007. **13**(11): p. RA189-195.
181. Kasahara, Y., et al., *Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(3 Pt 1): p. 737-44.
182. Mauad, T., E.H. Bel, and P.J. Sterk, *Asthma therapy and airway remodeling.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(5): p. 997-1009; quiz 1010-1.
183. Holgate, S.T., et al., *Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma.* Eur Respir J Suppl, 2003. **44**: p. 24s-29s.
184. Davies, D.E., et al., *Airway remodeling in asthma: new insights.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2): p. 215-25; quiz 226.
185. Aguirre, J.I., et al., *Vascular remodeling and ET-1 expression in rat strains with different responses to chronic hypoxia.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(5): p. L981-7.
186. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review.* Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(2): p. 336-63.

187. Schaible, B., K. Schaffer, and C.T. Taylor, *Hypoxia, innate immunity and infection in the lung.* Respir Physiol Neurobiol, 2010. **174**(3): p. 235-43.
188. McNicholas, W.T., *Chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea: overlaps in pathophysiology, systemic inflammation, and cardiovascular disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(8): p. 692-700.
189. Spinella, F., et al., *Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27850-5.
190. Hanze, J., et al., *RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(3): p. 571-7.
191. Haeberle, H.A., et al., *Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection.* PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3352.
192. Cramton, S.E., et al., *Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.* Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 4079-85.
193. Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley, *Evolving concepts in biofilm infections.* Cell Microbiol, 2009. **11**(7): p. 1034-43.
194. Ishii, S. and T. Shimizu, *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice.* Prog Lipid Res, 2000. **39**(1): p. 41-82.
195. Keely, S., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent regulation of platelet-activating factor receptor as a route for gram-positive bacterial translocation across epithelia.* Mol Biol Cell, 2010. **21**(4): p. 538-46.
196. Barbier, M., A. Agusti, and S. Alberti, *Fluticasone propionate reduces bacterial airway epithelial invasion.* Eur Respir J, 2008. **32**(5): p. 1283-8.
197. Aghi, M.K., et al., *Hypoxia enhances the replication of oncolytic herpes simplex virus.* Mol Ther, 2009. **17**(1): p. 51-6.
198. Davis, D.A., et al., *Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3244-50.
199. Haque, M., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains hypoxia response elements: relevance to lytic induction by hypoxia.* J Virol, 2003. **77**(12): p. 6761-8.
200. Pillet, S., et al., *Hypoxia enhances human B19 erythrovirus gene expression in primary erythroid cells.* Virology, 2004. **327**(1): p. 1-7.
201. Tomaskova, J., et al., *Hypoxia induces the gene expression and extracellular transmission of persistent lymphocytic choriomeningitis virus.* J Virol, 2011. **85**(24): p. 13069-76.
202. Kilani, M.M., et al., *RSV causes HIF-1alpha stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells.* Inflammation, 2004. **28**(5): p. 245-51.
203. Maxwell, P.H., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8104-9.
204. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.* Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
205. Moon, E.J., et al., *Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha.* Faseb J, 2004. **18**(2): p. 382-4.
206. Nasimuzzaman, M., et al., *Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor.* J Virol, 2007. **81**(19): p. 10249-57.

207. Dromann, D., et al., *[Pulmonary infections in human human lung tissue models].* Pneumologie, 2005. **59**(6): p. 422-4.
208. Xu, F., et al., *Modulation of the inflammatory response to Streptococcus pneumoniae in a model of acute lung tissue infection.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(5): p. 522-9.
209. Mandl-Weber, S., et al., *Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells.* Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 570-8.
210. Imaizumi, T., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1alpha--an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions.* Thromb Haemost, 2000. **83**(6): p. 949-55.
211. Perez-Ruiz, M., et al., *Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide.* Hepatology, 1999. **29**(4): p. 1057-63.
212. McCourt, M., et al., *Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis.* Arch Surg, 1999. **134**(12): p. 1325-31; discussion 1331-2.
213. Woods, M., et al., *Endothelin-1 is induced by cytokines in human vascular smooth muscle cells: evidence for intracellular endothelin-converting enzyme.* Mol Pharmacol, 1999. **55**(5): p. 902-9.
214. Saleh, D., et al., *Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(2): p. 187-93.
215. Dschietzig, T., et al., *Dexamethasone inhibits stimulation of pulmonary endothelins by proinflammatory cytokines: possible involvement of a nuclear factor kappa B dependent mechanism.* Intensive Care Med, 2001. **27**(4): p. 751-6.
216. Patel, N., et al., *Placenta growth factor augments endothelin-1 and endothelin-B receptor expression via hypoxia-inducible factor-1 alpha.* Blood, 2008. **112**(3): p. 856-65.
217. Willis, B.C. and Z. Borok, *TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L525-34.
218. Kasai, H., et al., *TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT).* Respir Res, 2005. **6**: p. 56.
219. Sime, P.J., et al., *Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung.* J Clin Invest, 1997. **100**(4): p. 768-76.
220. Fine, A. and R.H. Goldstein, *The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts.* J Biol Chem, 1987. **262**(8): p. 3897-902.
221. Khalil, N., et al., *Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis.* Thorax, 2001. **56**(12): p. 907-15.
222. Onichtchouk, D., et al., *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI.* Nature, 1999. **401**(6752): p. 480-5.
223. Vleminckx, K. and R. Kemler, *Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling.* Bioessays, 1999. **21**(3): p. 211-20.
224. Yap, A.S., et al., *Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function.* Curr Biol, 1997. **7**(5): p. 308-15.
225. Kim, J.H., et al., *Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells.* J Korean Med Sci, 2007. **22**(5): p. 898-904.

226. Gorowiec, M.R., et al., *Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF-beta1-dependent mechanism.* Free Radic Biol Med, 2012. **52**(6): p. 1024-32.
227. Tanjore, H., et al., *Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress.* J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30972-80.
228. Kamitani, S., et al., *Simultaneous stimulation with TGF-beta1 and TNF-alpha induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells.* Int Arch Allergy Immunol, 2011. **155**(2): p. 119-28.
229. Zhao, L., et al., *LPS-induced epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells.* J Surg Res, 2011. **171**(2): p. 819-25.
230. Jing, Y.Y., et al., *Toll-like receptor 4 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide.* BMC Med, 2012. **10**: p. 98.
231. Willis, B.C., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis.* Am J Pathol, 2005. **166**(5): p. 1321-32.
232. Fuchs, E. and K. Weber, *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.* Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 345-82.
233. Osborn, M., *Intermediate filaments as histologic markers: an overview.* J Invest Dermatol, 1983. **81**(1 Suppl): p. 104s-9s.
234. Leader, M., et al., *Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker.* Histopathology, 1987. **11**(1): p. 63-72.
235. Zhou, G., et al., *Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(6): p. L1120-30.

8. Anhänge

8.1 Stadieneinteilung der COPD nach GOLD

Tab. I: Stadieneinteilung der COPD nach GOLD [1]	
Stadium I (leichtgradige COPD)	$FEV_1/FVC < 70\%$ $FEV_1 \geq 80\%$ Soll Mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
Stadium II (mittelgradige COPD)	$FEV_1/FVC < 70\%$ $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ Soll Mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
Stadium III (schwere COPD)	$FEV_1/FVC < 70\%$ $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ Soll Mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
Stadium IV (sehr schwere COPD)	$FEV_1/FVC < 70\%$ $FEV_1 < 30\%$ Soll oder < 50 % Soll und chronische respiratorische Insuffizienz (Definition chronische respiratorische Insuffizienz: arterieller O_2-Partialdruck unter 60 mmHg mit oder ohne arteriellen CO_2-Partialdruck über 50 mmHg bei Atmen von Raumluft auf Meeresniveau)

8.2 Einverständniserklärung der Lungengewebsstudie

Einverständniserklärung

(zum Verbleib beim Prüfarzt)

zur Studie: Rolle der Erregerpersistenz bei chronischer Bronchitis: Eine Untersuchung an humanen Lungenschnitten

Ich bin heute über die Studie „Rolle der Erregerpersistenz bei chronischer Bronchitis: Eine Untersuchung an humanen Lungenschnitten“ mündlich und schriftlich informiert worden und stimme der Teilnahme an der Studie zu. Ich habe aktuell keine weiteren Fragen. Ich habe die schriftliche Patienteninformation erhalten. Ferner bestätige ich, dass ich mit der wissenschaftlichen Auswertung meiner anonymisierten, personenbezogenen Daten einverstanden bin. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit ohne die Angabe von Gründen meine Zustimmung widerrufen kann.

Lübeck, den

Unterschrift des Probanden:

Unterschrift des aufklärenden Arztes:

Abb. I: Einverständniserklärung der Lungengewebsstudie

9. Publikationen und Präsentationen

9.1 Publikationen

Kaufhold I, **Osbahr S**, Rohmann K, Drömann D, Goldmann T, Shima K, Dalhoff K, Rupp J. Mechanisms of E-cadherin regulation in bacterial infections of lung epithelial cells. *In preparation*

Drömann D, Rupp J, Rohmann K, **Osbahr S**, Ulmer AJ, Marwitz S, Röschmann 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: p. 67.

9.2 Präsentationen

Osbahr S, Rohmann K, Droemann D, Dalhoff K, Solbach W, Rupp J: Das Zusammenspiel von bakterieller Infektion und erniedrigter Sauerstoffkonzentration trägt zur epithelial-mesenchymalen Transition in Lungenepithelzellen bei.
Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2011, Posterpräsentation.

Osbahr S, Droemann D, Dalhoff K, Solbach W, Rupp J: Interplay between bacterial infection and low oxygen sensing contributes to epithelial-mesenchymal transition in lung epithelial cells.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2010, Posterpräsentation.

Osbahr S, Droemann D, Dalhoff K, Rupp J: Interplay between bacterial infections, hypoxia and the development of chronic lung diseases.
Congress of the European Respiratory Society 2009, E-communication.

Osbahr S, Dalhoff K, Rupp J: Wenn der Lunge die Luft weg bleibt…Die Folgen einer Infektion von Lungenzellen mit den Bakterien *Haemophilus influenzae* und *Chlamydia pneumoniae* unter der Berücksichtigung des erniedrigten Sauerstoffangebotes während einer Lungenentzündung. 3. Lübecker Doktorandentag 2009, Posterpräsentation.

10. Danksagungen

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen nicht durchführbar gewesen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp und Herrn Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit sowie die hervorragende Betreuung. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe mitarbeiten zu dürfen, die umfassende Beratung bei der Planung und Durchführung der Versuche sowie die Unterstützung in allen inhaltlichen und methodischen Fragen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Zabel und Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Medizinischen Klinik III sowie im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.

Des Weiteren danke ich Anke Hellberg, Sigrid Pätzmann, Angela Gravenhorst, Kristin Wischnat, Ute Knuppertz und Heike Sauerbier für die umfassende Einarbeitung, die Unterstützung bei den methodischen Laborarbeiten, ihre ständige Hilfsbereitschaft sowie die freundliche Atmosphäre im Labor. Kristina Rohmann danke ich für die Einarbeitung in das Lungengewebsmodell und Inga Kaufhold danke ich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bei den Versuchen mit diesem Modell.

Ich danke der Klinik für Chirurgie des UK-SH, Campus Lübeck, insbesondere Herrn Prof. Dr. med. P. Kujath, für die Möglichkeit zur Realisierung der Lungengewebsversuche.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern und meinem Ehemann für ihre uneingeschränkte Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir geben, nicht nur während des Studiums und dieser Arbeit.