

Aus dem Bereich Innere Medizin V Pneumologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Funktion NF- κ B und IL-17 regulierter Entzündung in der Entwicklung des rauchinduzierten Lungenschadens

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von: Meike Christina Voss

geb. am: 28.08.1986 in Saarbrücken

Meinen Eltern

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität des Saarlandes als Dissertation
am

Erstgutachter: PD Dr. Christoph Beisswenger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerald Thiel

Inhalt

I. Inhaltsverzeichnis	Seite I
II. Abbildungsverzeichnis	Seite V
III. Tabellenverzeichnis	Seite IX

I. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	Seite 1
1. Summary	Seite 4
2. Einleitung	Seite 6
2.1. Definition und Epidemiologie der COPD	Seite 6
2.2. Pathomechanismen der COPD	Seite 7
2.2.1. Entzündungs-, Immun- und Epithelzellen bei der COPD	Seite 8
2.3. Bakterielle Pathogene, Zigarettenrauch und COPD	Seite 13
2.4. NF- κ B bei der Pathogenese der COPD	Seite 14
2.5. IL-17A bei der Pathogenese der COPD	Seite 17
2.6. Weitere Zytokine, Chemokine und Proteasen bei der Pathogenese der COPD	Seite 19
2.6.1. Proinflammatorische Zytokine	Seite 20
2.6.2. IL-10	Seite 22
2.6.3. Neutrophile Granulozyten rekrutierende Chemokine	Seite 22
2.6.4. Monozyten rekrutierende Chemokine	Seite 23
2.6.5. Metalloproteasen	Seite 25
2.6.6. Neutrophile Elastase	Seite 28
2.7. Fragestellungen der Arbeit	Seite 33
3. Material und Methoden	Seite 34
3.1. Material	Seite 34

3.2. Methoden	Seite 36
3.2.1. Zigarettenrauchexposition	Seite 36
3.2.1.1. Langzeitrauchexposition	Seite 36
3.2.1.2 Kurzzeitrauchexposition	Seite 37
3.2.2. Invasive Lungenfunktionsmessung	Seite 37
3.2.3. Einbettung der Lungen und stereologische Auswertung	Seite 38
3.2.3.1. Paraffin-Einbettung der Lungen, Entparaffinierung und HE-Färbung	Seite 38
3.2.3.2. Stereologische Auswertung	Seite 39
3.2.4. Kultivierung von Bakterien und Durchführung der Infektion	Seite 40
3.2.4.1. Infektion der oberen Atemwege der Maus	Seite 40
3.2.4.2. Isolation und ex vivo Infektion von murinen Makrophagen	Seite 41
3.2.5. Verneblung mit NTHi-Lysat	Seite 41
3.2.6. Blutentnahme, Lavage der Lunge und der oberen Atemwege, Präparation der Zytospins, Zellzahlbestimmung und Phagozytostest	Seite 42
3.2.6.1. Blutentnahme und Lavage	Seite 42
3.2.6.2 Präparation der Zytospins	Seite 43
3.2.6.3. Gesamtleukozytenzellzahl und Differenzialzellbild	Seite 43
3.2.6.4. Phagozytostest	Seite 43
3.2.7. Zytokin-Messung	Seite 44
3.2.7.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Seite 44
3.2.7.2. Cytometric Bead Array (CBA)	Seite 44
3.2.8. Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Mauslunge	Seite 45
3.2.8.1. Herstellung einer Einzelzellsuspension der Mauslunge	Seite 45
3.2.8.2. Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Durchflusszytometer	Seite 45
3.2.9. RNA-Isolation	Seite 46
3.2.10. cDNA-Synthese, Primer-Design und qRT-PCR	Seite 46
3.2.11. Elastingehalt-Bestimmung in der Mauslunge	Seite 47

3.2.12. Messung der MMP12- und Elastaseaktivität im Lungenhomogenisat	Seite 48
3.2.13. Statistische Analyse	Seite 48
4. Ergebnisse	Seite 49
4.1. Charakterisierung der zigarettenrauchinduzierten Entzündung im Mausmodell	Seite 49
4.1.1. Akutes Rauchmodell	Seite 49
4.1.2. Chronisches Rauchmodell	Seite 50
4.2. Funktion von NF- κ B und IL-17A beim rauchinduzierten Lungenschaden	Seite 56
4.2.1. NF- κ B-knockout-Mäuse im akuten Rauchmodell: Deletion von p65 oder I κ B α in myeloiden Zellen führt zu einer gesteigerten Entzündung in der Lunge	Seite 56
4.2.2. NF- κ B-knockout-Mäuse im chronischen Rauchmodell: Deletion von p65 oder I κ B α in myeloiden Zellen führt zu einer verminderten Lungenfunktion	Seite 62
4.2.3. IL-17A-knockout-Mäuse im akuten Rauchmodell: IL-17A-Defizienz wirkt sich nicht auf den Einstrom inflammatorischer Zellen in die Lunge aus	Seite 72
4.2.4. IL-17A-knockout-Mäuse im chronischen Rauchmodell: IL-17A-Defizienz führt zu einer gestörten pulmonalen Homöostase und schützt nicht vor einem rauchinduzierten Lungenschaden	Seite 73
4.3. Bakteriell Kolonisierungsmodell der oberen Atemwege mit <i>S. pneumoniae</i> 6A und non-typeable <i>H. influenzae</i> nach chronischer Rauchexposition	Seite 86
4.3.1. Kolonisierung der oberen Atemwege mit non-typeable <i>H. influenzae</i> (NTHi) nach 3 und 7 Monaten Rauchexposition	Seite 86
4.3.2. Kolonisierung der oberen Atemwege mit <i>S. pneumoniae</i> nach 3 und 7 Monaten Rauchexposition	Seite 92
4.3.3. Reduzierte Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten des Bluts aus rauchexponierten Mäusen	Seite 97
5. Diskussion	Seite 98
5.1. Zigarettenrauchinduzierte Entzündung und Lungenschaden in der Maus als Modell der COPD	Seite 98
5.2. Die Rolle von p65 und I κ B α in myeloiden Zellen bei akuter und chronischer Rauchexposition	Seite 101
5.2.1. Deletion von p65 und I κ B α in myeloiden Zellen führt spontan zur Störung der Homöostase in der Lunge und zu einer verschlechterten Lungenfunktion	Seite 103

5.2.2. Das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg durch Deletion von p65 oder I κ B α führt zu einer gesteigerten Entzündung in der Lunge nach akuter Rauchexposition	Seite 105
5.2.3. Das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg durch Deletion von p65 oder I κ B α führt zu einem Verlust an Lungenstruktur und Lungenfunktion nach chronischer Rauchexposition	Seite 107
5.3. Die Rolle von IL-17A bei akuter und chronischer Rauchexposition	Seite 108
5.3.1. Die IL-17A-Defizienz wirkt sich negativ auf die Lungenstruktur aus und führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Entzündungszellen in der Lunge	Seite 109
5.3.2. Die Defizienz von IL-17A hat keinen Effekt auf die Auswirkungen von akuter Rauchexposition auf die Lunge	Seite 111
5.3.3. IL-17A-Defizienz schützt nicht vor rauchinduziertem Lungenschaden durch chronische Rauchexposition	Seite 111
5.4. Der Effekt der Rauchexposition auf Infektionen der oberen Atemwege mit <i>S. pneumoniae</i> und NTHi	Seite 115
5.4.1. Erhöhte bakterielle Kolonisierung und verstärkte Entzündung in den Atemwegen nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit NTHi und <i>S. pneumoniae</i> in rauchexponierten Mäusen	Seite 116
5.4.2. Rauchexposition führt zu einer verminderten mukosalen Immunabwehr in den oberen Atemwegen	Seite 117
5.5. Schlussbemerkung	Seite 120
6. Literaturverzeichnis	Seite 121
Anhang	
7. Publikationen und Kongressbeiträge	Seite 144
7.1. Publikationen	Seite 144
7.2. Kongressbeiträge	Seite 145
Danksagung	Seite 147
Eidesstattliche Erklärung	Seite 148

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Der klassische NF- κ B-Signalweg (nach Neil D. Perkins "Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function", 2007). Seite 15
- Abbildung 2: IL-17-induzierte Signalwege (nach Sarah L. Gaffen "Structure and signalling in the IL-17 receptor family", 2009). Seite 18
- Abbildung 3: Leukozyten in der BALF nach akuter Rauchexposition. Seite 50
- Abbildung 4: Konzentration des Chemokins KC und des proinflammatorischen Zytokins MIP-2 nach akuter Rauchexposition. Seite 50
- Abbildung 5: Leukozyten in der BALF nach chronischer Rauchexposition. Seite 51
- Abbildung 6: Lungenfunktionsmessung der Mäuse nach chronischem Rauch: Totale Lungenkapazität und quasi-statische compliance. Seite 52
- Abbildung 7: Lungenfunktionsmessung der Mäuse nach chronischem Rauch: elastance des Lungengewebes und compliance des gesamten Atemsystems. Seite 53
- Abbildung 8: Lungenfunktionsmessung der Mäuse nach chronischem Rauch: Widerstand des Atemsystems, der Atemwege und des Gewebes. Seite 53
- Abbildung 9: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens. Seite 54
- Abbildung 10: Histologie der Lungen nach 7 Monaten Rauch-/Raumluftexposition. Seite 55
- Abbildung 11: Leukozyten in der BALF von NF- κ B-knockout Mäusen nach Kurzzeitberauchung. Seite 58
- Abbildung 12: Konzentration des proinflammatorischen Chemokins KC in der BALF von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach akuter Rauchexposition. Seite 59
- Abbildung 13: Konzentration der Chemokine IL-1 α , MIP-1 α , KC und G-CSF in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach akuter Rauchexposition. Seite 60
- Abbildung 14: Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach akuter Rauchexposition. Seite 61
- Abbildung 15: Konzentration des Chemokins MCP-1 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach akuter Rauchexposition. Seite 62
- Abbildung 16: Leukozyten in der BALF von NF- κ B-knockout Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Seite 63

Abbildung 17: Konzentration von KC in der BALF und im Serum von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 64
Abbildung 18: Konzentration der Chemokine MIP-1 α , KC und IL-1 α in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 66
Abbildung 19: Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 66
Abbildung 20: Konzentration des Chemokins MCP-1 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 67
Abbildung 21: Lungenfunktionsmessung der myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäuse nach chronischem Rauch: Totale Lungenkapazität und quasi-statische compliance.	Seite 68
Abbildung 22: Lungenfunktionsmessung der myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäuse nach chronischem Rauch: elastance des Lungengewebes und compliance des gesamten Atemsystems.	Seite 69
Abbildung 23: Myeloid-defiziente p65- und I κ B α -Mäuse nach chronischem Rauch: Widerstand des Atemsystems, der Atemwege und des Gewebes.	Seite 70
Abbildung 24: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens bei myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen.	Seite 71
Abbildung 25: Histologie der Lungen der myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäuse nach 7 Monaten Rauch- bzw. Raumluftexposition.	Seite 71
Abbildung 26: Leukozyten in der BALF von IL-17A-knockout Mäusen nach Kurzzeitberauchung.	Seite 72
Abbildung 27: Leukozyten in der BALF von IL-17A-knockout Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 74
Abbildung 28: Repräsentative Dot Plots der prozentualen Anteile der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen (CD3-positive Zellen) in Einzelzellsuspensionen der Lungen von IL-17A-defizienten und WT Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 74
Abbildung 29: Prozentuale Anteile der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen (CD3-positive Zellen) in Einzelzellsuspensionen der Lungen von IL-17A-defizienten und WT Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 75
Abbildung 30: Konzentration der Chemokine IL-1 α und G-CSF in der Lunge von IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 76
Abbildung 31: Konzentration der Zytokine IL-1 β und IL-10 in der Lunge von IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition.	Seite 76

- Abbildung 32: Lungenfunktionsmessung der IL-17A-defizienten Mäuse nach chronischem Rauch: Totale Lungenkapazität und quasi-statische compliance. Seite 77
- Abbildung 33: Lungenfunktionsmessung der IL-17A-defizienten Mäuse nach chronischem Rauch: elastance des Lungengewebes und compliance des gesamten Atemsystems. Seite 77
- Abbildung 34: Lungenfunktionsmessung der IL-17A-defizienten Mäuse nach chronischem Rauch: Widerstand des Atemsystems, der Atemwege und des Gewebes. Seite 78
- Abbildung 35: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens bei IL-17A-defizienten Mäusen. Seite 79
- Abbildung 36: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens bei IL-17A-defizienten Mäusen. Seite 79
- Abbildung 37: Histologie der Lungen der IL-17A-defizienten Mäuse nach 7 Monaten Rauch- bzw. Raumluftexposition. Seite 81
- Abbildung 38: Relative Expression von Collagen III und Elastin nach 3 Monaten Rauchexposition in IL-17A-defizienten Mäusen. Seite 82
- Abbildung 39: Elastin-Proteingehalt in der Lunge nach 3 Monaten Rauchexposition in IL-17A-defizienten Mäusen. Seite 82
- Abbildung 40: IL-17A-Defizienz wirkt sich auf Lungenelastase, MMP12 und -9 aus. Seite 83
- Abbildung 41: Leukozyten in der BALF von IL-17A-knockout Mäusen nach 6 Monaten Rauch und NTHi Verneblung. Seite 84
- Abbildung 42: Lungenfunktionsmessung zur Bestimmung der totalen Lungenkapazität der IL-17A-defizienten Mäusenach 6 Monaten Rauch und non-typeable Haemophilus influenzae (NTHi) Verneblung. Seite 85
- Abbildung 43: Konzentration von IL-17A in der BALF von IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition und viermaliger Verneblung mit NTHi. Seite 85
- Abbildung 44: Bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege nach Infektion der oberen Atemwege mit non-typeable H. influenzae (NTHi). Seite 87
- Abbildung 45: Leukozyten in der Lavage der oberen Atemwege nach Infektion der oberen Atemwege mit non-typeable H. influenzae (NTHi). Seite 88
- Abbildung 46: Konzentration der Chemokine KC und RANTES und des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der Lavage der oberen Atemwege nach Infektion der oberen Atemwege mit NTHi. Seite 89

Abbildung 47: Expression von mouse β Defensin-1 (mBD-1), Lysozym M und MIP-2 in den oberen Atemwegen der Mäuse nach 7 Monaten Rauch und 24 Stunden NTHi Infektion der oberen Atemwege.	Seite 90
Abbildung 48: Leukozyten in der BALF nach Infektion der oberen Atemwege mit non-typeable H. influenzae (NTHi).	Seite 91
Abbildung 49: Konzentration des Chemokins KC nach ex vivo Infektion von Alveolarmakrophagen nach chronischem Rauch.	Seite 92
Abbildung 50: Bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit S. pneumoniae (S.p.) 6A.	Seite 92
Abbildung 51: Bakterielle Last in der Lunge nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit S. pneumoniae (S.p.) 6A nach chronischer Rauchexposition.	Seite 93
Abbildung 52: Leukozyten in der Lavage der oberen Atemwege nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit Streptococcus pneumoniae (S.p.) 6A.	Seite 94
Abbildung 53: Konzentration von KC und IL-6 in der Lavage der oberen Atemwege nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit S. pneumoniae (S.p.) 6A.	Seite 94
Abbildung 54: Leukozyten in der BALF nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit S. pneumoniae (S.p.) 6A.	Seite 95
Abbildung 55: Konzentration der Chemokine IL-1 α und MCP-1 in der Lunge nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit S. pneumoniae (S.p.) 6A.	Seite 96
Abbildung 56: Konzentration des Chemokins KC nach ex vivo Infektion von Alveolarmakrophagen nach chronischem Rauch.	Seite 96
Abbildung 57: Phagozytose-Aktivität von Granulozyten und Monozyten aus Vollblut nach chronischem Rauch.	Seite 97

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zytokine, Chemokine und Proteasen bei der Pathogenese der COPD.	Seite 30-32
Tabelle 2: Namen und Sequenzen der in der qRT-PCR gebrauchten Primer.	Seite 46
Tabelle 3: Morphometrische Daten gezeigt als Änderung von der Baseline (% der luftexponierten Mäuse).	Seite 80

1. Zusammenfassung

Rauchen ist der Hauptrisikofaktor für die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD). In dieser Arbeit wurden Mausmodelle der Zigarettenrauchexposition etabliert, die es ermöglichten, die Funktion zentraler Entzündungsmediatoren bei der Entstehung rauchinduzierter Lungenschäden zu untersuchen. Das akute Modell induzierte nach 3 Tagen eine von neutrophilen Granulozyten bestimmte Entzündung und führte zu einer vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Im chronischen Modell führte eine 7-monatige Rauchexposition zu einem strukturellen Lungenschaden, der mithilfe von invasiven Lungenfunktionsmessungen und stereologischen Auswertungen quantifiziert wurde. Chronische Rauchexposition führte zu einem Anstieg der totalen Lungenkapazität, einer Erhöhung der quasi-statischen compliance, einer Verringerung der respiratorischen elastance, zu einem Verlust an Parenchym und einer Vergrößerung des mean chord length (MCL). Der Entzündungsphänotyp in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nach chronischer Rauchexposition war Makrophagen dominiert. Der durch chronische Rauchexposition induzierte Lungenschaden ähnelt somit einem Emphysem bei COPD-Patienten.

Studien deuten darauf hin, dass Interleukin 17A (IL-17A) und Th17-Zellen bei der Pathogenese der COPD eine Rolle spielen könnten. Es wurden daher IL-17A-defiziente Mäuse 7 Monate lang Rauch exponiert und mit Wildtyp (WT) Tieren verglichen. Obwohl die Konzentrationen inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β und G-CSF in IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition im Vergleich zu WT Mäusen verringert waren, konnte kein Schutz der IL-17A-defizienten Mäuse vor rauchinduziertem Lungenschaden festgestellt werden. IL-17A-defiziente Mäuse waren zwar teilweise vor der rauchinduzierten Erhöhung der totalen Lungenkapazität geschützt. Die respiratorische elastance war jedoch in IL-17A-defizienten Mäusen verglichen mit WT Mäusen nach Rauchexposition verringert, was auf einen verschlimmerten Lungenschaden schließen lässt. In der Morphometrie zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlust von Lungengewebe zwischen IL-17A-defizienten Mäusen und WT Mäusen. Bemerkenswerterweise führte die IL-17A-Defizienz schon unter basalen Bedingungen spontan zu einem Verlust an Lungenstruktur. Dies ging mit einem Verlust der Expression des Strukturproteins Elastin einher, wie er auch nach chronischer Rauchexposition in WT Mäusen festgestellt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-17A zur

Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase beiträgt und im sterilen Rauchexpositionsmodell den Verlust von Lungenstruktur und -funktion nicht vermittelt.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Entzündung. Da myeloide Zellen wie z.B. Alveolarmakrophagen eine zentrale Funktion bei der Immunantwort und Entzündung der Lunge haben, wurden in unseren Modellen Mäuse untersucht, die in myeloiden Zellen defizient für das NF- κ B Protein p65 oder den NF- κ B-Inhibitor I κ B α waren. Die Defizienz von p65 oder I κ B α führte spontan auf niedrigem Niveau zu einer erhöhten Entzündung der Lunge. Akute Rauchexposition erhöhte die Konzentrationen inflammatorischer Mediatoren in den Lungen von p65- und I κ B α -defizienten Mäusen. Im Vergleich zu WT Mäusen erhöhte sich nach Rauchexposition die Zahl der Alveolarmakrophagen und verringerte sich die Zahl der neutrophilen Granulozyten bei p65-defizienten Mäusen, wohingegen die Zahl der Alveolarmakrophagen bei I κ B α -defizienten Mäusen verringert war. Die Defizienz von I κ B α führte spontan zu einer erhöhten compliance der Lunge, erhöhten totalen Lungenkapazität und verringerten Gewebesteifigkeit. Chronische Rauchexposition verschlechterte die Lungenfunktion und -struktur bei p65- oder I κ B α -defizienten Mäusen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine angemessene Aktivierung des myeloiden NF- κ B-Signalwegs für die Gewebshomöostase der Lunge benötigt wird. Der NF- κ B-Signalweg bietet sich daher nicht als therapeutisches Ziel bei COPD-Patienten an.

Bakterielle Kolonisation und Infektionen der Lunge tragen zur Progression der COPD bei. Exazerbationen werden oft durch neu erworbene bakterielle Pathogene wie z.B. non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) hervorgerufen. Zudem haben Raucher, Passivraucher und COPD-Patienten ein erhöhtes Risiko für Pneumonien mit *Streptococcus pneumoniae*. Im Kolonisierungsmodell wurden nach chronischer Rauchexposition stark erhöhte Zahlen von NTHi und *S. pneumoniae* in den oberen Atemwegen nachgewiesen. Nach *S. pneumoniae* Kolonisierung konnte auch eine erhöhte Translokation der Bakterien in die Lunge nachgewiesen werden. Die bakterielle Besiedlung ging mit erhöhten Konzentrationen an inflammatorischen Mediatoren und einem erhöhten Einstrom an Immunzellen in die oberen Atemwege und Lunge einher. Die Phagozytoseaktivität war in Granulozyten und Monozyten aus Vollblut von rauchexponierten Mäusen verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Rauchexposition bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege begünstigt und die

Eliminierung von Pathogenen an der Mukosa der oberen Atemwege hemmt. Dies führt zu verstärkter Entzündung und Translokation von Pathogenen in die Lunge.

1. Summary

Function of NF- κ B and IL-17 regulated inflammation in the development of smoke-induced lung damage

Smoking is the main risk factor for the chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In this work we developed cigarette smoke exposure models that enabled us to explore the function of central mediators of inflammation in the development of smoke induced lung damage. After 3 days of smoke exposure, the acute model induced an inflammation dominated by neutrophil granulocytes and led to enhanced secretion of proinflammatory cytokines. After 7 months, the chronic exposure model provoked a structural lung damage that was quantified by invasive pulmonary function and stereological assessment. Chronic smoke exposure led to an increase in the total lung capacity and quasi-static compliance, a decrease in respiratory elastance, a loss of parenchyma and an enlargement of mean chord length (MCL). The inflammatory phenotype in the bronchoalveolar lavage (BAL) after chronic smoke exposure was macrophage dominated. The lung damage induced by chronic smoke exposure hence resembles emphysema in COPD patients.

Recent studies suggest that IL-17A and Th17 cells play a role in the pathogenesis of COPD. Therefore, IL-17A deficient mice were exposed to smoke for 7 months and compared to wildtype (WT) animals. Although the concentrations of inflammatory mediators such as IL-1 β and G-CSF were decreased in IL-17A deficient mice after chronic smoke exposure compared to WT mice, IL-17A deficient mice were not protected from smoke induced lung damage. IL-17A deficient mice were partially protected from smoke induced increases in total lung capacity. However, the respiratory elastance was decreased in IL-17A deficient mice compared to WT mice, pointing to worsened lung damage. Morphometry showed no significant differences in the loss of lung tissue between IL-17A deficient mice and WT mice. Remarkably, IL-17A deficiency spontaneously led to a loss of lung structure under basal conditions. This was accompanied by a decreased expression of the structural protein elastin similar to WT mice after smoke exposure. These results show that IL-17A contributes to maintenance of lung homeostasis and does not mediate loss of lung structure and function in a sterile smoke exposure model.

The transcription factor NF- κ B plays a key role in the regulation of inflammation. Since myeloid cells such as alveolar macrophages have a central function in the immune response and inflammation of the lung, in our models we investigated mice deficient for the NF- κ B protein p65 or the NF- κ B inhibitor I κ B α in myeloid cells. The deficiency for p65 or I κ B α spontaneously led to enhanced inflammation of the lung on low level. Acute smoke exposure increased the concentration of inflammatory mediators in the lungs of p65- and I κ B α -deficient mice. Compared to WT mice, the number of alveolar macrophages increased and the number of neutrophil granulocytes decreased in p65-deficient mice, while the number of alveolar macrophages decreased in I κ B α -deficient mice. The deficiency of I κ B α spontaneously led to an increased compliance and total lung capacity and a decreased tissue elastance. Chronic smoke exposure impaired lung function and structure in p65- or I κ B α -deficient mice. These results show that an appropriate activation of myeloid NF- κ B signalling is essential for tissue homeostasis of the lung. Therefore, the NF- κ B pathway is not a promising therapeutical target for COPD patients.

Bacterial colonisation and infections of the lung contribute to the progression of COPD. Exacerbations are often caused by bacterial pathogens newly acquired from the environment such as *Haemophilus influenzae* (NTHi). Additionally, smokers, passive smokers and COPD patients are at higher risk for *Streptococcus pneumoniae* caused pneumonias. In the colonisation model, increased numbers of NTHi and *S. pneumoniae* were detected in the upper respiratory tract after smoke exposure. After *S. pneumoniae* colonization, an increased translocation of bacteria to the lung was detected. Bacterial colonisation was accompanied by increased concentrations of inflammatory mediators and enhanced influx of immune cells in the upper airways and the lung. The phagocytotic activity was decreased in granulocytes and monocytes from whole blood of smoke exposed mice. These results show that smoke exposure favours bacterial colonisation of the upper airways and inhibits the elimination of pathogens at the mucosa of the upper respiratory tract. This leads to enhanced inflammation and translocation of pathogens to the lung.

2. Einleitung

2.1. Definition und Epidemiologie der Chronisch Obstruktiven Lungenerkrankung (COPD)

Der Hauptrisikofaktor für die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist das Zigarettenrauchen (Decramer et al., 2012). Andere Schadstoffe wie z. B. Stäube, Dämpfe, Partikel der Luftverschmutzung und Biomassebrennstoffe, etwa Holz und Holzkohle für die Energieversorgung der Haushalte in den Entwicklungsländern, sind ebenfalls potentielle Auslöser der COPD (Halbert et al., 2006). Laut World Health Organization (WHO) sterben jährlich ca. 5 Millionen Menschen an den Folgen des Zigarettenrauchens, 3 Millionen davon sind COPD-Patienten. Zurzeit steht die COPD weltweit an vierter Stelle der Todesursachen. Die WHO prognostiziert aber, dass sie im Jahr 2030 an dritter Stelle stehen wird (<http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>). Derzeit kann global gesehen beobachtet werden, dass 50% der jungen Männer und 10% der jungen Frauen mit dem Rauchen beginnen, wobei ein früher Beginn besonders schädlich ist und dann die Risiken für rauchassoziierte Erkrankungen im mittleren Alter sehr groß sind (Jha and Peto, 2014). In einer Metaanalyse, die Daten aus 28 Ländern ausgewertet hat, wird die Prävalenz der COPD bei allen Erwachsenen über 40 Jahren mit 9 bis 10% angegeben (Churg et al., 2008). Ein weiterer epidemiologisch interessanter Faktor ist das hohe Risiko, dass die COPD oft undiagnostiziert bleibt und somit frühzeitige Interventionen, die vor allem im Einstellen des Rauchens bestehen sollten, nicht stattfinden können (Decramer et al., 2012).

Die COPD ist durch progressive Atemnot, Husten und Auswurf charakterisiert. Durch einen Verlust an elastischen Fasern kommt es zur Obstruktion, was zu einer Überblähung der Lunge führt und für den Patienten bedeutet, dass die Luft in der Ausatmungsphase gefangen bleibt. COPD äußert sich insbesondere in 4 pulmonalen Veränderungen: Mukusüberproduktion, Umbau der kleinen Atemwege, Emphysem und vaskulärer Umbau mit pulmonaler Hypertonie (Churg et al., 2008). Die lokale und systemische Entzündung, die bei COPD-Patienten beobachtet wird, führt zu einem progressiven Verlust an Lungenfunktion und ventilatorischem Versagen, letztendlich zu hypoxisch respiratorischer Insuffizienz, durch die pulmonale Hypertonie zu einem chronisch druckbelasteten rechten Herz (cor pulmonale) und schließlich zum Tod des Patienten (Hoenderdos and Condliffe,

2013). Die Einstufung des Krankheitsstadiums geschieht anhand der GOLD-Klassifizierung (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) der chronischen Atemstromobstruktion (http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLDReport_April112011.pdf). Ursprünglich wurden vier GOLD-Stadien nach dem Grad der FEV₁-Messung (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Ausatemungssekunde) in Bezug zu einem erwarteten Referenzwert für die jeweilige Altersstufe und das Geschlecht definiert: Stadium 1: milde COPD (FEV₁ ≥ 80%), Stadium 2: moderate COPD (FEV₁ 50 - 80%), Stadium 3: schwere COPD (FEV₁ 30 – 50%), Stadium 4: sehr schwere COPD (FEV₁ < 30%) (Decramer et al., 2012). Die überarbeitete GOLD-Klassifizierung (Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of COPD (updated 2014)) schließt die Exazerbationshäufigkeit pro Jahr ein und bildet das Krankheitsbild der Patienten in den einzelnen Gruppen besser als die ursprüngliche Einteilung ab, da zusätzlich ein COPD Assessment Test™ (CAT) eingeschlossen wird, bei dem die Patienten einen Fragebogen zu ihrem körperliche Befinden ausfüllen. Anhand der erreichten Punktzahl des Fragebogens kann der Krankheitsstatus eingeschätzt werden. Je schwerer die Symptome sind, desto höher ist die CAT-Punktzahl (von 0 bis 40). Patienten der Gruppe A haben ein geringes Risiko und wenige Symptome: sie sind typischerweise den Stadien GOLD 1 oder 2 zuzuordnen und/oder haben 0 bis 1 Exazerbation pro Jahr ohne Krankenhausaufenthalt und einen CAT-Wert < 10. Patienten der Gruppe B haben mehr Symptome als die der Gruppe A: der CAT-Wert ist ≥ 10. Patienten der Gruppe C haben ein hohes Risiko mit wenigen Symptomen: sie sind typischerweise den Stadien GOLD 3 oder 4 zuzuordnen und/oder haben ≥ 2 Exazerbationen pro Jahr oder ≥ 1 Krankenhausaufenthalt pro Jahr wegen der Exazerbation und einen CAT-Wert < 10. Patienten der Gruppe D haben mehr Symptome als Patienten der Gruppe C: der CAT-Wert ist ≥ 10.

2.2. Pathomechanismen der COPD

Die COPD ist eine komplexe inflammatorische Erkrankung (Barnes, 2004b). Die Entzündungsreaktion auf Zigarettenrauch, die durch den Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge, wie z.B. neutrophilen Granulozyten, und erhöhte pulmonale Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine charakterisiert ist, ist der Hauptfaktor in der Pathogenese der COPD. Die Entzündungsreaktionen finden bei allen Rauchern statt, jedoch entwickeln nicht

alle Raucher eine COPD. Es wird deshalb angenommen, dass ungefähr 25% der Raucher eine genetische Prädisposition für COPD haben. Welche Faktoren dabei involviert sind, konnte jedoch noch nicht geklärt werden (Stevenson and Birrell, 2011). Selbst nach Beenden des Rauchens führt ein Zyklus von Entzündungen, der aus der Rekrutierung von Entzündungszellen durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine besteht, die dann wiederum proinflammatorische Zytokine und Chemokine sekretieren, zu einem anhaltenden Abfall der Lungenfunktion (Hoenderdos and Condliffe, 2013). Bei der Entstehung eines Emphysems wird die Lungenfunktion durch Zerstörung von Lungengewebe besonders auf der Ebene der kleinen Atemwege und der Alveolen und der damit einhergehenden Überblähung der Lunge stark eingeschränkt (Shapiro and Ingenito, 2005). Die Zerstörung des Parenchyms geschieht durch proteolytischen Abbau und verursacht eine Verringerung der elastischen Rückstellkraft und der Oberfläche des Gasaustausches der Lunge (Stevenson and Birrell, 2011). Eine wichtige Rolle bei der pathologischen Veränderung der Lunge spielen freie Radikale. Es wird angenommen, dass freie Radikale im Zigarettenrauch, wie reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies, und reaktive Chemikalien, wie Aldehyde, die in der Lunge vorhandenen Makrophagen und Epithelzellen zur Sekretion chemotaktischer Mediatoren anregt, was dann zur Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) in die Lunge führt (Donaldson et al., 2002). Eine weitere Auswirkung chronischen Rauchens sind Defekte in homöostatischen Mechanismen, wie z.B. Inaktivierung von Antiproteasen, Antioxidantien und Reparaturmechanismen (Donaldson et al., 2002). Ein Ungleichgewicht von neutrophiler Elastase und Antiproteasen trägt höchstwahrscheinlich zu einem übermäßigen Abbau von extrazellulärer Matrix und damit zu einer Schädigung des Lungenparenchyms bei.

2.2.1. Entzündungs-, Immun- und Epithelzellen bei der COPD

Die in den Alveolen und den kleinen Atemwegen von COPD-Patienten vorkommenden Entzündungs- und Immunzellen sind vor allem Makrophagen, T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten (Retamales et al., 2001).

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind in der gesunden Lunge nur in sehr kleiner Zahl vorhanden. Sie werden jedoch im Verlauf von Infektionen und Entzündungen im Knochenmark vermehrt gebildet und über Chemokine aus dem Blutkreislauf in die Lunge rekrutiert. Das Überleben der neutrophilen Granulozyten in der Lunge wird durch Zytokine wie z.B. granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) und granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) gesichert (Barnes, 2004b). Die primäre Rolle der neutrophilen Granulozyten ist die Phagozytose von eindringenden Mikroorganismen und deren Zerstörung durch reaktive Sauerstoffspezies, neutrophile Elastase (NE), Cathepsin und andere antibakterielle Proteine und Peptide (Borregaard and Cowland, 1997). Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der COPD ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Es gibt jedoch eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen und der Rate des Abfalls der Lungenfunktion (Stanescu et al., 1996). In Sputum und BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten konnten erhöhte Zahlen von aktivierten neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Keatings et al., 1996; Lacoste et al., 1993). Die erhöhte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in den Lungen und Atemwegen von COPD-Patienten könnte durch eine verstärkte Rekrutierung in Kombination mit der fehlenden Klärung durch Alveolarmakrophagen zustande kommen (Hoenderdos and Condliffe, 2013). Neutrophile Granulozyten haben durch ihre Proteasen die Fähigkeit, einen Abbau des Elastins auszulösen. Die Ausschüttung von Proteasen von neutrophilen Granulozyten könnte also zur Zerstörung der Alveolen bei der COPD beitragen. Diese Hypothese wird durch Mausstudien gestützt, die zeigten, dass Mäuse, die für neutrophile Elastase defizient sind, vor der Entstehung eines rauchinduzierten Emphysems geschützt sind (Shapiro 2003). Bei anderen Erkrankungen der Lunge, bei denen eine noch stärkere chronische Atemwegsneutrophilie vorherrscht wie z.B. bei zystischer Fibrose oder Bronchiektasie ist die Elastolyse jedoch kein hervorstechendes Merkmal (Finkelstein et al., 1995). Dies lässt vermuten, dass zusätzlich andere Faktoren bei der Entstehung eines Emphysems eine Rolle spielen müssen.

Makrophagen

Residente Alveolarmakrophagen phagozytieren Mikroben und eingeatmete Partikel. Sie gehören zu den ersten Abwehrzellen, die bei Infektionen über Zytokine und Chemokine eine Wirtsabwehr, die häufig mit Entzündung verbunden ist, einleiten. Alveolarmakrophagen sind sehr langlebige Zellen (Murphy et al., 2008). Ob Alveolarmakrophagen durch den Einstrom

von Monozyten aus dem Blut ersetzt werden oder sich aus bestehenden Alveolarmakrophagen entwickeln, ist daher schwer zu beantworten. In einer Studie von Williams *et al.* wird gezeigt, dass Alveolarmakrophagen nicht ständig durch adulte Monozyten ersetzt werden. Vielmehr stammen Alveolarmakrophagen von fetalen Monozyten ab, die sich pränatal in der Lunge ansiedeln und sich durch GM-CSF kurz nach der Geburt zu Alveolarmakrophagen entwickeln (Williams *et al.*, 2013). Eine Studie von Maus *et al.* zeigte ebenfalls, dass unter basalen, nicht-stimulativen Bedingungen nur sehr wenige Alveolarmakrophagen durch neue ersetzt werden. Nach LPS-Stimulation führt allerdings eine stark erhöhte Rekrutierung von Monozyten zu einem Austausch der vorhandenen Alveolarmakrophagen (Maus *et al.*, 2006).

Es wird angenommen, dass Alveolarmakrophagen bei der Pathogenese der COPD eine entscheidende Rolle spielen (Barnes, 2004a; Shapiro, 1999). Es konnten erhöhte Zahlen von Makrophagen (5- bis 10-fach erhöht) in den Atemwegen, im Lungenparenchym, in der BAL und im Sputum von COPD-Patienten nachgewiesen werden (Barnes, 2004b). Außerdem gibt es eine Korrelation zwischen der Anzahl der Makrophagen in den Atemwegen und der Schwere der COPD (Di *et al.*, 1998). Ebenso wie neutrophile Granulozyten sezernieren Alveolarmakrophagen eine Reihe elastolytischer Enzyme wie MMP-2 (Matrixmetalloproteinase-2), MMP-9, MMP-12, Cathepsin K, L und S und auch neutrophile Elastase, die sie von neutrophilen Granulozyten aufgenommen haben (Punturieri *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2002). Vor allem während Exazerbationen ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B in Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten stark aktiviert, was zur verstärkten Expression von inflammatorischen Proteinen und Proteasen führt (Caramori *et al.*, 2003; Di *et al.*, 2002). Eine Arbeit von Tomita *et al.* zeigt, dass die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-XL in Makrophagen von Rauchern deutlich erhöht ist (Tomita *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass Makrophagen in COPD-Patienten ein verlängertes Überleben haben und so zum Zyklus der andauernden Entzündung beitragen können. Eine Studie, die zeigte, dass Mäuse, die für die von Makrophagen gebildete Metalloprotease MMP-12 defizient sind, vor der Entstehung eines rauchinduzierten Emphysems geschützt sind, legt zudem eine entscheidende Funktion von Makrophagen bei der Entstehung eines Emphysems nahe (Hautamaki *et al.*, 1997).

Lymphozyten

Neben neutrophilen Granulozyten und Makrophagen spielen Lymphozyten bei der Pathogenese der COPD eine Rolle. Studien zeigten, dass CD8-positive T-Zellen in den Wänden der kleinen Atemwege (Saetta et al., 1998) und in bronchialen Biopsien (O'Shaughnessy et al., 1997) und CD3- und CD8-positive T-Zellen in den Alveolarwänden (Majo et al., 2001) von Rauchern mit COPD im Vergleich zu gesunden Rauchern vermehrt vorkommen. Es besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl der T-Zellen, dem Grad der alveolären Zerstörung und der Schwere der Atemflussobstruktion (Barnes, 2004b; Finkelstein et al., 1995). In bronchialen Biopsien von COPD-Patienten konnte durch den Nachweis einer erhöhten Expression von IL-12, Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-4, der darauffolgenden STAT-4 Translokation in den Kern und einer IFN- γ Induktion ein Th1-Phänotyp der T-Zellen nachgewiesen werden (Di et al., 2004). Tc1-Zellen, die wie Th1-Zellen IFN- γ , aber nicht IL-4 sekretieren und zu den zytotoxischen T-Zellen gehören, sind von besonderem Interesse, da sie durch die Bildung von Granzymen und Perforinen, die Apoptose induzieren, auf Epithelzellen zytotoxisch wirken (Barnes and Cosio, 2004). Im Sputum von COPD-Patienten konnten erhöhte Perforin-Konzentrationen nachgewiesen werden (Chrysofakis et al., 2004), was eine mögliche Rolle der Tc1-Zellen bei der COPD aufzeigt. Bei COPD-Patienten im Stadium 4 wurden darüber hinaus vermehrt Lymphfollikel nachgewiesen, die einen Kern aus B-Lymphozyten enthalten, welche von T-Zellen umrandet werden (Hogg et al., 2004). Eine Aktivierung einer adaptiven Immunantwort bei COPD-Patienten ist wahrscheinlich eine Folge einer dauerhaften Aktivierung von angeborenen Immunmechanismen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dendritische Zellen dabei vom Epithel zu den Lymphknoten wandern und Antigene präsentieren, wodurch es zur klonalen Expansion von CD4- und vor allem CD8-positiven Zellen kommen könnte (Barnes and Cosio, 2004). Eine Funktion für B-Lymphozyten bei der Entstehung eines Emphysems legt auch eine Studie nahe, die zeigt, dass B-Lymphozyten-defiziente Mäuse verglichen mit WT Mäusen einen verminderten Lungenschaden aufweisen (John-Schuster et al., 2014). Die chronische Entzündung bei COPD-Patienten wird häufig durch wiederkehrende Infektionen der Lunge aufrechterhalten. Diese Infektionen könnten darüber hinaus einen andauernden Antigenstimulus bieten, der die Lymphozytenantwort auslöst (Barnes and Cosio, 2004).

Epithelzellen

Das Epithelium, das die Atemwege auskleidet, stellt eine effiziente Barriere gegen Mikroorganismen und toxische Substanzen wie z.B. Zigarettenrauch dar. Folgende Eigenschaften sind dabei von großer Bedeutung: mechanische Klärung des Mukus mittels mukoziliärer Clearance, Homöostase des Ionen- und Wassertransports, biochemische antibakterielle Wirkung, antioxidative und Antiproteasen-Funktion und eine zelluläre Barriere durch interzelluläre epitheliale Tight Junctions (Puchelle et al., 2006). Die Wirkung von Zigarettenrauch auf Epithelzellen der Lunge wurde in verschiedenen Studien untersucht. Zigarettenrauchexposition beeinträchtigt die Barrierfunktion von Epithelzellen, was mit einer gesteigerten epithelialen Permeabilität und mit einem Abbau von tight junction Proteinen verbunden ist (Jones et al., 1980; Olivera et al., 2010; Schamberger et al., 2014). Atemwegs- und Alveolarepithelzellen könnten an der Sekretion inflammatorischer Mediatoren und Proteasen bei der COPD beteiligt sein, da sie neben residenten Alveolarmakrophagen die ersten Zellen sind, die mit Zigarettenrauch in Berührung kommen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauchexposition von Epithelzellen zur Sekretion von TNF- α , IL-1 β , GM-CSF und IL-8 führt (Floreani et al., 2003; Hellermann et al., 2002; Mio et al., 1997). Zigarettenrauch induziert auch die Expression des Muzins MUC5AC in Atemwegsepithelzellen (Di et al., 2012). Hoffmann *et al.* zeigten in einer Studie an primären bronchialen Epithelzellen (PBECs) der Lunge, dass PBECs aus Ex-Rauchern mit COPD im Stadium 4 eine erhöhte Expression von spezifischen Proteinen der oxidativen Phosphorylierung sowie von dem mitochondrialen Stressmarker PINK1 im Vergleich zu gesunden Rauchern haben (Hoffmann et al., 2013). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die beobachteten Veränderungen im Epithelium der COPD-Patienten zu einer verschlechterten Funktion der Mitochondrien führt und somit zur Pathogenese der COPD beiträgt. In einer Studie von Spira *et al.* wurde die Expression verschiedener Gene in Atemwegsepithelzellen von Rauchern und Nichtrauchern *ex vivo* mithilfe von Microarray-Analysen untersucht. Zigarettenrauch induzierte die Expression von Genen des xenobiotischen Metabolismus und des oxidativen Stress und verminderte die Expression einiger Gene, die an der Regulierung der Entzündung beteiligt sind (Spira et al., 2004). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die Aufrechterhaltung der Entzündung und der entstehende oxidative Stress zur Pathogenese des zigarettenrauchinduzierten Lungenschadens und letztendlich zur Entstehung von Lungenkrebs beiträgt.

2.3. Bakterielle Pathogene, Zigarettenrauch und COPD

Studien haben gezeigt, dass Zigarettenrauch einen Einfluss auf das Immunsystem des gesamten Atemtrakts hat, sogar in gesunden Individuen (Herr et al., 2009;Mehta et al., 2008;Sethi and Murphy, 2008). Folglich werden Rauchen und Passivrauchen mit einer gestörten mikrobiellen Flora der oberen Atemwege, Hemmung der kommensalen Atemwegsflora und einem erhöhten Risiko von bakteriellen Infektionen in gesunden Menschen in Verbindung gebracht (Brook and Gober, 2005;Charlson et al., 2010;Garmendia et al., 2012;Greenberg et al., 2006). Brook und Gober zeigten, dass die nasopharyngeale Flora von Rauchern im Vergleich zu der von Nichtrauchern weniger aerobe und anaerobe Organismen, die schützende Fähigkeiten haben, und mehr potentielle Pathogene wie z.B. *H. influenzae* und *S. pneumoniae* enthält (Brook and Gober, 2005). Außerdem wird angenommen, dass Rauchen die Kolonisierung der Mundhöhle mit periodontalen Pathogenen erhöht, die subgingivale Mikroflora bei Periodontitis beeinflusst und ein Risikofaktor für periodontale Erkrankungen ist (Van Winkelhoff et al., 2001;Zambon et al., 1996). Desweiteren erhöht Zigarettenrauchen das Risiko für ambulant erworbene Pneumonie (Almirall et al., 1999a;Almirall et al., 1999b) und ist ein starker unabhängiger Risikofaktor für invasive Erkrankung, ausgelöst durch Pneumokokken unter immunkompetenten, nicht-betagten Erwachsenen (Nuorti et al., 2000). Passivrauch begünstigt bakterielle Kolonisierung und Infektion bei Kindern (Brook and Gober, 2005;Greenberg et al., 2006;Nuorti et al., 2000). Greenberg *et al.* zeigten, dass Kinder von rauchenden Eltern eine signifikant höhere Rate von *S. pneumoniae* Besiedlung haben als Kinder von nichtrauchenden Eltern (Greenberg et al., 2006). Passivrauch korreliert bei Kindern auch mit einem signifikant erhöhten Risiko, in den ersten beiden Lebensjahren Infektionen der unteren Atemwege zu entwickeln (Jones et al., 2011).

Stabile COPD-Patienten sind sowohl in den oberen als auch in den unteren Atemwegen häufig mit bakteriellen Pathogenen wie z.B. NTHi, *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* kolonisiert (Garmendia et al., 2012;Moghaddam et al., 2011;Sethi, 2010). Zudem kommen wiederkehrende Infektionen des respiratorischen Systems und chronische Bronchitis bei COPD Patienten häufig vor (Garmendia et al., 2012;Moghaddam et al., 2011;Sethi, 2010;Sethi and Murphy, 2008). Als Ursache für Exazerbationen, also Phasen mit einer Verschlimmerung der Symptome, gelten bakterielle und virale Infektionen der Atemwege.

Unter den bakteriellen Pathogenen, die am häufigsten aus Patienten mit Exazerbationen isoliert wurden, sind *H. influenzae* (20-30% der Patienten) und *S. pneumoniae* (10-15% der Patienten) (Sethi, 2010). Exazerbationen sind mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion und der Lebensqualität assoziiert und einer der Hauptgründe für Todesfälle bei COPD-Patienten (Donaldson et al., 2002). Die mittlere Exazerbationshäufigkeit beträgt 2,5 bis 3 Exazerbationen pro Jahr (Wedzicha and Donaldson, 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass akute Exazerbationen durch die Besiedlung des Wirts mit neuen bakteriellen Stämmen aus der Umwelt hervorgerufen werden (Sethi, 2010;Sethi and Murphy, 2008). Die Hypothese ist, dass neu erworbene bakterielle Pathogene Infektionen der Lunge und schädliche inflammatorische Antworten hervorrufen, die zur klinischen Verschlechterung des Patienten während der Exazerbation beitragen (Sethi, 2010;Sethi and Murphy, 2008;Veeramachaneni and Sethi, 2006). Es wird angenommen, dass akute Exazerbationen ebenso wie chronische bakterielle Besiedlung der Lunge zum Fortschreiten der COPD beitragen, indem sie die angeborene Lungenabwehr schwächen, Entzündung verstärken und Lungenschäden verschlimmern (Garmendia et al., 2012). Pathogene Bakterien schädigen die epithelialen Oberflächen der Lunge direkt und tragen so zur verschlechterten mukoziliären Klärung, erhöhten Mukussekretion und darauffolgenden Mukusanhäufung, fehlerhaften ziliären Aktivität und letztlich Atemflussobstruktion bei (Sethi and Murphy, 2001;Sethi and Murphy, 2008;Shuto et al., 2001).

2.4. NF- κ B bei der Pathogenese der COPD

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Immunmechanismen und Entzündung. Der NF- κ B-Proteinkomplex besteht entweder aus einem Hetero- oder einem Homodimer, die sich aus den Proteinen RelA (p65), RelB, cREL, NF- κ B1 (p50; p105) oder NF- κ B2 (p52; p100) zusammensetzen (Li and Verma, 2002;Liou, 2002). p65 tritt meist in einem Heterodimer mit p50 auf und ist Teil des klassischen NF- κ B-Signalwegs (Liou, 2002) (siehe Abbildung 1). Der klassische Signalweg wird durch Aktivierung des IKK (I kappa B Kinase)-Komplexes vermittelt, welche in der Phosphorylierung und der darauffolgenden Degradierung von I κ B α resultiert. Die Degradierung von I κ B α ermöglicht dem NF- κ B-Dimer in

den Kern zu translozieren, wo es die Expression zahlreicher inflammatorischer Mediatoren reguliert (Perkins, 2007).

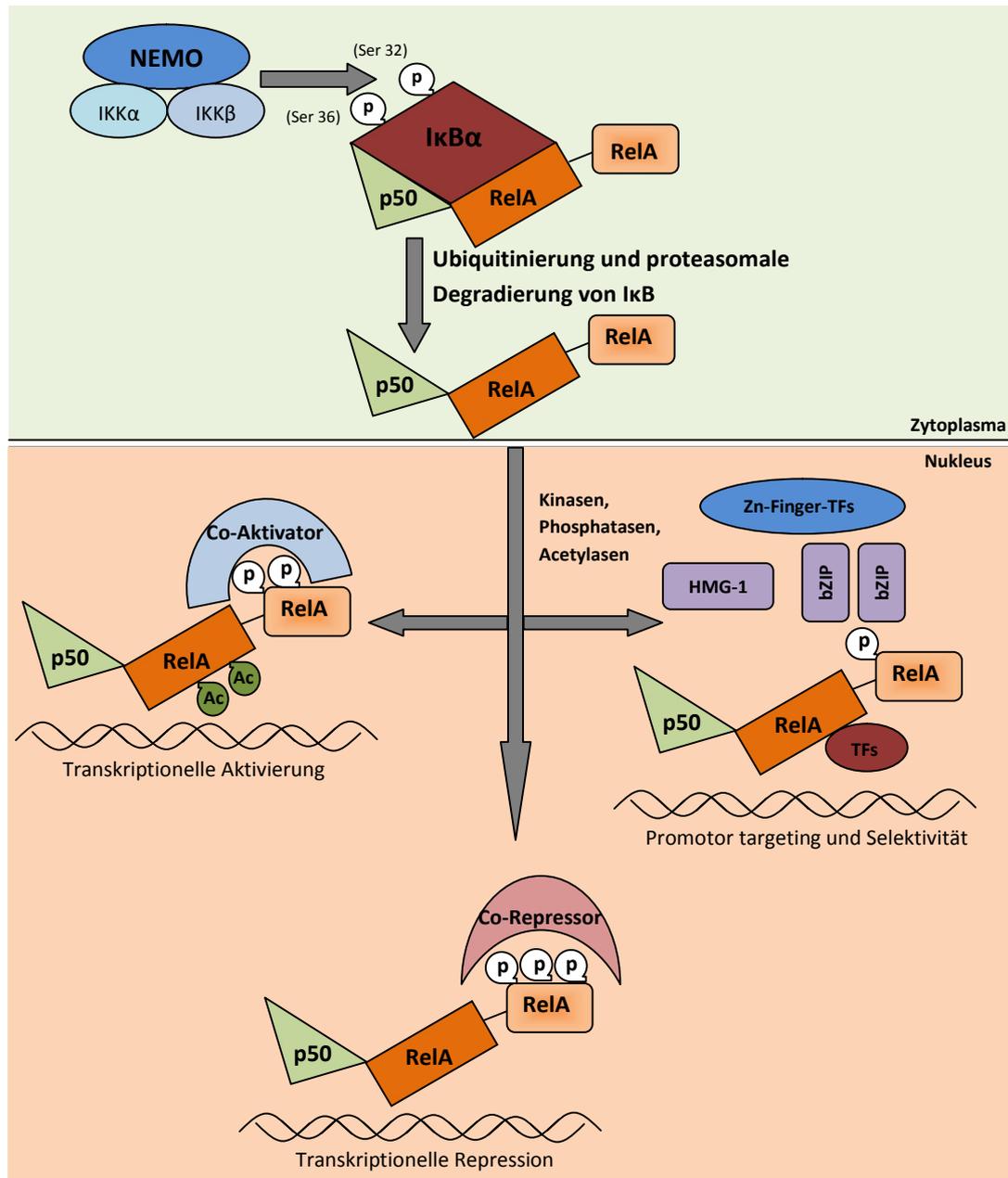


Abbildung 1: Der klassische NF-κB-Signalweg (nach Neil D. Perkins "Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function", 2007). Der klassische NF-κB-Signalweg wird unter anderem durch Toll-like Rezeptoren, TNF-α und IL-1 induziert und ist abhängig von der Aktivierung von IKKβ, einer der beiden Kinasen des IKK-Komplexes. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung (p) von IκBα an den Serinresten Ser32 und Ser36 und zur Ubiquitinierung und anschließender Degradierung durch das 26S Proteasom. Durch die Degradierung von IκBα wird der NF-κB-Komplex freigegeben und kann in den Nucleus translozieren. Die Phosphorylierung der NF-κB-Untereinheiten durch nukleäre Kinasen und die Modifikationen der Untereinheiten durch Acetylasen und Phosphatasen kann sowohl zu einer transkriptionellen Aktivierung als auch zu einer Repression führen. Desweiteren kann die kooperative Interaktion mit heterologen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Zn-Finger-Transkriptionsfaktoren und bZIP, oder mit dem Chromatinprotein HMGB-1 dazu führen, dass die NF-κB-Komplexe an spezifische Promotoren binden. Dies führt zur selektiven Aktivierung der Genexpression durch bestimmte Stimuli. Ac: Acetylasen, bZIP: Leucizipper-enthaltender Transkriptionsfaktor, HMG-I: high-mobility-group Protein IκB: inhibitor of κB, IKK: IκB kinase, NF-κB, nuclear factor-κB, TF: Transkriptionsfaktor, Zn-Finger TF: Zink-Finger-enthaltender Transkriptionsfaktor

Die Analyse von menschlichen Proben zusammen mit *in vitro* und Mausstudien weisen darauf hin, dass NF- κ B-vermittelte Entzündung eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COPD spielt. Di Stefano *et al.* haben herausgefunden, dass die Expression von RelA/p65 in bronchialen Biopsien von gesunden Rauchern und COPD-Patienten erhöht ist und dass die Schwere der Erkrankung mit einer erhöhten epithelialen Expression von NF- κ B assoziiert ist (Di et al., 2002). Außerdem zeigten Szulakowski *et al.* einen Effekt des Rauchens auf die Regulation von NF- κ B in Lungengewebe (Szulakowski et al., 2006). Die Konzentrationen von I κ B α im Lungengewebe waren bei gesunden Rauchern ebenso wie bei Rauchern und Ex-Rauchern mit COPD im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant erniedrigt, was auf eine erhöhte NF- κ B-Aktivität schließen lässt. Desweiteren war die Translokation von NF- κ B in den Kern, gemessen im Lungenhomogenisat, der gesunden Raucher und der Raucher mit COPD signifikant erhöht. Die Kern-DNA-Bindung von NF- κ B, die mithilfe eines Electrophoretic Mobility Shift Assays bestimmt wurde, korrelierte mit der Anzahl der Packungsjahre (Szulakowski et al., 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Konzentrationen von phosphoryliertem I κ B α in den Epithelzellen der Atemwege bei COPD-Patienten erhöht waren (Yagi et al., 2006). Es konnte *in vitro* und in Mausstudien gezeigt werden, dass die RelA/p65-Untereinheit von NF- κ B in Alveolarmakrophagen und in der gesamten Lunge durch Zigarettenrauch aktiviert wird, was zu einer erhöhten Expression inflammatorischer Mediatoren führt (Li et al., 2014a; Rajendrasozhan et al., 2010a; Sundar et al., 2012; Yang et al., 2006; Yang et al., 2008; Yang et al., 2007). Rajendrasozhan *et al.* demonstrierten eine Funktion von NF- κ B in der Entstehung eines rauchinduzierten Lungenschadens im Mausmodell. Die Deletion der NF- κ B-Untereinheit p50 verstärkte die zigarettenrauchinduzierte Entzündung der Lunge und das Emphysem in Mäusen durch eine endogene Regulation von RelA/p65 (Rajendrasozhan et al., 2010a). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IKK α die zigarettenrauchinduzierte Transkription proinflammatorischer Gene durch Phosphoacetylierung von RelA/p65 und Histon H3 vermittelt (Yang et al., 2008).

Obwohl angenommen wird, dass NF- κ B eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von inflammatorischen Lungenerkrankungen wie COPD spielt, ist der spezifische Beitrag von myeloidem NF- κ B zur Gewebshomöostase und zu zigarettenrauchinduzierter Entzündung und Lungenschaden noch immer nicht gut verstanden. Da myeloide Zellen zur Pathogenese von Lungenerkrankungen beitragen, sind sie ein mögliches Ziel für therapeutische Interventionen (Ginhoux and Jung, 2014). Besonders die Inhibierung des NF- κ B-Signalwegs

ist in diesem Zusammenhang interessant, da er durch die Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren und Proteasen Entzündung vermittelt. Die Intervention bei myeloiden Zellen könnte jedoch nachteilige Effekte haben. Myeloide Zellen wie z.B. Alveolarmakrophagen initiieren nicht nur im Falle einer Infektion die Entzündungsreaktion. Sie sind vielmehr auch aktiv an der Auflösung der Entzündung und Gewebserneuerung beteiligt (Ginhoux and Jung, 2014; Herold et al., 2011). Da Studien gezeigt haben, dass der NF- κ B-Signalweg die Gewebshomöostase in verschiedenen Organen wie der Haut oder dem Darm reguliert und die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs in Epithelzellen zu chronischen Entzündungszuständen führt (Pasparakis, 2009), ist es fraglich, ob die Hemmung von NF- κ B in myeloiden Zellen eine angemessene Behandlungsstrategie für chronische Lungenerkrankungen ist.

2.5. IL-17A bei der Pathogenese der COPD

IL-17A ist ein Mitglied der IL-17-Zytokinfamilie, die aus IL-17A bis F besteht und durch spezifische IL-17 Rezeptoren (siehe Abbildung 2) erkannt wird (Gaffen, 2009). IL-17A wird von verschiedenen Entzündungs- bzw. Immunzellen wie z.B. CD4+Th17 Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und Makrophagen exprimiert und ausgeschüttet und ist wichtig für die Klärung von extrazellulären Pathogenen (Tan and Rosenthal, 2013). Zusammen mit IL-17F reguliert IL-17A über die Induktion der Sekretion von inflammatorischen Mediatoren in Zielzellen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zur Infektionsstelle. IL-17A/F induzieren die Expression von antimikrobiellen Peptiden, Muzinen und inflammatorischen Zytokinen in respiratorischen Epithelzellen durch ihre Bindung an die IL-17 Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC (Harrington et al., 2005; Kao et al., 2004; Laan et al., 2001; Lu et al., 2008; Song et al., 2008; Yao et al., 1995; Ye et al., 2001b; Zhang et al., 2009).

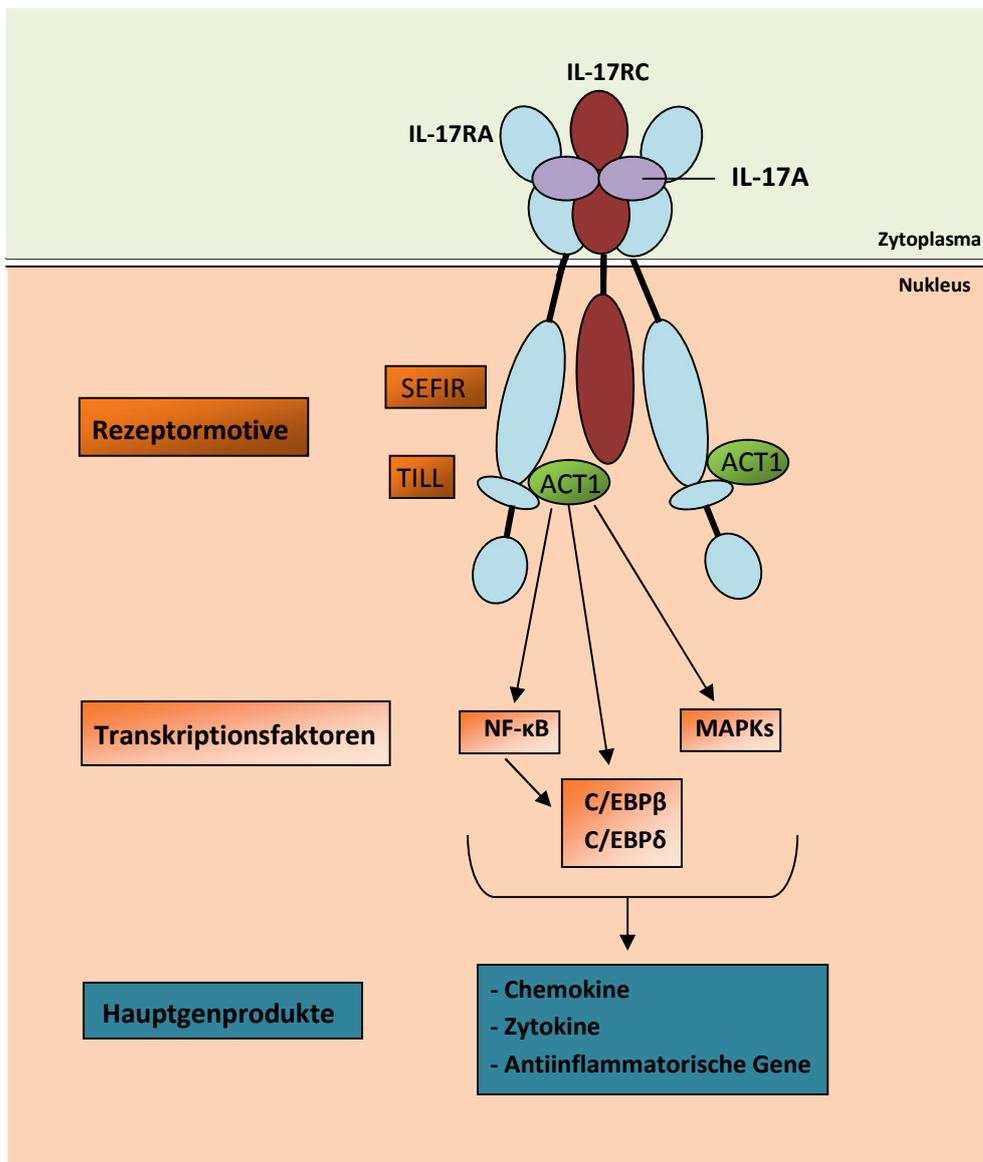


Abbildung 2: IL-17-induzierte Signalwege (nach Sarah L. Gaffen "Structure and signalling in the IL-17 receptor family", 2009). Der IL-17-Rezeptorkomplex besteht aus IL-17RA und IL-17RC. Beide Untereinheiten besitzen eine intrazelluläre SEF/IL-17R-Domäne (similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R, kurz SEFIR), IL-17RA besitzt jedoch zusätzlich eine TIR-like loop (TILL), also eine Toll/IL-1R BB-loop Domäne intrazellulär. Das SEFIR-Domänen enthaltende Adapterprotein Act1 (NF-κB activator 1) vermittelt die Signalweiterleitung des IL-17 Signalwegs im Kern. Es wird benötigt für die Rekrutierung von TRAF6 (TNFR-associated factor 6) und möglicherweise von TRAF3, die beide Aktivatoren des klassischen NF-κB-Signalwegs sind und ist essentiell für die IL-17A-induzierte Stabilisierung einiger Ziel mRNAs über den MAPK-Signalweg (mitogen-activated protein kinases). Der IL-17A Signalweg im Kern führt über Act1 zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors C/EBPβ (CCAAT/enhancer-binding protein-β) durch ERK (extracellular signal-regulated kinase). Die Phosphorylierung von C/EBPβ führt zu einer Herunterregulation seiner transkriptionellen Kapazität und ist somit eine der wenigen bekannten inhibitorischen Auswirkungen des IL-17A-Signalwegs. Die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs führt zur Aktivierung von C/EBPβ und C/EBPδ und somit zur verstärkten Transkription der Zielgene.

Kürzlich erschienene Studien deuten darauf hin, dass IL-17A und Th17 Zellen zur Pathogenese der COPD beitragen könnten. Erhöhte Konzentrationen von IL-17A und erhöhte Zellzahlen von IL-17A-positiven Zellen wurden in der bronchialen Mukosa und im Sputum

von COPD-Patienten gefunden (Chang et al., 2011;Di et al., 2009;Doe et al., 2010). Eine Studie von Roos *et al.* zeigte, dass die Expression von IL-17A im Endstadium der COPD (hauptsächlich in Mastzellen) erhöht ist (Roos et al., 2015a). Die Funktion von IL-17A und dem Rezeptor IL-17RA wurde ebenfalls in Tiermodellen des Lungenschadens, verursacht durch Zigarettenrauch und oxidativem Stress, untersucht (Chen et al., 2011;Pinart et al., 2013;Shan et al., 2012). Mithilfe von quantitativer μ CT-Analyse zeigten Shan *et al.*, dass IL-17A-defiziente Mäuse, die 4 Monate lang Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, vor dem Anstieg des Lungenvolumens und der Abnahme der Lungendichte geschützt waren, während die Überexpression von IL-17A zu einem verschlimmerten Phänotyp im Vergleich zu WT Mäusen führte (Shan et al., 2012). Zusätzlich zeigten IL-17RA-defiziente Mäuse, die 6 Monate Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, keine Erhöhung des mean linear intercept (MLI), eines Maßes für Emphysem, im Vergleich zu WT Mäusen, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden (Chen et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte die IL-17RA-Defizienz die Mäuse nicht vor einem Ozon-induzierten Anstieg des MLI schützen. Der Emphysem-Score war sogar bei IL-17RA-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen erhöht (Pinart et al., 2013).

2.6. Weitere Zytokine, Chemokine und Proteasen bei der Pathogenese der COPD

Zytokine sind Signalproteine, die von verschiedenen Zelltypen abgegeben werden und auf angrenzende Zellen wirken, also meist eine parakrine Wirkweise haben, wobei auch endokrine und autokrine Wirkungen möglich sind. Bei einem Krankheitsbild wirken immer mehrere Zytokine zusammen und es herrscht eine große Pleiotropie und Redundanz unter den Zytokinen (Chung, 2001). Im Allgemeinen sind die Bildung und Sekretion von Zytokinen bei COPD-Patienten im Vergleich zu asymptomatischen Rauchern erhöht (Chung, 2001). So konnten zum Beispiel erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-1 β , TNF- α und IL-8 in induziertem Sputum und bronchoalveolären Lavage von Patienten mit stabiler COPD nachgewiesen werden (Keatings et al., 1996;Kuschner et al., 1996). Die Zytokine und Entzündungsmediatoren, die bei der COPD eine Rolle spielen, können nach ihrer Funktion in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle 1).

2.6.1. Proinflammatorische Zytokine

IL-1 α und IL-1 β

IL-1 wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet, darunter Fibroblasten, neutrophile Granulozyten und Atemwegsepithelzellen, wobei die Hauptproduzenten Monozyten/Makrophagen sind (Chung, 2001). IL-1 trägt zur Leukozytose durch die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark bei und induziert in verschiedenen Zellen die Sekretion von weiteren Zytokinen wie z.B. IL-6, IL-8, RANTES, GM-CSF und TNF (Chung, 2001). Außerdem induziert es die Expression von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) in Endothelzellen, was zur erhöhten Adhäsion von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten an das vaskuläre Endothelium und das respiratorische Epithelium führt (Chung, 2001). Eine erhöhte Expression von IL-1 α (Pauwels et al., 2011) und eine erhöhte Anzahl IL-1 α -produzierender Zellen wurde im Sputum von COPD Patienten nachgewiesen (Botelho et al., 2011). Die Konzentrationen von IL-1 β zeigten sich in der BAL von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht (Kuschner et al., 1996). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-1 α und IL-1 β nach akuter (Botelho et al., 2011) und subchronischer Rauchexposition (Pauwels et al., 2011) in den Lungen vermehrt gebildet werden und dass IL-1RI-Knockoutmäuse vor dem Einstrom inflammatorischer Zellen und erhöhten Konzentration von IL-1 α und IL-1 β in der Lunge nach Rauchexposition geschützt sind (Pauwels et al., 2011).

IL-6

IL-6 wird hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet, wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten, aber auch von B-Lymphozyten und zu einem kleineren Anteil von T-Lymphozyten (Chung, 2001; Rincon and Irvin, 2012). Zusätzlich wird IL-6 auch von Strukturzellen, wie Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten sekretiert (Hirano, 1998). Eine Vielzahl von Stimuli, die Zellstress oder Zellschäden verursachen (z.B. UV-Strahlung, reaktive Sauerstoffspezies, Bakterien, Viren und proinflammatorische Zytokine), können die Bildung von IL-6 auslösen (Rincon and Irvin, 2012). Im induzierten Sputum von COPD-Patienten, die mehrmals im Jahr eine Exazerbation erleiden (mehr als 3 pro Jahr), wurden im Vergleich zu COPD-Patienten, die seltener als zweimal im Jahr eine Exazerbation erleiden, erhöhte

Konzentrationen von IL-6 nachgewiesen werden (Wedzicha et al., 2000). Es konnten außerdem erhöhte Konzentrationen von IL-6 im induziertem Sputum von Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu Nichtrauchern (Keatings et al., 1996) und in der bronchoalveolären Lavage von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern nachgewiesen werden (Kuschner et al., 1996). Die Bedeutung von IL-6 konnte auch in einem Mausmodell nachgewiesen werden. In einer Studie von Ruwanpura *et al.* wurden Mäuse mit einer knock-in Mutation im Rezeptor gp130 generiert, die zur Deregulierung des intrazellulären IL-6 Signalwegs und somit zu erhöhten IL-6 Konzentrationen in den Lungen führte (Ruwanpura et al., 2011). Die erhöhte Konzentration von IL-6 reichten in dieser Studie aus, um in 6 Monate alten Mäusen spontan einen emphysemartigen Zustand zu induzieren (Ruwanpura et al., 2011), der durch erhöhte Lungenkapazitäts- und compliance-Werte gekennzeichnet war.

G-CSF

G-CSF ist an der Aufrechterhaltung der Anzahl der im Blut zirkulierenden Granulozyten beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der neutrophilen Granulozyten Antwort während bakterieller Infektionen. Zusammen mit IL-8 erhöht G-CSF die Zahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten durch Verstärkung der Reifung der neutrophilen Granulozyten und deren Abgabe in den Blutkreislauf (Lord et al., 1989). Desweiteren moduliert G-CSF die Funktion von neutrophilen Granulozyten, indem z.B. die chemotaktische Mobilität und die CD11b/CD18 Expression erhöht werden, die Zelladhäsion an das Endothelium verstärkt wird, die Phagozytoserate erhöht wird und zusammen mit der neutrophilen Elastase der oxidative Burst induziert wird (De et al., 1994; Khwaja et al., 1992). In einer Studie von Hens *et al.* konnten erhöhte Konzentrationen von G-CSF in den Nasensekreten von COPD-Patienten gefunden werden. Signifikante Korrelationen zwischen inflammatorischen Mediatoren in den Nasensekreten und Lungenfunktionsparametern wurden jedoch nicht festgestellt (Hens et al., 2008). *In vitro* konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Lungenepithelzellen nach Behandlung mit Zigarettenrauchextrakt vermehrt G-CSF produzieren (Masubuchi et al., 1998).

2.6.2. IL-10

IL-10 inhibiert die Synthese vieler inflammatorischer Proteine wie z.B. TNF- α , GM-CSF, IL-5 und einiger Chemokine, die bei COPD-Patienten verstärkt gebildet werden (Barnes, 2008). IL-10 vermindert auch die Antigenpräsentation von Makrophagen (Pretolani and Goldman, 1997). IL-10 wird hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen (Tregs) und Makrophagen (Hawrylowicz, 2005) gebildet. Aber auch Th0-, Th1- und Th2-Zellen sekretieren IL-10 (Del et al., 1993; Fiorentino et al., 1989; Yssel et al., 1992). Bei COPD-Patienten und gesunden Rauchern konnten ähnliche Konzentrationen von IL-10 in Serum und Sputum nachgewiesen werden, im Vergleich zu Nichtrauchern waren diese jedoch verringert (Takanashi et al., 1999; Zhang et al., 2013). Außerdem war der Anteil der IL-10-positiven Zellen im Sputum bei COPD-Patienten sowie bei gesunden Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant geringer (Takanashi et al., 1999). Andererseits konnte *ex vivo* eine erhöhte Sekretion von IL-10 durch Alveolarmakrophagen von Zigarettenrauchern und COPD-Patienten festgestellt werden (Lim et al., 2000). Diese Studien deuten darauf hin, dass die Bildung von IL-10 bereits durch Zigarettenrauchexposition allein beeinflusst wird. Über die Funktion von IL-10 bei der Pathogenese der COPD ist jedoch wenig bekannt.

2.6.3. Neutrophile Granulozyten rekrutierende Chemokine

IL-8/KC

IL-8, ein CXC Chemokin (zwei Cysteinreste, die durch eine nicht konservierte Aminosäure getrennt sind) wirkt wie G-CSF chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Lee et al., 1995) und aktiviert diese unter anderem durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, durch Exozytose mit der Freisetzung von Enzymen und Proteinen aus intrazellulären Speicherorganellen und der Induktion des respiratorischen Burst (Chung, 2001). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauchexposition die IL-8 Expression und Sekretion von bronchialen Epithelzellen erhöht (Mio et al., 1997). Die im Zigarettenrauch enthaltenen Oxidantien verursachen die Abgabe von IL-8 von Makrophagen und Epithelzellen (Chung, 2001). Eine erhöhte Expression von IL-8 wurde *ex vivo* im bronchialen Epithelium von COPD-Patienten nachgewiesen (de Boer et al., 2000). Außerdem konnten erhöhte Konzentrationen von IL-8 im induziertem Sputum von Patienten mit

stabiler COPD nachgewiesen werden (Keatings et al., 1996). Eine erhöhte Sekretion von IL-8 durch Alveolarmakrophagen von Zigarettenrauchern und COPD-Patienten konnte festgestellt werden (Lim et al., 2000). Die Konzentrationen von IL-8 waren in der bronchoalveolären Lavage von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht (Kuschner et al., 1996). KC und MIP-2 sind die funktionellen IL-8-Homologen der Maus. Kuipers *et al.* zeigten in einer Studie, dass die Konzentration von KC in der BAL von Mäusen, die 4 Wochen Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, signifikant erhöht war im Vergleich zu luftexponierten Mäusen (Kuipers et al., 2012). Eine Studie von van der Toorn zeigte, dass die Konzentration von KC nach akuter Rauchexposition für 4 Tage im Lungenhomogenisat im Vergleich zu luftexponierten Mäusen erhöht war (van der Toorn et al., 2013).

Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)

MIP-2 gehört mit KC zu den wichtigsten Chemokinen, die neutrophile Granulozyten rekrutieren (Lee et al., 1995). Die Rekrutierung erreicht ihren Höhepunkt, wenn beide Chemokine zusammenwirken (De et al., 2008). MIP-2 wird von einer Vielzahl von Zelltypen gebildet wie z.B. neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und Epithelzellen (Driscoll, 1994), hauptsächlich jedoch von Gewebsmakrophagen. Dies konnte in einer Studie von De Filippo *et al.* bestätigt werden, in der in einem LPS-Peritonitis-Modell Makrophagen die Hauptproduzenten von MIP-2 waren (De et al., 2008). In Mäusen ist MIP-2 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach bakterieller Stimulation essentiell (Mehrad et al., 1999). Es spielt auch im Mausmodell der akuten Zigarettenrauchexposition eine wichtige Rolle. Thatcher *et al.* zeigten in einer Studie eine Erhöhung der Konzentration von MIP-2 in der BAL von Mäusen, die 3 Tage rauchexponiert wurden (Thatcher et al., 2005).

2.6.4. Monozyten rekrutierende Chemokine

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)

MCP-1 (oder auch CCL2 genannt) ist ein Mitglied der C-C Chemokinfamilie und wirkt chemotaktisch auf Monozyten. Es wird von verschiedenen Zelltypen entweder konstitutiv oder nach Induktion durch oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren gebildet (Deshmane et al., 2009). Die Zellen, die MCP-1 sekretieren, sind Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen und glatte Muskelzellen (Deshmane et al., 2009), vor allem

jedoch Monozyten und Makrophagen (Yoshimura et al., 1989a; Yoshimura et al., 1989b). MCP-1 ist möglicherweise an der Rekrutierung von Monozyten in das Atemwegsepithel bei COPD-Patienten beteiligt (de Boer et al., 2000). De Boer *et al.* zeigten in einer Studie, dass die Expression von MCP-1 im bronchialen Epithel bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern erhöht ist und dass MCP-1 von Makrophagen, T-Zellen, Endothel- und Epithelzellen exprimiert wird (de Boer et al., 2000). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Verschlechterung der Lungenfunktion, gemessen in einem verringerten FEV1-Wert, mit der erhöhten Expression von MCP-1 im Atemwegsepithel korrelierte (Fuke et al., 2004). In einer Studie von Kushner *et al.* wurde gezeigt, dass die Konzentration von MCP-1 in der bronchoalveolären Lavage von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht ist (Kushner et al., 1996). Auch *in vitro* wurde die Rolle von MCP-1 bei Zigarettenrauchexposition untersucht. Lungenepithelzellen produzierten nach Behandlung mit Zigarettenrauchextrakt vermehrt MCP-1 (Masubuchi et al., 1998).

Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)

MIP-1 α (auch CCL3 genannt) ist ebenfalls ein Mitglied der C-C Chemokinfamilie, zu der auch RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) gehört (Brown et al., 1989). MIP-1 α ist chemotaktisch für Zellen der monozytären Linie und zusätzlich chemotaktisch für NK-Zellen (natural killer cells) (Maghazachi et al., 1994) und für eosinophile Granulozyten (Rot et al., 1992). MIP-1 α induziert die Expression von ICAM-1 (Vaddi and Newton, 1994), die Mastzellendegranulation (Alam et al., 1994) und die Produktion von TNF- α , IL-1 und IL-6 (Fahey, III et al., 1992). Klinische Daten weisen auf eine wichtige Rolle von MIP-1 α bei der COPD hin. Eine erhöhte Expression von MIP-1 α im Atemwegsepithelium korrelierte in einer Studie von Fuke *et al.* mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion, gemessen in einem verringerten FEV1-Wert (Fuke et al., 2004). Die Expression von MIP-1 α in ganzen Schnitten von Lungengewebe war bei Rauchern mit verschlechterter Lungenfunktion und/oder Emphysem im Vergleich zu gesunden Rauchern oder Nichtrauchern signifikant erhöht (Fuke et al., 2004). In derselben Studie wurden auch bronchiale Epithelzellen untersucht. Auch da konnte eine erhöhte MIP-1 α Expression bei Patienten mit verschlechterter Lungenfunktion und/oder Emphysem im Vergleich zu gesunden Rauchern festgestellt werden (Fuke et al., 2004). Der oxidative Stress, den Zigarettenrauchexposition auslöst, führt im Atemwegsepithel und in Alveolarmakrophagen

zur Sekretion von Zytokinen, wie z.B. TNF- α , die dann wiederum in Atemwegsepithelzellen unter anderem zur Bildung von MIP-1 α führen (Barnes et al., 2005;Rahman, 2005).

RANTES

Anfangs wurde angenommen, dass RANTES (auch CCL5 genannt) nur für T-Zellen und Monozyten chemotaktisch ist (Schall et al., 1990). Mittlerweile konnte bewiesen werden, dass es auch eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten spielt (Kameyoshi et al., 1992;Lukacs et al., 1996;Lukacs et al., 1997;Meurer et al., 1993;Rot et al., 1992). RANTES wird von einer Reihe von Zellen wie CD8-positive T-Zellen (Nelson et al., 1993), Endothelzellen (Marfaing-Koka et al., 1995) und Lungenepithelzellen exprimiert (Kwon et al., 1995;VanOtteren et al., 1995). In einigen COPD-Patienten kann eine Atemwegseosinophilie nachgewiesen werden, die auf die Expression von RANTES zurückzuführen sein könnte (Chung, 2001). Während Exazerbationen der COPD konnte eine Atemwegseosinophilie beobachtet werden, die ähnlich stark wie die bei Asthma-Patienten ist (Saetta et al., 1996;Zhu et al., 2001) und die mit einer erhöhten RANTES-Expression von supepithelialen und epithelialen Atemwegszellen einhergeht (Zhu et al., 2001). Eine Studie von Cao *et al.* konnte mithilfe eines Antikörper-Arrays im Serum von COPD-Patienten erhöhte Spiegel von RANTES im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern nachweisen (Cao et al., 2012).

2.6.5. Metalloproteasen

MMP-9

MMP-9 ist in der gesunden adulten Lunge in sehr geringen Mengen vorhanden, in einigen Lungenkrankheiten, inklusive Asthma, idiopathischer Lungenfibrose und COPD ist die Konzentration jedoch stark erhöht (Atkinson and Senior, 2003). Neutrophile Granulozyten produzieren neben anderen Proteasen auch MMP-9, welches zur Zerstörung der Alveolen beiträgt (Barnes, 2004b). MMP-9 wird auch von Alveolarmakrophagen bei COPD-Patienten sekretiert und ist dabei das vorherrschende elastolytische Enzym (Barnes, 2004b). In der gesunden Lunge wird MMP-9 von den vorhandenen Zellen nicht gebildet, aber nach Stimulation können bronchiale Epithelzellen (Yao et al., 1999), Clarazellen (Zuo et al., 2002),

Alveolar-TypII-Zellen (Pardo et al., 1998), Fibroblasten (Wilhelm et al., 1989), glatte Muskelzellen (Kenagy and Clowes, 1994) und Endothelzellen (Schnaper et al., 1993) MMP-9 produzieren. Es konnte noch nicht gezeigt werden, dass Alveolar-TypI-Zellen MMP-9 bilden (Atkinson and Senior, 2003). Neben den Strukturzellen können auch Leukozyten die Produzenten von MMP-9 in der Lunge sein, wie Makrophagen (Welgus et al., 1990), eosinophile Granulozyten (Ohno et al., 1997), Mastzellen (Kanbe et al., 1999), Lymphozyten (Weeks et al., 1993), NK-Zellen (Albertsson et al., 2000) und dendritische Zellen (Bartholome et al., 2001). Residente Lungenzellen wie Alveolarmakrophagen und Epithelzellen ermöglichen durch die Sekretion von MMP-9 unter anderem die Migration von Basalzellen nach Verwundung der Trachea (Legrand et al., 1999). Weiterhin degradiert MMP-9 α 1-Antitrypsin und aktiviert somit die neutrophile Elastaseaktivität (Liu et al., 2000). MMP-9 erhöht auch die kollagenolytische Aktivität von MMP-13 (Engsig et al., 2000). Es schneidet außerdem von IL-8 ein Peptid ab und erhöht somit seine chemotaktische Aktivität für neutrophile Granulozyten um das 10-fache (Atkinson and Senior, 2003). Die unverhältnismäßige Expression und exzessive Aktivität von MMP-9 (Boschetto et al., 2006; Elias et al., 2006) wird mit der Zerstörung des Gewebes bei der COPD in Verbindung gebracht (Chaudhuri et al., 2012; Demedts et al., 2005; Elias et al., 2006; Elkington and Friedland, 2006; Gueders et al., 2006; Lavigne et al., 2004). Klinische Daten legen eine wichtige Rolle von MMP-9 bei der COPD nahe. Erhöhte Sputumkonzentrationen und/oder Sputumaktivität von MMP-9 konnten in Rauchern mit COPD im Vergleich zu gesunden Rauchern nachgewiesen werden (Lowrey et al., 2008). In einer Studie von Chaudhuri *et al.* konnte eine Korrelation zwischen erhöhter MMP-9 Expression im Sputum von Patienten mit moderater und schwerer COPD und einem reduzierten FEV1-Wert nach Bronchodilator Gebrauch festgestellt werden (Chaudhuri et al., 2012). In einer Studie von Mercer *et al.* wurde gezeigt, dass die Sputumkonzentrationen von MMP-9 während Exazerbationen signifikant anstieg und dass die Konzentrationen mit den Zahlen der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten korrelierte (Mercer et al., 2005). Auf der anderen Seite zeigte eine Studie von Atkinson *et al.*, dass die Defizienz für MMP-9 nicht vor rauchinduzierter Entzündung und Lungenschaden bei Mäusen schützt und dass es keine Korrelation zwischen Makrophagen MMP-9 und dem Grad des Emphysems im benachbarten Gewebe aus COPD Patienten gibt (Atkinson et al., 2011).

MMP-12

MMP-12 gehört wie MMP-9 zur Gruppe der Matrixmetalloproteinasen und wird von Alveolarmakrophagen gebildet (Niewoehner et al., 1974). MMP-12 ist am Abbau der extrazellulären Matrix in physiologischen Prozessen wie z.B. während der Embryonalentwicklung oder beim adulten Gewebsumbau beteiligt (Parks, 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass Zigarettenrauch die Expression von MMP-12 verstärkt. In Alveolarmakrophagen von Rauchern konnte eine stark erhöhte Expression von MMP-12 im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Nichtrauchern (Woodruff et al., 2005) und von Ex-Rauchern (Wallace et al., 2008) nachgewiesen werden. Eine Studie von Babusyte *et al.* konnte erhöhte Zahlen von MMP-12-positiven Makrophagen in der BAL von Rauchern mit COPD im Vergleich zu Ex-Rauchern mit COPD oder gesunden Rauchern und Nichtrauchern feststellen (Babusyte et al., 2007). In einer Studie von Ilumets *et al.* wurde gezeigt, dass die Konzentration von MMP-12 im Sputum von COPD-Patienten im Stadium 0 höher war als im Sputum von Nichtrauchern und dass MMP-12 in Alveolarmakrophagen der Patienten durch Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte (Ilumets et al., 2007). Eine weitere Studie zeigt erhöhte Sputumkonzentrationen von MMP-12 bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern, Ex-Rauchern und Nichtrauchern (Demedts et al., 2006). Gegensätzlich dazu deuten einige Studien darauf hin, dass MMP-12 keine ausschlaggebende Rolle bei der COPD spielt, da in diesen Studien weder im Sputum, *ex vivo* in kultivierten Alveolarmakrophagen noch im Lungengewebe erhöhte MMP-12 Konzentrationen oder mRNA-Spiegel festgestellt werden konnten (Finlay et al., 1997; Imai et al., 2001; LaPan et al., 2010). Im Emphysemmodell bei Mäusen scheint MMP-12 eine essentielle Funktion zu haben. Hautamaki *et al.* zeigten in einer Studie, dass MMP-12-defiziente Mäuse nach 6 Monaten Zigarettenrauchexposition keine emphysemartigen Veränderungen der Lunge, gemessen in der Stereologie mithilfe des mean linear intercept, aufwiesen und dass sie im Vergleich zu WT Mäusen keine veränderten Makrophagenzahlen in den Lungen hatten (Hautamaki et al., 1997). Eine mögliche Erklärung für die Rolle von MMP-12 im Mausmodell liefert eine Studie von Raza und Kollegen. Zigarettenrauchexposition führte in dieser Studie unter anderem zum Übertritt von Plasminogen und Prothrombin aus dem Serum in den Alveolarraum von Mäusen (Raza et al., 2000). Plasminogen und Prothrombin können zu Plasmin und Thrombin umgewandelt werden, wobei Thrombin PAR-1 (proteinase activated receptor-1) aktiviert und dies sowohl zur Sekretion des unreifen MMP-12 Proteins und zur Aktivierung des

sekretierten Proteins führt (Raza et al., 2000). MMP-12 scheint im Mausmodell nicht nur zur Matrixdegradierung beizutragen, sondern auch proinflammatorisch zu wirken. In einer Studie von Nénan *et al.* führte die Instillation der katalytischen Domäne des rekombinanten menschlichen MMP-12 in die Atemwege von Mäusen zu einer anfänglichen Neutrophilie in der BAL, die nach einiger Zeit zu einer Erhöhung der Makrophagenzahlen und der Konzentration einiger proinflammatorischer Zytokine und MMP-9 führte (Nenan et al., 2005). Ein weiterer potentiell pathogener Effekt einer erhöhten MMP-12-Konzentration in der Lunge ist die Freisetzung von Matrixfragmenten wie z.B. Elastinfragmenten, die als proinflammatorisch angesehen werden (Churg et al., 2012). Es konnte beobachtet werden, dass Elastinfragmente Monozyten rekrutieren und so zum inflammatorischen Geschehen beitragen (Hunninghake et al., 1981; Senior et al., 1980). Obwohl die Daten aus Mausversuchen die Rolle von MMP-12 bei der Emphysementstehung belegen, bleibt die Interpretation der menschlichen Daten schwierig.

2.6.6. Neutrophile Elastase

Die neutrophile Elastase gehört zusammen mit der Proteinase 3 und Cathepsin G zu der Chymotrypsin-Superfamilie der Serinproteasen (Korkmaz et al., 2010). Sie ist eine der wichtigen Proteasen der neutrophilen Granulozyten, mit deren Hilfe phagozytierte und auch extrazelluläre mikrobielle Pathogene bekämpft und Matrixbestandteile degradiert werden (Hoenderdos and Condliffe, 2013). Neben diesen Funktionen könnte die neutrophile Elastase auch eine Rolle bei der Chemotaxis und Migration von neutrophilen Granulozyten durch Schneiden von Adhäsionsmolekülen an interzellulären Junctions spielen (Cepinskas et al., 1999; Hermant et al., 2003). Ein genetischer Auslöser der COPD, der für ca. 2% der Fälle verantwortlich ist, ist die α 1-Antitrypsin-Defizienz, die zur unkontrollierten Wirkung von Proteasen wie z.B. der neutrophilen Elastase führt (Korkmaz et al., 2010). Neben dieser genetischen Prädisposition führt Zigarettenrauch über die Aktivierung der Alveolarmakrophagen zur Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und somit möglicherweise zur verstärkten Sekretion von neutrophiler Elastase (Barnes, 2004b). In der BAL von COPD-Patienten konnten tatsächlich erhöhte Konzentrationen neutrophiler Elastase nachgewiesen werden (Korkmaz et al., 2010). Die pathogene Rolle der neutrophilen Elastase bei der COPD wird ihrer Fähigkeit zum Abbau von Bestandteilen des Bindegewebes und der Generierung proinflammatorischer Peptide aus diesen Bestandteilen zugeschrieben

(Houghton et al., 2006;Weathington et al., 2006). Oxidativer Stress, der durch ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien hervorgerufen wird, könnte ebenfalls zur COPD-Pathogenese beitragen (Korkmaz et al., 2010). Ein Indiz dafür liefern Daten aus Rauchern mit Emphysem, bei denen oxidiertes und somit inaktives α 1-Antitrypsin in der BAL vorhanden ist (Morrison et al., 1986a;Morrison et al., 1987;Morrison et al., 1986b;Sethi and Rochester, 2000), welches nicht mehr vor der Wirkung der neutrophilen Elastase schützen kann. Im Mausmodell konnte in einer Studie von Shapiro *et al.* gezeigt werden, dass neutrophile Elastase-defiziente Mäuse nach chronischer Rauchexposition ein weniger stark ausgebildetes Emphysem zeigen (Shapiro et al., 2003).

Tabelle 1 listet die in dieser Arbeit beschriebenen Zytokine, Chemokine und Proteasen, die bei der Pathogenese der COPD eine Rolle spielen, mit ihren Funktionen, Ursprungszellen, Patientendaten und Mausstudien auf.

Tabelle 1: Zytokine, Chemokine und Proteasen bei der Pathogenese der COPD

Zytokin	Funktion	Ursprungszelle(n)	Patientendaten	Mausstudien	
IL-17A	Klärung von extrazellulären Pathogenen; Regulation der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten über die Induktion der Sekretion von inflammatorischen Mediatoren in Zielzellen; Expression von antimikrobiellen Peptiden, Muzinen und inflammatorischen Zytokinen in respiratorischen Epithelzellen	CD4+Th17 Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und Makrophagen, Mastzellen	erhöhte Konzentrationen von IL-17A und erhöhte Zellzahlen von IL-17A-positiven Zellen in der bronchialen Mukosa und im Sputum von COPD-Patienten (Chang et al., 2011; Di et al., 2009; Doe et al., 2010); erhöhte Expression von im Endstadium der COPD (Roos et al., 2015a)	IL-17A-defiziente Mäuse, die 4 Monate lang Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, waren vor dem Anstieg des Lungenvolumens und der Abnahme der Lungendichte geschützt, während die Überexpression von IL-17A zu einem verschlimmerten Phänotyp im Vergleich zu WT Mäusen führte (Shan et al., 2012); IL-17RA-defiziente Mäuse, die 6 Monate Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, zeigten keine Erhöhung des MLI im Vergleich zu WT Mäusen, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden (Chen et al., 2011); kein Schutz der Mäuse durch IL-17RA-Defizienz vor einem Ozon-induzierten Anstieg des MLI schützen (Pinart et al., 2013).	
IL-1 α	Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark; Induktion der Zytokinsekretion (IL-6, IL-8, RANTES, GM-CSF und TNF), Induktion der ICAM-1-Expression in Endothelzellen	Fibroblasten, neutrophile Granulozyten, Atemwegsepithelzellen, Monozyten/Makrophagen	erhöhte Expression im Sputum von COPD-Patienten (Pauwels et al., 2011)	erhöhte Konzentrationen in der Lunge nach akuter (Botelho et al., 2011) und subchronischer (Pauwels et al., 2011) Rauchexposition	
IL-1 β	siehe IL-1 α	siehe IL-1 α	erhöhte Konzentrationen in der BAL bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Kuschner et al., 1996)	siehe IL-1 α	
IL-6	T-Zell-Differenzierung, aber auch an der Aufrechterhaltung der Entzündung durch Initiierung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und Dämpfung der Entzündung durch Induktion der Apoptose in neutrophilen Granulozyten beteiligt	Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten, aber auch von B-Lymphozyten und zu einem kleineren Anteil von T-Lymphozyten, von Strukturzellen wie Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten	erhöhte Konzentrationen im induzierten Sputum von COPD-Patienten mit ≥ 1 Exazerbation/Jahr (Wedzicha et al., 2000); erhöhte Konzentrationen in induziertem Sputum von Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu Nichtrauchern (Keatings et al., 1996) und in der BAL von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Kuschner et al., 1996)	emphysemartiger Zustand in 6 Monate alten Mäusen durch erhöhte Konzentrationen von IL-6 in den Lungen (Ruwanpura et al., 2011)	
G-CSF	wichtige Rolle bei der neutrophilen Antwort während bakterieller Infektionen; Erhöhung der Zahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten durch Verstärkung der Reifung, vermehrte Abgabe in den Blutkreislauf, desweiteren moduliert G-CSF die Modulation der chemotaktischen Mobilität, CD11b/CD18 Expression und der Phagozytoserate von neutrophilen Granulozyten		vor allem Makrophagen, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten	erhöhte Konzentrationen von G-CSF in den Nasensekreten von COPD-Patienten (Hens et al., 2008)	-
IL-10	inhibiert die Synthese vieler inflammatorischer Proteine wie z.B. TNF- α , GM-CSF, IL-5, vermindert die Antigenpräsentation von Makrophagen	regulatorische T-Zellen, Makrophagen, aber auch Th0-, Th1- und Th2-Zellen	Verringerte Konzentrationen von IL-10 in Serum und Sputum von COPD-Patienten und gesunden Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Takanashi et al., 1999; Zhang et al., 2013); signifikant geringerer Anteil der IL-10-positiven Zellen im Sputum von COPD-Patienten und gesunden Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Takanashi et al., 1999); erhöhte Sekretion durch Alveolarmakrophagen von Zigarettenrauchern und COPD-		-

			Patienten (Lim et al., 2000)		
IL-8/MIP-2/KC	wirkt chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten, Induktion des respiratorischen Burst	Makrophagen, glatte Muskelzellen der Atemwege, Endothelzellen, Epithelzellen	erhöhte Expression <i>ex vivo</i> im bronchialen Epithelium von COPD-Patienten (de Boer et al., 2000), erhöhte Konzentrationen in induziertem Sputum von Patienten mit stabiler COPD (Keatings et al., 1996), erhöhte Sekretion durch Alveolarmakrophagen von Zigarettenrauchern und COPD-Patienten (Lim et al., 2000), erhöhte Konzentrationen in der BAL von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Kuschner et al., 1996)		erhöhte Konzentration von MIP-2 in der BAL von Mäusen, die 3 Tage rauchexponiert wurden (Thatcher et al., 2005); erhöhte Konzentrationen von KC in der BAL von Mäusen, die 4 Wochen Zigarettenrauch ausgesetzt wurden im Vergleich zu luftexponierten Mäusen (Kuipers et al., 2012); erhöhte Konzentration von KC nach akuter Rauchexposition für 4 Tage im Lungenhomogenisat im Vergleich zu luftexponierten Mäusen (van der Toorn et al., 2013)
MCP-1	wirkt chemotaktisch auf Monozyten	Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen und glatte Muskelzellen, vor allem jedoch Monozyten und Makrophagen		erhöhte Expression im bronchialen Epithel bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern (de Boer et al., 2000); Korrelation zwischen der Verschlechterung der Lungenfunktion mit der erhöhten Expression von MCP-1 im Atemwegsepithel (Fuke et al., 2004); erhöhte Konzentration in der BAL von chronischen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Kuschner et al., 1996)	-
MIP-1 α	chemotaktisch für Zellen der monozytären Linie und für Lymphozyten, NK-Zellen (natural killer cells) und für eosinophile Granulozyten; Induktion der Expression von ICAM-1, der Mastzellendegranulation und der Produktion von TNF- α , IL-1 und IL-6	vor allem Makrophagen, aber auch dendritische Zellen und Lymphozyten	erhöhte Expression im Atemwegsepithelium korrelierte mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion (Fuke et al., 2004); erhöhte Expression im Lungengewebe bei Rauchern mit verschlechterter Lungenfunktion und/oder Emphysem im Vergleich zu gesunden Rauchern oder Nichtrauchern (Fuke et al., 2004); erhöhte Expression in bronchialen Epithelzellen bei Patienten mit verschlechterter Lungenfunktion und/oder Emphysem im Vergleich zu gesunden Rauchern festgestellt werden (Fuke et al., 2004)		-
RANTES	wirkt chemotaktisch auf T-Zellen, Monozyten, eosinophile Granulozyten	CD8-positive T-Zellen, Endothelzellen und Lungeneithelzellen		Atemwegseosinophilie während Exazerbationen der COPD, die mit einer erhöhten RANTES-Expression von supereithelialen und epithelialen Atemwegszellen einherging (Zhu et al., 2001); erhöhte Spiegel im Serum von COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern nachweisen (Cao et al., 2012)	-
Proteasen					
MMP-9	Ermöglichen der Migration von Basalzellen nach Verwundung der Trachea; Degradierung von α 1-Antitrypsin; Erhöhung der chemotaktischen von CXCL8 durch Abtrennen eines Peptids	neutrophile Granulozyten, bei COPD-Patienten auch Alveolarmakrophagen	erhöhte Sputumkonzentrationen und/oder Sputumaktivität in Rauchern mit COPD im Vergleich zu gesunden Rauchern (Lowrey et al., 2008); Korrelation zwischen erhöhter MMP-9 Expression im Sputum von Patienten mit moderater und schwerer COPD und einem reduzierten FEV1-Wert nach Bronchodilator Gebrauch (Chaudhuri et al., 2012); signifikanter Anstieg der Sputumkonzentrationen Exazerbationen und Korrelation der Konzentrationen mit den Zahlen der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten (Mercer et al., 2005); es besteht keine Korrelation zwischen Makrophagen MMP-9 und dem Grad des Emphysems im benachbarten Gewebe (Atkinson et al., 2011)		Defizienz für MMP-9 schützt nicht vor rauchinduzierter Entzündung und Lungenschaden bei Mäusen (Atkinson et al., 2011)

MMP-12	Abbau der extrazellulären Matrix in physiologischen Prozessen, wie z.B. während der Embryonalentwicklung oder beim adulten Gewebsumbau	Alveolarmakrophagen	In Alveolarmakrophagen von Rauchern konnte eine stark erhöhte Expression von MMP-12 im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Nichtrauchern (Woodruff et al., 2005) und von Ex-Rauchern (Wallace et al., 2008) nachgewiesen werden. Eine erhöhte Zahlen von MMP-12-positiven Makrophagen in der BAL von Rauchern mit COPD im Vergleich zu Ex-Rauchern mit COPD oder gesunden Rauchern und Nichtrauchern (Babusyte et al., 2007); die Konzentration von MMP-12 im Sputum von COPD-Patienten im Stadium 0 war höher als im Sputum von Nichtrauchern und MMP-12 konnte in Alveolarmakrophagen der Patienten durch Immunhistochemie nachgewiesen werden (Ilumets et al., 2007); erhöhte Sputumkonzentrationen bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern, Ex-Rauchern und Nichtrauchern (Demedts et al., 2006); gegensätzlich dazu: keine erhöhten Konzentrationen oder mRNA-Spiegel im Sputum, <i>ex vivo</i> in kultivierten Alveolarmakrophagen und im Lungengewebe (Finlay et al., 1997;Imai et al., 2001;LaPan et al., 2010).	MMP-12-defiziente Mäuse wiesen nach 6 Monaten Zigarettenrauchexposition keine emphysemartigen Veränderungen der Lunge auf und hatten im Vergleich zu WT Mäusen keine erhöhten Makrophagenzahlen in den Lungen (Hautamaki et al., 1997); die Instillation der katalytischen Domäne des rekombinanten menschlichen MMP-12 in die Atemwege von Mäusen führte zu einer anfänglichen Neutrophilie in der BAL, die nach einiger Zeit zu einer Erhöhung der Makrophagenzahlen und der Konzentration einiger proinflammatorischer Zytokine und MMP-9 führte (Nenan et al., 2005)
neutrophile Elastase	Bekämpfung von phagozytierten und auch extrazellulären mikrobiellen Pathogenen; Degradierung von Matrixbestandteilen; potentielle Rolle bei der Chemotaxis und Migration durch Schneiden von Adhäsionsmolekülen an interzellulären junctions	neutrophile Granulozyten	erhöhte Konzentrationen in der BAL von COPD-Patienten (Korkmaz et al., 2010)	neutrophile Elastase-defiziente Mäuse zeigten nach chronischer Rauchexposition ein weniger stark ausgebildetes Emphysem (Shapiro et al., 2003)

2.7. Fragestellungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mechanistische Einblicke in die Pathogenese der COPD zu gewinnen. Hierfür sollten Mausmodelle der Zigarettenrauchexposition etabliert werden, die es ermöglichten, die Funktion zentraler Entzündungsmediatoren bei der Entstehung rauchinduzierter Lungenschäden zu untersuchen. In diesen Modellen sollte die Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in myeloiden Zellen und des Zytokins IL-17A bei der Entstehung des rauchinduzierten Emphysems untersucht werden. Desweiteren sollte der Einfluss der Rauchexposition auf die Kolonisierung und Infektionen der oberen Atemwege mit bakteriellen Pathogenen, die bei der Entstehung von Exazerbationen der COPD eine entscheidende Rolle spielen, untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, wie rauchinduzierte Entzündung bakterielle Infektionen der oberen Atemwege begünstigt und sich dies auf die Entzündung im gesamten Respirationstrakt auswirkt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Brain-Heart Infusion Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
cellWASH®	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Decalcification Solution Lite	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dako® Protein Block	
Dako® REAL™ Hematoxylin	
Dako® AEC Substrat	
Dako® Glycergel® Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
Diff Quik Staining Kit	Medion Diagnostics, Gräfelfing, Deutschland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G Lösung, wässrig, 05%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 99% vergällt mit 1% MEK	BCD Chemie GmbH, Friedrichsthal, Deutschland
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eukitt® quick hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd-Lösung, 37%	Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken, Deutschland
Fetal bovine serum	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Glycerin ROTIPURAN®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂ -Lösung 33%	VWR, Darmstadt, Deutschland
HCl 32%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol, 99% p.a.	Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken, Deutschland

Ketavet®	Pfizer, Berlin, Deutschland
LB-L Broth	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol, 99% zur Synthese	Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9% BC, isoton	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin Mixture	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Rompun 2%	Bayer, Langenfeld, Deutschland
RPMI Medium 1640 1x, mit L-Glutamin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
SensiMix™ SYBR® & Fluorescein Mastermix, 2x	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
TMB Solution	Calbiochem/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Todd Hewitt Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRizol® Reagent	ambion, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

- PBS

NaCl: 137 mM VWR, Darmstadt, Deutschland

KCl: 2,7 mM VWR, Darmstadt, Deutschland

Na₂HPO₄*2H₂O: 6,5 mM Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

KH₂PO₄: 1,5 mM Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

in H₂O bidest. lösen und den pH-Wert auf 7,2 bis 7,4 einstellen

- TBS

TRIS: 50 mM Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

NaCl: 150 mM VWR, Darmstadt, Deutschland

in H₂O bidest. lösen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen

- TBS-T

TBS-Puffer mit 0,1% Tween[®] 20

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

- Waschpuffer für ELISA

1 x PBS mit 0,05% Tween[®]20

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Zigarettenrauchexposition

Alle Maus-Experimente wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt. Die Mäuse wurden unter pathogen-freien Bedingungen in der Tierhaltung der Klinisch-Experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes bei 20 bis 22°C Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchte von 55% und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Mäuse wurden wöchentlich in frische Käfige gesetzt und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

3.2.1.1. Langzeitrauchexposition:

6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse wurden 3 oder 7 Monate lang in einer TE-10 Rauchmaschine (Teague Enterprises, Woodland, Kalifornien, USA) mit Rauch von 3R4F Zigaretten (College of Agriculture, Reference Cigarette Program, University of Kentucky, USA) für eine Gesamtdauer von 261 Minuten pro Tag und 5 Tage pro Woche rauchexponiert. Die Dauer der Rauchexposition betrug 87 Minuten pro Durchgang mit 3 Durchgängen pro Tag. Zwischen den Rauchdurchgängen wurde die Maschine 40 Minuten lang belüftet. Die total suspended particles (TSP)-Konzentration betrug im Durchschnitt 120 mg/m³. Die Konzentrationen an Kohlenstoffmonoxid in der Expositions-kammer wurden mithilfe eines Standard Data Logger (Lascar Electronics, Englands) gemessen. Die Konzentrationen während der Rauchexposition betragen zwischen 400 und 550 ppm. Folgende Mausstämme wurden chronischem Rauch ausgesetzt: C57BL6N (Charles River, Deutschland; Janvier Labs, Deutschland), LysMCre-p65-knockout (LysMcre-p65^{Δ/-}) (Algul et al., 2007a; Hess et al., 2010; Li et al., 2014a; Rupec et al., 2005), LysMCre-IkBa-knockout (LysMCre-IkBa^{Δ/-}) (Rupec et

al., 2005), LysMCre WT, IL-17A-knockout (IL-17A^{Δ/-}) (Nakae et al., 2002) und C57BL6J (Charles River, Deutschland; Janvier Labs, Deutschland).

3.2.1.2. Kurzzeitrauchexposition:

6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse wurden 3 Tage lang 5 mal am Tag in einer Plexiglas-Box Rauch von 3R4F Zigaretten Rauch ausgesetzt. Mithilfe von Ugo Basile Pumpen (7025 - Rodent Ventilator, Gemonia, Varese, Italien) wurden 200 ml/min Rauch und 1800 ml/min Frischluft generiert und in die Box geleitet. Die TSP-Konzentration betrug durchschnittlich 650 mg/m³. Eine Rauchexposition dauerte zwischen 25 und 30 Minuten und zwischen den Expositionen wurden die Mäuse für 1 bis 2 Stunden in ihre Käfige zurückgesetzt. Folgende Mausstämme wurden geraucht: C57BL6N, LysMCre-p65-knockout (LysMcre-p65^{Δ/-}), LysMCre-IkBa-knockout (LysMCre-IkBa^{Δ/-}), LysMCre WT, IL-17A-knockout (IL-17A^{Δ/-}) und C57BL6J.

3.2.2. Invasive Lungenfunktionsmessung

Nach Langzeitberauchung wurde mithilfe des FlexiVent Systems (Scireq Inc., Montreal, Kanada) bei den Mäusen eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Die Mäuse wurden mit 9,6 mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%) und 162 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet 100 mg/ml) intraperitoneal betäubt, die Trachea wurde präpariert und die Mäuse wurden mithilfe einer 18G Metall-Kanüle an die Maschine angeschlossen. Zur Bestimmung der respiratorischen Steifigkeit (elastance, *ers*), Dehnbarkeit (compliance, *crs*) und des respiratorischen Widerstands (resistance, *rrs*) wurde die Snapshot-Perturbation durchgeführt, die die Lunge als ein Kompartiment zeigt. Um zwischen Lungengewebe und Luftwegen unterscheiden zu können, wurde die QuickPrime3-Messung durchgeführt. Diese liefert die Werte für den Widerstand der Atemwege (Newtonian resistance, *Rn*), die Steifigkeit des Gewebes (tissue elastance, *H*) und den Widerstand des Gewebes (tissue damping, *G*). Mithilfe der PV(pressure-volume)-loop-Messung werden die totale Lungkapazität (Salazar-Knowles Parameter *A*) und die quasi-statische Steifigkeit (quasi-static elastance, *est*) und Dehnbarkeit (quasi-static compliance, *cst*) bestimmt. Von drei validen Messungen (COD-Wert über 0,95) wurde der Mittelwert

errechnet. Nach Einleitung einer tiefen Betäubung wurde eine Öffnung des Thorax und Tötung durch Ausbluten vorgenommen.

3.2.3. Einbettung der Lungen und stereologische Auswertung

3.2.3.1. Paraffin-Einbettung der Lungen, Entparaffinierung und HE-Färbung:

Nach der Lungenfunktionsmessung wurden die Lungen entnommen und durch eine Instillations-Fixierung mit 1 x PBS (phosphate buffered saline)-gepufferter 4% Formaldehyd-Lösung (Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Deutschland) 10 Minuten lang über einen konstanten Druck von 30 cmH₂O fixiert. Die Lungen wurden bis zur Weiterverarbeitung in 1 x PBS-gepufferter 4% Formaldehyd-Lösung aufbewahrt. Um die Lungen für eine stereologische Evaluation nutzen zu können, wurde eine Agarosegel-Immersion mit nachfolgender Paraffin-Einbettung durchgeführt. Dazu wurden die Lungen zuerst über Nacht bei 4°C und am nächsten Tag 3-mal bei RT für 1 Stunde in 10-fachem Volumen 1 x PBS gewaschen, wobei beim letzten Waschschrift zusätzlich für 10 Minuten bei 60°C im Brutschrank inkubiert wurde. Die Lungen wurden mit 10-fachem Volumen einer 1 x PBS/1% Agarosegel-Mischung über Nacht bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen bei RT wurden die Proben für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Lungen in 5 mm dicke Scheiben zugeschnitten und so in einem Vinyl-Schälchen angeordnet, dass sich keine Scheiben der gleichen Schnittfläche nebeneinander befanden. Die Proben wurden durch Übergießen mit 1 x PBS/1% Agarosegelfixiert. Nach Aushärten des Gels wurden die Proben in 1 x PBS-gepufferter 4% Formaldehyd-Lösung bei RT aufbewahrt. Die Paraffineinbettung erfolgte in einem Einbettautomaten (Leica TP 1020, Nußloch, Deutschland) nach folgendem Protokoll: (1) Inkubation bei 30°C in Wasser für 90 Minuten, (2) Inkubation bei 35°C in 70% Ethanol für 90 Minuten, (3) Inkubation bei 35°C in 80% Ethanol für 90 Minuten, (4) Inkubation bei 35°C in 90% Ethanol für 90 Minuten, (5) Inkubation bei 35°C in 100% Ethanol für 90 Minuten, (6) Inkubation bei 35°C in 100% Ethanol für 90 Minuten, (7) Inkubation bei 35°C in 100% Ethanol für 90 Minuten, (8) Inkubation bei 35°C in Xylol für 90 Minuten, (9) Inkubation bei 35°C in Xylol für 90 Minuten, (10) Inkubation bei 45°C in Xylol für 90 Minuten, (11) Inkubation bei 60°C in Paraffin für 90 Minuten, (12) Inkubation bei 60°C in Paraffin für 90 Minuten, (13) Inkubation bei 60°C in Paraffin für 90 Minuten. Die Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica SM2000R) in 2 µm dicke Scheiben geschnitten und

auf Objektträger aufgezogen. Die Entparaffinierung erfolgte nach folgendem Protokoll: (1) Inkubation in Xylol bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten, (2) Inkubation in Xylol bei RT für 10 Minuten, (3) Inkubation in Xylol bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten, (4) Inkubation in 100% Ethanol bei RT für 10 Minuten, (5) Inkubation in 100% Ethanol bei RT für 10 Minuten, (6) Inkubation in 100% Ethanol bei RT für 10 Minuten, (7) Inkubation in 70% Ethanol bei RT für 10 Minuten, (8) Inkubation in 70% Ethanol bei RT für 5 Minuten, (9) Inkubation in 50% Ethanol bei RT für 5 Minuten, (10) Inkubation in Wasser bei RT für 5 Minuten, (11) Inkubation in Wasser bei RT für 5 Minuten, (12) Inkubation in Citratpuffer pH 6,0 bei 95°C für 20 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und die HE-Färbung nach folgendem Protokoll durchgeführt: (1) Hämalun nach Mayer (Dako REAL Hematoxylin) 2 bis 5 Minuten, (2) Abspülen mit Wasser, (3) Differenzieren in 1% HCl, (4) Bläuen in Ammoniakwasser 10 Sekunden, (5) Abspülen mit Wasser, (6) 100 µl Eisessig zu 100 ml 0,5% wässriger Eosin-Lösung zugeben, 10 bis 15 Minuten inkubieren, (7) kurz mit Wasser abspülen, (8) 30 Sekunden in 50% Ethanol inkubieren, (9) 5 Minuten in 100% Ethanol inkubieren, (10) 5 Minuten in 100% Ethanol inkubieren, (11) 5 Minuten in 100% Isopropanol inkubieren, (12) 5 Minuten in Xylol inkubieren, (13) 5 Minuten in 100% Ethanol inkubieren, (14) mit Roti-Histokitt eindecken.

3.2.3.2. Stereologische Auswertung:

Die gefärbten Objektträger wurden mithilfe eines Mikroskops (Olympus BX51, Hamburg, Deutschland) und der Software Visiopharm Integrator System (VIS, Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) stereologisch ausgewertet. Dazu wurden zunächst Übersichtsbilder der Lungen (1,25-fache Vergrößerung) mithilfe des Microimager-Moduls der Software erstellt, in denen dann das Lungengewebe zur Analyse markiert wurde und Bereiche, die nicht analysiert werden sollten (z.B. Fremdgewebe, Artefakte), ausgeschlossen wurden. Im Folgenden wurden Detailbilder der Lungen in 2 Vergrößerungsstufen aufgenommen (10-fache und 20-fache Vergrößerung). Mithilfe der Software wurden in der 20-fachen Vergrößerung die Alveolen vermessen, indem in einem Raster aus Linien, das auf die zu analysierenden Lungenbereiche gelegt wurde, die Septen der Alveolen markiert wurden. Dadurch berechnete die Software den Wert mean chord length (MCL, Einheit: µm), welcher die mittlere freie Distanz innerhalb der distalen Lufträume anzeigt. Die beiden Werte Surface Area (S(a)) und Septendicke (τ_{aw}) wurden in der 10-fachen und 20-fachen Vergrößerung

ausgewertet. Dazu wurden zuerst in der 10-fachen Vergrößerung die Enden der Linien des Rasters als Alveolen oder nicht-Alveolen (Bronchien, Trachea, Blutgefäße) markiert. Anschließend wurden in der 20-fachen Vergrößerung die Enden der Linien des Rasters als Alveole oder Alveolarwand markiert. Die Auswertung der Parameter erfolgte mithilfe bereits veröffentlichter Methoden (Fehrenbach, 2006).

3.2.4. Kultivierung von Bakterien und Durchführung der Infektion

3.2.4.1. Infektion der oberen Atemwege der Maus

Zur Infektion der oberen Atemwege der Mäuse wurden folgende Bakterienstämme genutzt: *S. pneumoniae* (Sp) 6A (Nelson et al., 2007) und non-typeable *H. influenzae* (NTHi). Der Streptokokken-Stamm wurde mithilfe von Starterkulturen kultiviert. Dazu wurden 1 ml Aliquots einer mit 10% Glycerol versetzten Kultur der optischen Dichte (OD)₆₀₀ = 0,5 hergestellt und bei -80°C aufbewahrt. Eine Starterkultur wurden in 14 ml Todd-Hewitt-Broth Medium bei 37°C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht wurde. Die Kulturen wurden 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach einmaligem Waschen in 1 x PBS wurden die Bakterien in 400 bis 450 µl 1 x PBS aufgenommen und zur Infektion eingesetzt. Die Infektion der oberen Atemwege erfolgte ohne Betäubung der Mäuse mit 10 µl der Bakterienlösung (Nelson et al., 2007). Zur Bestimmung der colony forming units (cfu) wurden die Verdünnungsstufen 10⁴ (1:10000) bis 10⁸ (1:100000000) durch Ausplattieren von 10 µl auf Blutagarplatten (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) genutzt. Zur Kultivierung von NTHi wurden Bakterien aus einem NTHi-Glycerolstock (12% Glycerol) auf eine Kochblutagarplatte mit Isovitalex (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden so viele Bakterien in 7 ml 1 x PBS überführt, dass eine OD₆₀₀ von 1 entstand. Die Bakterien wurden für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend in 350 µl 1 x PBS aufgenommen und die Infektion sowie die cfu-Bestimmung, wie schon für die Streptokokken-Stämme beschrieben, auf Kochblutagarplatten durchgeführt.

3.2.4.2. Isolation und ex vivo Infektion von murinen Makrophagen

Um Alveolar-Makrophagen aus der Lunge zu gewinnen, wurde die Lunge 10-mal mit jeweils 1 ml 0,5mM EDTA in 1 x PBS gespült. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 1300 rpm und 4°C wurden die Zellen in 1 ml RPMI-Medium mit 10% Fetal Bovine Serum und 1% Penicillin/Streptomycin Mixture aufgenommen und innerhalb einer Gruppe vereinigt. In einer 48-well Platte wurden 100000 Zellen/well ausgesät. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und in 1 ml Medium über Nacht 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Medium ohne Antibiotika kultiviert, um die nachfolgende Infektion nicht zu beeinflussen. Zur *ex vivo* Infektion der murinen Makrophagen wurden *S. pneumoniae* 6A und NTHi genutzt. Zur Kultivierung von NTHi wurden Bakterien aus einem NTHi-Glycerolstock (12% Glycerol) auf eine Kochblutagarplatte mit Isovitalax ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden so viele Bakterien in 5 ml 1 x PBS überführt, dass eine OD₆₀₀ von 0,5 entstand. Die Bakterien wurden 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt zur Infektion eingesetzt. Der Stamm 6A wurde wie oben beschrieben mithilfe einer Starterkultur angezogen, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach einmaligem Waschen in 1 x PBS wurden die Bakterien in ca. 5 ml 1 x PBS aufgenommen, um eine OD₆₀₀ von 0,5 zu erreichen. Die Bakterien wurden 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt zur Infektion eingesetzt.

3.2.5. Verneblung mit NTHi-Lysat

NTHi Bakterien wurden aus dem bei -80°C gelagerten Glycerolstock auf Kochblutagarplatten mit Isovitalax ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit jeweils einer Einzelkolonie wurden zwei 50 ml Kulturen mit Brain Heart Infusion Broth versetzt mit 3,5 µg/ml NAD und 2% Fildes enrichment (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am dritten Tag wurden mit den Kulturen zwei 400 ml Starterkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen in 50 ml Aliquots 15 Minuten lang bei 2,5 x G und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Kultur in 2 ml 1 x PBS resuspendiert. Die Bakterien wurden 45 Minuten lang im Wasserbad bei 70°C hitzeinaktiviert. Das Lysieren erfolgte durch

dreimaligen Ultraschall für 30 Sekunden. Der Proteingehalt wurde mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt und durch Verdünnen mit 1 x PBS auf 2,5 mg/ml eingestellt. Die Lysate wurden in 7 ml Aliquots bei -20°C eingefroren. Die Verneblung erfolgte mit 7 ml Lysat und dauerte 40 Minuten.

3.2.6. Blutentnahme, Lavage der Lunge und der oberen Atemwege, Präparation der Zytospins, Zellzahlbestimmung und Phagozytostest

3.2.6.1. Blutentnahme und Lavage

Nach Infektion wurde bei den Mäusen nach Einleitung einer tiefen Betäubung und Öffnen des Thorax die Tötung durch Ausbluten vorgenommen. Blut wurde mithilfe einer 1 ml Spritze (Injekt-F, B.Braun, Melsungen, Deutschland) und einer 24G Nadel (BD-Microlance 3, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) nach Eröffnung des Brustkorbs aus dem Herzen entnommen und auf Eis gelagert. Die Trachea wurde kannuliert (18G Vasofix Braunüle, B.Braun, Melsungen, Deutschland) und die Lunge wurde dreimal mit 1 ml 1 x PBS mithilfe einer 1 ml Spritze gespült (BAL). Anschließend wurden die oberen Atemwege mit 300 µl 1 x PBS gespült. Zur cfu-Bestimmung wurden sowohl die Lavage der oberen als auch der unteren Atemwege auf geeigneten Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dazu wurden zweimal 10 µl der unverdünnten Flüssigkeit sowie der Verdünnungen 1:100 und 1:100 genutzt. Die Spülflüssigkeiten wurden anschließend für 10 Minuten lang bei 0,3 x G und 4°C zentrifugiert. Der Überstand der BAL wurde aliquotiert bei -80°C eingefroren und die Zellen im gleichen Volumen des Überstandes in 1 x PBS aufgenommen. Der Überstand der Lavage der oberen Atemwege wurde bei -80°C eingefroren und die Zellen in 200 µl 1 x PBS aufgenommen. Das Blut wurde für 20 Minuten bei 2,5 x G und 4°C zentrifugiert und das erhaltene Serum anschließend bei -80°C eingefroren. Die Lunge wurde entweder direkt bei -80°C eingefroren oder zur cfu-Bestimmung in 1 ml 1 x PBS 30 Sekunden lang mithilfe eines Ultra Turrax T18 basic (Ika Works Inc., Wilmington, USA) homogenisiert. Das Homogenisat wurde wie oben beschrieben ausplattiert. Zur Zytokin-Bestimmung wurde das Homogenisat 20 Minuten lang bei 2,5 x G und 4°C zentrifugiert und der Überstand zur Messung verwendet.

3.2.6.2. Präparation der Zytospins

Die Zellen der Lavage der oberen Atemwege wurden unverdünnt und die Zellen der BAL unverdünnt oder 1:4 verdünnt für die Zytospins eingesetzt. Dazu wurden 200 µl der Zellsuspension bei 1300 rpm 5 Minuten lang in einer Cytozentrifuge (Cellspin II, Tharmac, Waldsolms, Deutschland) auf Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend 7 Minuten lang in eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Zur Färbung der Zellen wurde das Diff Quik Staining Set (Medion Diagnostics, Gräfelfing, Deutschland) genutzt. Das Zytoplasma (Diff Quik Stain I) wurde 5 Minuten lang und die Kerne (Diff Quik Stain II) 1 Minute lang gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger in Wasser gewaschen. Die Präparate wurden mit Eindeckmedium haltbar gemacht (Eukitt quick-hardening mounting medium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

3.2.6.3. Gesamtleukozytenzellzahl und Differenzialzellbild

Zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl der BAL und der Lavage der oberen Atemwege wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Es wurden 2 große Zählkreuze ausgezählt und der Mittelwert gebildet, sofern die Abweichung $\leq 15\%$ betrug, ansonsten wurde erneut ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahlen erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Mittelwert der ausgezählten Zellen}}{0,9 \mu\text{l}} * 1000 = \text{Leukozytenzahl/ml.}$$

Das Differenzialzellbild wurde mithilfe der Zytospin-Präparate bestimmt. Es wurden 100 bis 200 Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica ICC50, Nußloch, Deutschland) in Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten unterteilt, ausgezählt. Es wurde eine prozentuale Auswertung der einzelnen Zelltypen gemacht, die dann, mit der Gesamtzellzahl verrechnet, die absoluten Zellzahlen des Differenzialzellbildes ergaben.

3.2.6.4. Phagozytostest

Die Phagozytose-Aktivität von Monozyten und Granulozyten aus Vollblut von Mäusen, die 3 Monate Zigarettenrauch exponiert wurden, und von Kontrollmäusen wurde mithilfe des Phagotest Assays (Phagotest, Orpegen Pharma, Germany) im Zytometer bestimmt (FACS Calibur, Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany). Der Assay wurde nach Herstellerangaben

durchgeführt. Die Gates (forward/side scatter) wurden auf Granulozyten und Monozyten gesetzt. Um die Phagozytose-Aktivität zu bestimmen, wurde in jeder Probe die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) laut Herstellerangaben berechnet.

3.2.7. Zytokin-Messung

Zur Charakterisierung der Entzündung wurden verschiedene Zytokine in der BAL, im Lungenhomogenisat, in der Lavage der oberen Atemwege, im Zellkulturüberstand und im Serum gemessen.

3.2.7.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mithilfe eines Sandwich-ELISAs (DuoSet ELISA Development System, R&D Systems, Minneapolis, USA) wurden folgende Zytokine in der BAL-Flüssigkeit, im Lungenhomogenisat, im Serum und im Zellkulturüberstand gemessen: MMP9, IL-1 β , KC, MIP-2 und IL-17A. Zur Messung wurden 96-well Mikrotiter-Platten (Brand, Wertheim, Deutschland) verwendet. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB Solution, Calbiochem/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurde die Absorption mithilfe eines Multiplate Reader (ULTRA 384, Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

3.2.7.2. Cytometric Bead Array (CBA)

Zur Messung von Zytokinen in der Lavage der oberen Atemwege, der Lunge und des Serums wurde ein CBA (CBA Flex Set mit CBA Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) benutzt. Mithilfe eines CBAs kann in einem Ansatz die Konzentration mehrerer Zytokine in einer Probe bestimmt werden. Dazu werden fluoreszenzmarkierte und mit Antikörpern beschichtete Beads verwendet, die lösliche Analyte detektieren. Die Beads können über ihre unterschiedliche Fluoreszenz eindeutig im Zytometer identifiziert werden. Der Assay wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zur Zytokin-Messung wurde ein Durchflusszytometer verwendet (BD FACSCantoII, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Folgende Zytokine wurden mittels CBA gemessen: RANTES, MIP-1 α , KC, IL-1 α , G-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10 und MCP-1.

3.2.8. Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Mauslunge

3.2.8.1. Herstellung einer Einzelzellsuspension der Mauslunge

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Herz mit 25 ml 1 x PBS durch eine der Herzkammern gespült, während die andere Kammer angeschnitten wurde. Dadurch wurde die Lunge blutfrei gespült. Eine der Lungenhälften wurde zur Lungen-Dissoziation eingesetzt. Dazu wurde das Lung Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Herstellerangaben benutzt. Die Lungenzellen wurden in 7,5 ml Puffer (cellWASH, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen, um für weitere Färbungen eine Zellzahl von ca. $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ zu erhalten.

3.2.8.2. Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Durchflusszytometer

Für die Färbung wurden 100 μl /Probe der Einzelzellsuspensionen und für die Kompensation und die Kontrolle 100 μl vereinigt aus allen Proben einer Behandlung und eines Genotyps eingesetzt. Alle Proben wurden nach Anleitung des Herstellers mit Fc Block (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Folgende Antikörper wurden anschließend zur Färbung in einem Gesamtvolumen von 10 μl /Probe mit Puffer versetzt zugegeben: PerCP-CD45.2 (2,5 μl /Probe, Bio Legend, San Diego, USA), APC-Cy7-CD3 (0,9375 μl /Probe, Bio Legend, San Diego, USA), Pacific Blue-TCR β (0,75 μl /Probe, Bio Legend, San Diego, USA) und PE-TCR $\gamma\delta$ (1,25 μl /Probe, Bio Legend, San Diego, USA). In die einzelnen Kompensationsproben wurde jeweils ein Antikörper mit Puffer aufgefüllt auf 10 μl zugegeben. Alle Proben wurden 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml Puffer gewaschen, dazu wurde 10 Minuten bei 350 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 μl Puffer resuspendiert und durch einen 40 μm cell strainer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) vereinzelt. Zur Messung wurden die Bedienung des Durchflusszytometers und die Kompensation nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde der Anteil der $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ -T-Zellen in CD3-positiven (Gesamt-T-Zellen) und in CD45.2-positiven (Leukozyten) Zellen ermittelt.

3.2.9. RNA-Isolation

Die RNA wurde aus der Mauslunge mithilfe des TRIzol Reagenz isoliert. Dazu wurde eine Hälfte der Lunge eingesetzt. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (rDNase, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die RNA aus Einzelzellen der Lavage wurde mithilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Alle Protokolle wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolation aus den oberen Atemwegen der Mäuse wurden zuerst die Immunzellen durch Spülen mit 300 µl 1 x PBS aus den oberen Atemwegen entfernt. Anschließend wurde mit 300 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 1% 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gespült und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

3.2.10. cDNA-Synthese, Primer-Design und qRT-PCR

Zur cDNA-Synthese wurde 1 µg isolierte Gesamt-RNA mithilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Bei der RNA aus Einzelzellen wurde die Konzentration der einzusetzenden RNA an die Probe mit der geringsten RNA-Konzentration angeglichen. Die cDNA wurde 1:10 mit Wasser verdünnt bei -80°C eingefroren. Passende Primer für die qRT-PCR wurden mithilfe der Primer3 (v. 0.4.0) Software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) generiert. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Primer (Metabion, Martinsried, Deutschland) wurden für die qRT-PCR benutzt:

Tabelle 2: Namen und Sequenzen der in der qRT-PCR gebrauchten Primer

Name	Forward	Reverse
mouse β -Actin	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3'	5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'
mouse MIP-2	5'-AAG TTT GCC TTG ACC CTG AA-3'	5'-AGG CAC ATC AGG TAC GAT CC-3'
mouse Lysozyme M	5'-CTG GCT ACT ATG GAG TCA GC-3'	5'-TTG ATC CCA CAG GCA TTC AC-3'
mouse Elastin	5'-CAC CTG GAA GAC CAA CAC CT-3'	5'-TCT GGG CTC CAG AAG ACA GT-3'
mouse Collagen III	5'-CCA CTG AAG CTC TGT GGT GA-3'	5'-CCC GAA GCT TTA GTG TCT GC-3'
mouse β -Defensin 1	5'-GGC TGC CAC CAC TAT GAA AAC TC-3'	5'-GAG ACA GAA TCC TCC ATG TTG AA-3'

Die qRT-PCR wurde mithilfe des SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 12,5 µl 2x SensiMix SYBR & Fluorescein mit 7,3 µl Wasser vermischen, jeweils 0,1 µl forward und reverse primer und zuletzt 5 µl template cDNA zugeben. Die PCR wurde in einem CFX96 Real-Time System Gerät (Bio Rad, München, Deutschland) durchgeführt und die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: (1) Polymerase Aktivierung bei 95°C für 10 Minuten, (2) Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, (3) Annealing bei 60°C für 30 Sekunden, (4) Platerread, (5) Wiederholung ab (2) 40x, (6) Start-Temperatur 65°C für 30 Sekunden, (7) Schmelzkurve 65 + 0,5°C/cycle für jeweils 5 Sekunden, (8) Platerread, (9) Wiederholung ab (7) 60x, (10) Endtemperatur 5°C.

3.2.11. Elastingehalt-Bestimmung in der Mauslunge

Um den Elastingehalt der Mauslunge zu bestimmen, wurde das Fastin Elastin Assay Kit (F2000, biocolor, London, UK) benutzt. Die Lungen wurden wie oben beschrieben in 1 ml 1 x PBS homogenisiert. 75 µl der Homogenisats wurden mit 750 µl 0,25 M Oxalsäure versetzt und 1 Stunde bei 100°C im Heizblock gekocht. Nach 10 Minuten bei RT wurde 10 Minuten lang bei 10000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand mit dem extrahierten Elastin abgenommen, das Volumen des Überstandes wurde notiert. Die Extraktion wurde einmal wiederholt und die Extrakte wurden gepoolt. Zum Fällern des Elastins wurden 75 µl des Extrakts mit 75 µl des gekühlten Precipitating Reagent versetzt und 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 11000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und der Rest Flüssigkeit durch Ausklopfen entfernt. Zur Standardbestimmung wurden 12,5 µl, 25 µl, 50 µl und 75 µl des Standards in Doppelbestimmung vorbereitet, als Blank dienten 75 µl 0,25 M Oxalsäure. Zu allen Proben und den Standards wurde 1 ml Dye Reagent (4°C) zugegeben, gevortext und 90 Minuten lang auf einem Schüttler bei RT gemischt. Nach Zentrifugation bei 11000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und der Rest der Flüssigkeit durch Ausklopfen entfernt. Es wurden 250 µl Dye Dissociation Reagent zugegeben, gevortext und nach Inkubation bei RT für 10 Minuten erneut gevortext. Anschließend wurde die Absorption bei 513 nm in einem Photometer gemessen. Um den Elastingehalt auf das Lungentrockengewicht normieren zu können, wurden 300 µl des Homogenisats in einer Vakuum-Zentrifuge 3 Stunden lang bei 65°C getrocknet und anschließend das Gewicht bestimmt.

3.2.12. Messung der MMP12- und Elastaseaktivität im Lungenhomogenisat

MMP12-Aktivität wurde im Lungenhomogenisat mithilfe des Sensolyte 520 MMP12 assay Kits (Anaspec, USA) nach Herstellerangaben gemessen. Neutrophile Elastase wurde im Lungenhomogenisat mit dem EnzChek® Elastase Assay Kit (Molecular Probes, Deutschland) nach Herstellerangaben gemessen.

3.2.13. Statistische Analyse

Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels T-Tests (zweiseitig) oder, falls nicht normalverteilt, mittels Mann-Whitney-Test analysiert. Ergebnisse für $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Alle Ergebnisse wurden mit der Software Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) analysiert. Angaben zur Statistik befinden sich in den Legenden zu den Abbildungen.

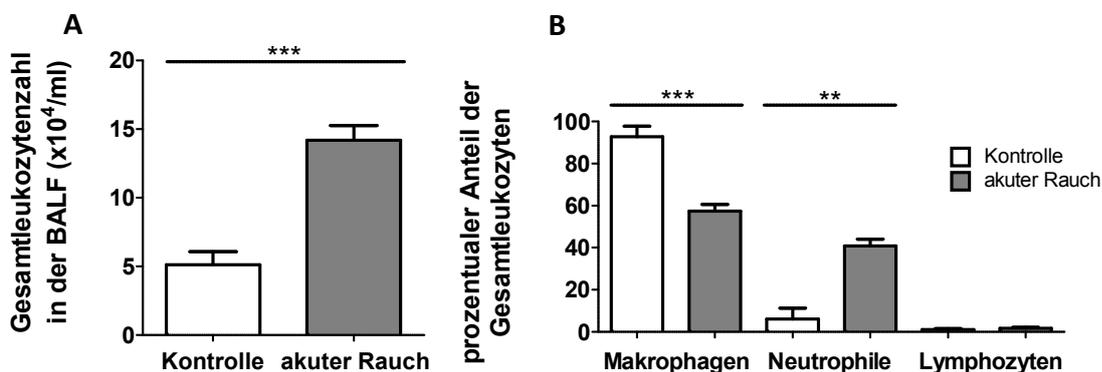
4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der zigarettenrauchinduzierten Entzündung im Mausmodell

Raucher und Passivraucher haben ein erhöhtes Risiko für Infektionserkrankungen (Arcavi and Benowitz, 2004; Huttunen et al., 2011). Zudem erkrankt ein Teil der Raucher an COPD (Rabe et al., 2007). Infektionen spielen bei der Pathogenese und dem Verlauf der COPD eine bedeutende Rolle (Sethi and Murphy, 2008). In dieser Arbeit wurden zunächst zwei Mausmodelle etabliert, die es erlauben, die Auswirkung von Zigarettenrauch auf die Immunantwort der Lunge und die Funktion zentraler Entzündungsmediatoren bei der Entstehung rauchinduzierter Lungenschäden zu untersuchen.

4.1.1. Akutes Rauchmodell

Bei der akuten Rauchexposition wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse 3 Tage in Folge akutem Zigarettenrauch ausgesetzt und 24 Stunden nach der letzten Rauchexposition analysiert. Durch die Rauchexposition strömten Leukozyten in die Lunge ein (Abb. 3 A). Nach akuter Rauchexposition bestand die Zellzusammensetzung der BALF zu ca. 40% aus neutrophilen Granulozyten und zu ca. 60% aus Alveolarmakrophagen (Abb. 3 B). Die Abbildungen 3 C bis E zeigen, dass akute Rauchexposition zu einer erhöhten absoluten Zahl an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF führte.



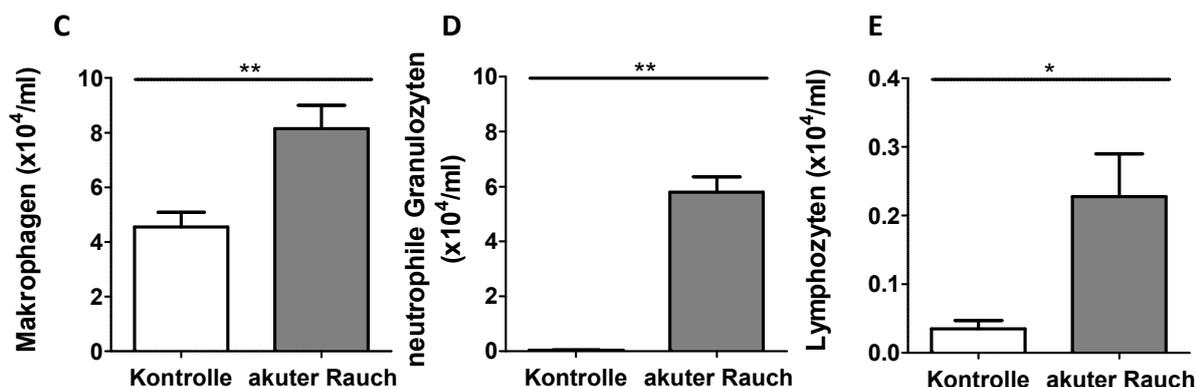


Abbildung 3: Leukozyten in der BALF nach akuter Rauchexposition. Nach 3 Tagen akuter Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozyten in der BALF. B) Prozentualer Anteil von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl. C) bis E) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle n=6, Rauch n=10), mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Nach akuter Rauchexposition stieg die Konzentration von KC sowohl in der BALF als auch im Serum an (Abb. 4 A und B). Die Konzentration von MIP-2 stieg nach Rauchexposition ebenfalls in der BALF an (Abb. 4 C). Die akute Rauchexposition führte bei den Mäusen also sowohl systemisch als auch in der Lunge zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.

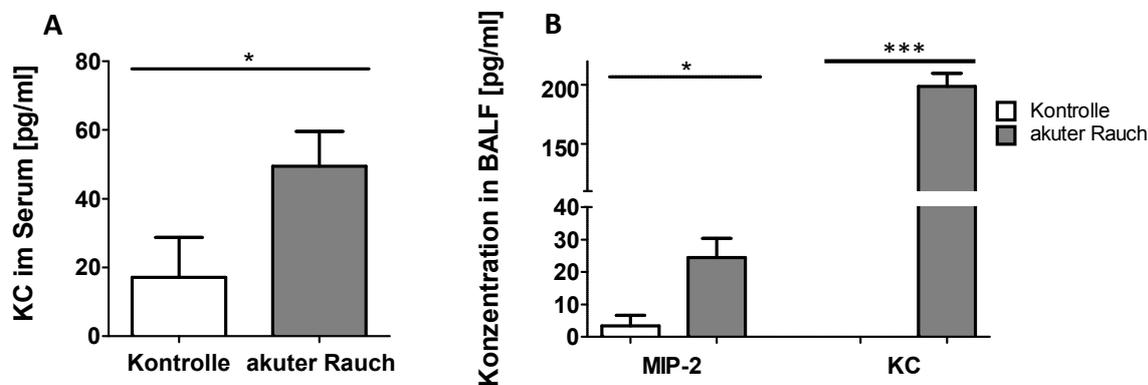


Abbildung 4: Konzentration des Chemokins KC und des proinflammatorischen Zytokins MIP-2 nach akuter Rauchexposition. Nach 3 Tagen Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Serum und BALF der Mäuse gewonnen und mittels ELISA die Konzentration an KC und MIP-2 bestimmt. A) KC-Konzentration im Serum (Kontrolle n=6, Rauch n=8). B) KC-Konzentration in der BALF (Kontrolle n=7, Rauch n=9). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05, ***p<0,001).

4.1.2. Chronisches Rauchmodell

Um ein Modell zu entwickeln, in dem es durch Zigarettenrauchexposition zu einem Lungenschaden kommt, welcher einem menschlichen Emphysem ähnelt (erhöhte

Lungenkapazität, Zerstörung von Gewebe, Vergrößerung der Alveolen und Verlust an Lungenfunktion), wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse (C57BL/6N) 5 Tage pro Woche 7 Monate lang Zigarettenrauch ausgesetzt. Nach 7 Monaten Rauchexposition befanden sich in der BALF erhöhte Zellzahlen (Abb. 5 A). Diese Zellen waren zum größten Teil Makrophagen (Abb. 5 B). Abbildung 3 C zeigt deutlich, dass durch chronische Rauchexposition Monozyten in die Lunge rekrutiert werden. Die Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten änderten sich durch chronische Rauchexposition nicht (Abb. 5 D und E).

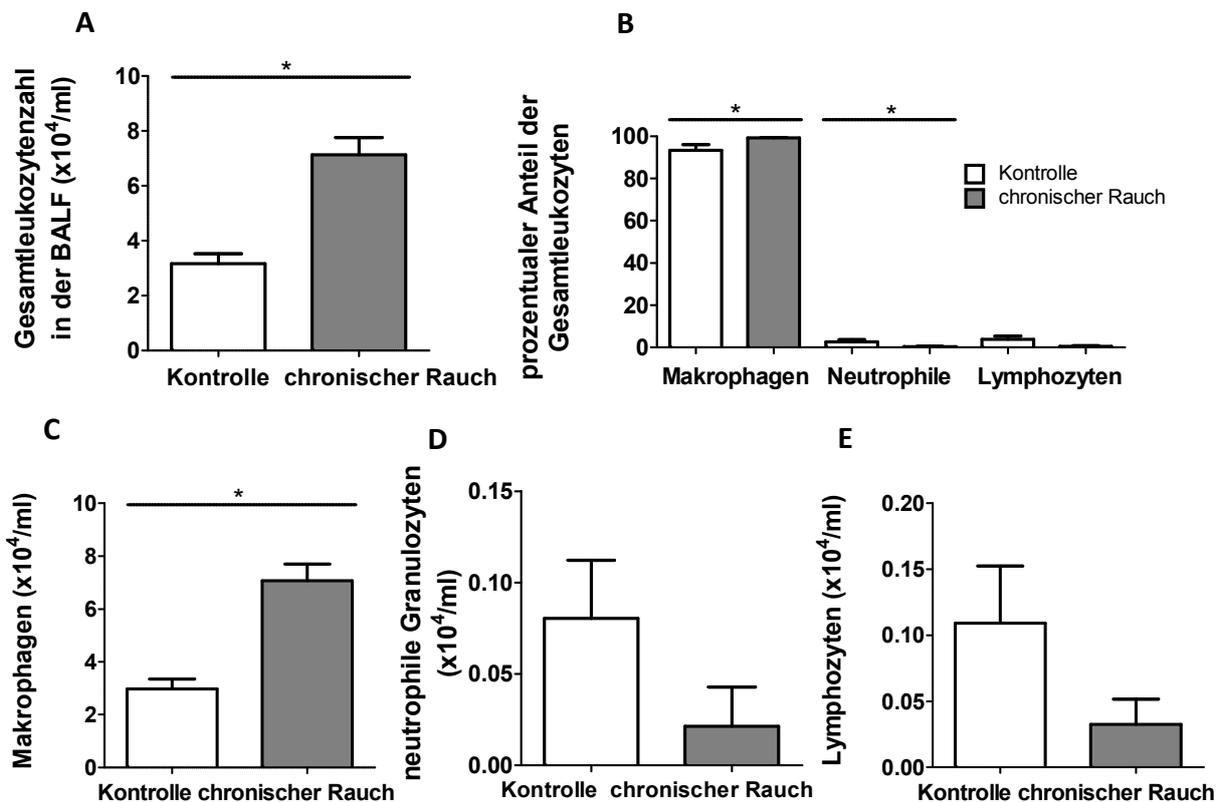


Abbildung 5: Leukozyten in der BALF nach chronischer Rauchexposition. Nach 7 Monaten chronischer Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozyten in der BALF. B) Prozentualer Anteil von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl C) bis E) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle n=5, Rauch n=4), mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

Um die Entzündung der Lunge nach chronischer Rauchexposition weiter zu charakterisieren, wurde zum einen IL-1 β in der BALF und zum anderen KC im Lungenhomogenisat mittels ELISA gemessen. Sowohl bei KC in der Lunge als auch bei IL-1 β in der BALF gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Nach chronischer Rauchexposition wurde eine invasive Lungenfunktionsmessung mithilfe des FlexiVent-Geräts durchgeführt, um den Lungenschaden beurteilen zu können. Dabei wurden Beatmungsmanöver durchgeführt, die es erlauben, unterschiedliche Messparameter wie totale Lungenkapazität, Widerstand oder compliance zu bestimmen. Im snapshot-Manöver wird die Lunge als ein Kompartiment angesehen, die Messung erfolgt mit einer Frequenz. Im QuickPrime 3-Manöver wird zwischen Gewebe und Atemwegen unterschieden. Die Lunge wird als aus mehreren Kompartimenten bestehend angesehen. Die Messung erfolgt daher mit unterschiedlichen Frequenzen. Im P-V-Loop-Manöver wird der Druck bis zur totalen Lungenkapazität schrittweise erhöht. Die Lungenfunktionsmessung zeigte, dass chronische Rauchexposition zu einem Lungenschaden führte. Die totale Lungenkapazität erhöhte sich durch die Rauchexposition (Abb. 6 A), ebenso wie die quasi-statische compliance (Abb. 4 B).

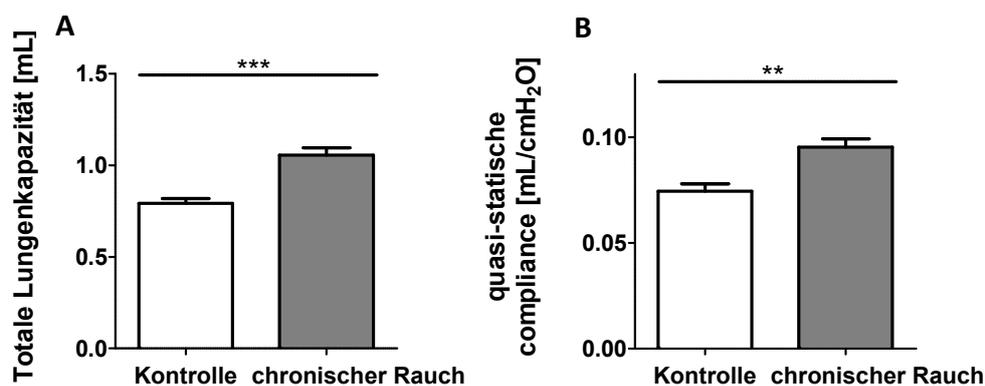


Abbildung 6: Lungenfunktionsmessung der Mäuse nach chronischem Rauch: Totale Lungenkapazität und quasi-statische compliance. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Rauchexposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) Totale Lungenkapazität gemessen mithilfe der Pressure-Volume Loop (P-V Loop)-Messung. B) Quasi-statische compliance gemessen mithilfe der P-V Loop-Messung. (Kontrolle n=8, Rauch n=6). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die Lungenfunktionsmessung zeigte mithilfe des QuickPrime3-Manövers, dass die elastance des Gewebes nach chronischer Rauchexposition abnahm (Abb. 7 A). Die compliance des gesamten respiratorischen Systems (gemessen mithilfe des snapshot-Manövers) zeigte eine Tendenz, dass die Rauchexposition zu einer erhöhten Dehnbarkeit führte (Abb. 7 B).

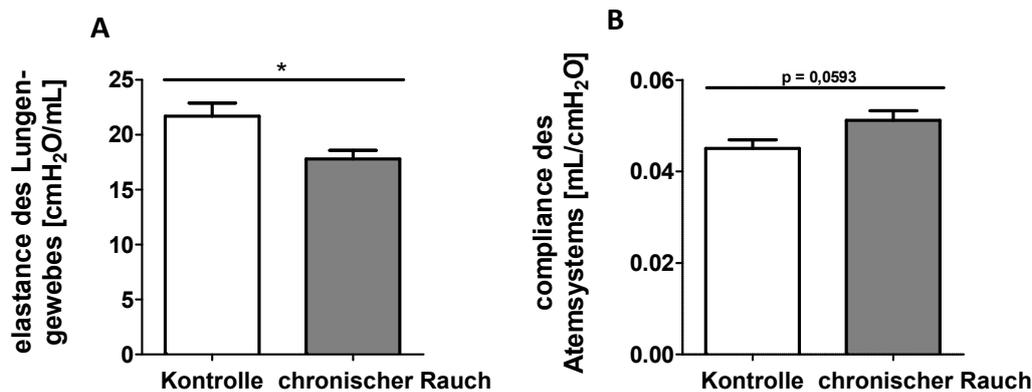


Abbildung 7: Lungenfunktionsmessung der Mäuse nach chronischem Rauch: elastance des Lungengewebes und compliance des gesamten Atemsystems. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) elastance des Lungengewebes gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung, die zwischen Gewebe und Atemwegen unterscheidet. B) compliance des gesamten respiratorischen Systems gemessen mithilfe der Snapshot Messung (Kontrolle n=8, Rauch n=6). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

Bei weiteren Messungen mithilfe des FlexiVents wurden verschiedene Widerstände gemessen. Bei allen Messungen zeigte sich kein Unterschied nach Rauchexposition (Abb. 8 A bis C). Dies deutet darauf hin, dass es zu keiner obstruktiven Veränderung der Lunge kam.

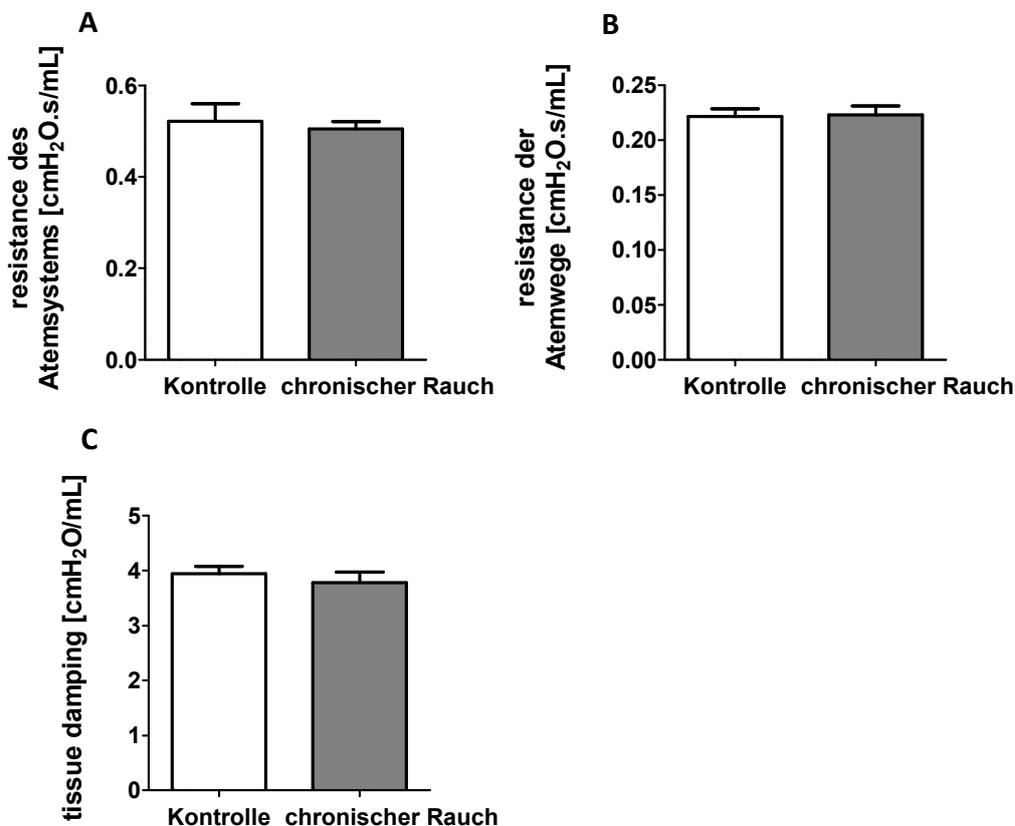


Abbildung 8: Lungenfunktionsmessung der Mäuse nach chronischem Rauch: Widerstand des Atemsystems, der Atemwege und des Gewebes. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) Widerstand des gesamten respiratorischen Systems gemessen mithilfe der Snapshot-Messung. B) Widerstand der Atemwege gemessen mithilfe der

Quick-Prime 3 Messung. C) Widerstand des Lungengewebes gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung (Kontrolle n=8, Rauch n=6). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM.

Um den entstandenen Lungenschaden mittels Histologie und Morphometrie zu evaluieren, wurden die Lungen nach Empfehlungen der American Thoracic Society präpariert (Hsia et al., 2010). Nach HE-Färbung wurde eine stereologische Auswertung vorgenommen. Der in Abbildung 9 A dargestellte mean chord length (MCL)-Parameter beschreibt die mittlere freie Distanz innerhalb der distalen Lufträume und war nach Rauchexposition erhöht. Im Gegensatz dazu verringerte sich die mittlere Dicke der Alveolenwand nach chronischer Rauchexposition (Abb. 9 B). Der Anteil der Alveolen am Gesamtparenchym verringerte sich durch Rauch (Abb. 9 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass alveoläre Strukturen durch das Rauchen zerstört wurden.

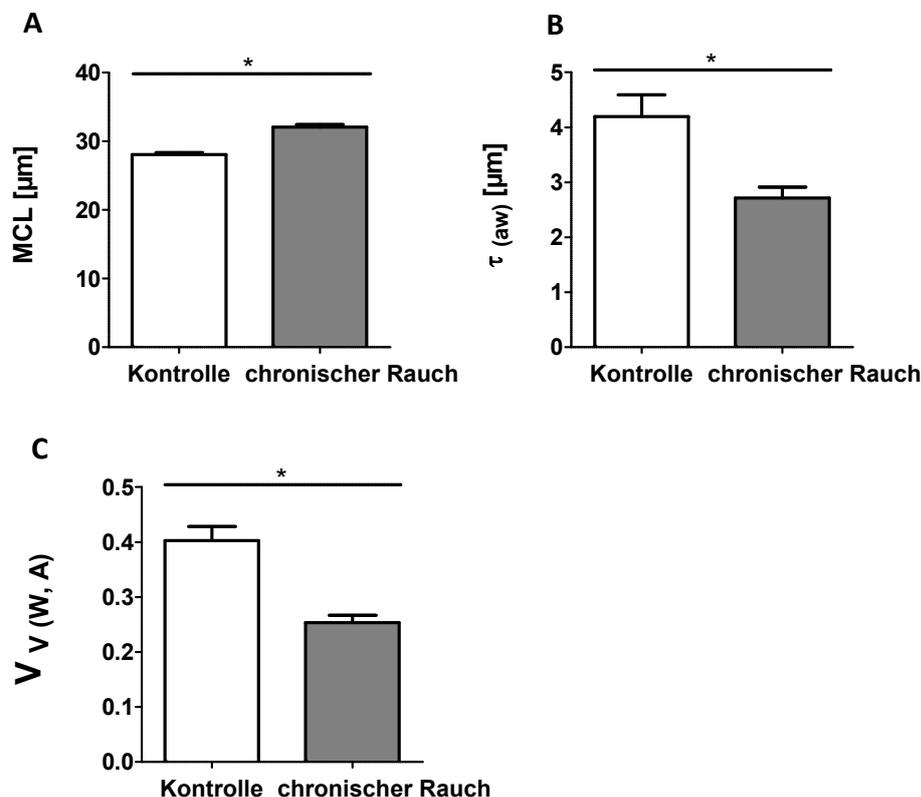


Abbildung 9: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse in Paraffin eingebettet und Schnitte auf Objektträger mittels HE-Färbung ausgewertet. A) Messung des mean chord length (MCL), der mittleren freien Distanz innerhalb der Lufträume. B) Messung der mittleren Dicke der Alveolarwand ($\tau_{(aw)}$). C) Verhältnis von Alveolen zum Gesamtparenchym ($V_V(W, A)$). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

Der durch Rauchexposition induzierte Lungenschaden war auch in der Histologie sichtbar (Abb. 10). Durch chronische Rauchexposition vergrößerten sich die Alveolen und Lungenstrukturen wurden zerstört.

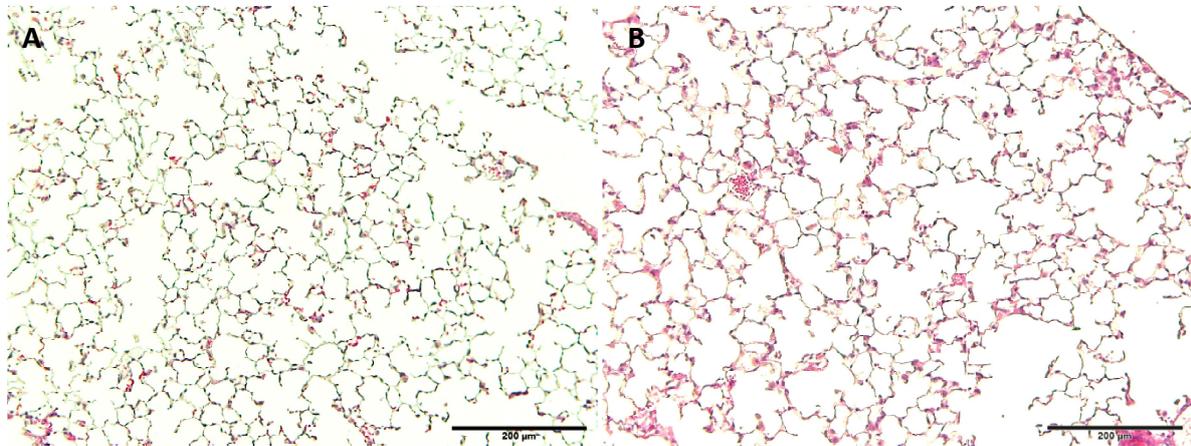


Abbildung 10: Histologie der Lungen nach 7 Monaten Rauch- bzw. Raumluftexposition. Die Lungen der Mäuse wurden nach 7 Monaten Rauch- bzw. Raumluftexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition in Paraffin eingebettet und in Schnitten auf Objektträger gebracht. Nach HE-Färbung der Schnitte wurde der Lungenschaden lichtmikroskopisch evaluiert. A) 7 Monate Raumluftexposition. B) 7 Monate Rauchexposition. Scale Bar: 200 μ m.

Durch die chronische Rauchexposition verloren die Mäuse an Gewicht (Daten nicht gezeigt; Kontrolle: 31,25 g \pm 5,121 g; Rauch: 24,30 g \pm 1,861 g).

Das chronische Rauchmodell weist einen engen klinischen Bezug auf. Es zeigt die Charakteristika der COPD wie z.B. Emphysem, Vergrößerung der Alveolen, Erhöhung der totalen Lungenskapazität und der compliance und verstärkte Entzündung in Bezug auf erhöhte Zellzahlen in der BALF. Mithilfe dieses Modells können die Entstehung des rauch-induzierten Lungenschadens untersucht und mögliche Mediatoren, wie z.B. Zytokine, identifiziert werden. Im Gegensatz zur akuten Rauchexposition, die eine sehr starke Entzündung auslöst, spiegelt das chronische Rauchmodell das menschliche chronische Rauchen über viele Jahre hinweg wider und ist deshalb auch für die Untersuchung von Infektionen, wie sie typischerweise bei Rauchern und COPD-Patienten gehäuft vorkommen, geeignet.

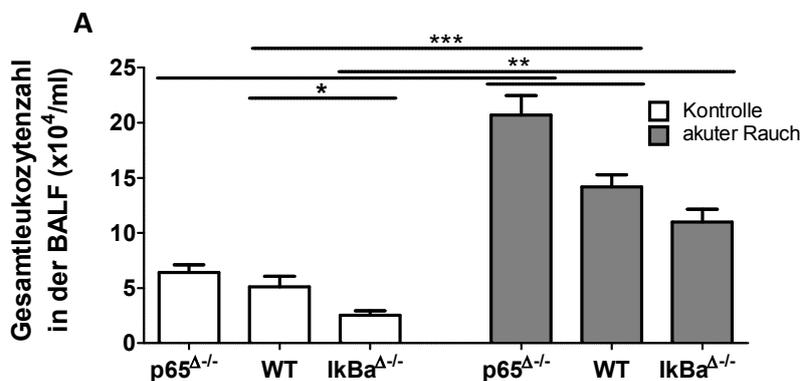
4.2. Funktion von NF- κ B und IL-17A beim rauchinduzierten Lungenschaden

NF- κ B ist ein zentraler Transkriptionsfaktor. NF- κ B reguliert die Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren wie Chemokine und proinflammatorische Zytokine, die möglicherweise bei der rauchinduzierten Entzündung und der Pathogenese der COPD eine Rolle spielen. Das Zytokin IL-17A, das von Immunzellen gebildet wird und über NF- κ B Entzündung vermittelt, ist in diesem Zusammenhang interessant. IL-17A-positive Immunzellen wurden vermehrt in der bronchialen Mukosa und im Sputum von COPD Patienten nachgewiesen (Chang et al., 2011; Di et al., 2009; Doe et al., 2010). IL-17A und NF- κ B wurden in den beiden Rauchmodellen untersucht, indem entsprechende Knockout-Mäuse sowohl akut als auch chronisch Rauch ausgesetzt wurden. Gewebespezifische NF- κ B-Knockout-Mäuse wurden mithilfe des Cre-loxP Rekombinationssystems generiert. Um Mäuse zu erhalten, die defizient für RelA/p65 (p65 $^{\Delta/-}$) oder I κ B α (I κ B $\alpha^{\Delta/-}$) in myeloiden Zellen sind, wurden p65 $^{F/F}$ oder I κ B $\alpha^{F/F}$ Mäuse mit LysMCre-Mäusen verpaart (Algul et al., 2007b; Clausen et al., 1999; Rupec et al., 2005). LysMCre-Mäuse mit funktionalem NF- κ B dienten als Kontrollmäuse (WT). Der Knockout von IL-17A bestand in einer systemischen Deletion und wurde von Dr. Yoichiro Iwakura (Institute of Medical Science, University of Tokyo) generiert (Nakae et al., 2002).

4.2.1. NF- κ B-knockout-Mäuse im akuten Rauchmodell: Deletion von p65 oder I κ B α in myeloiden Zellen führt zu einer gesteigerten Entzündung in der Lunge

Rauchexposition wirkt sich in der Lunge sowohl auf die Epithelzellen als auch auf die in der Lunge vorhandenen und einströmenden Entzündungszellen aus. In der gesunden Lunge befinden sich vor allem Alveolarmakrophagen (Hussell and Bell, 2014), die zur myeloiden Linie gehören. Zur Erforschung der Rolle des myeloiden NF- κ B-Signalweges bei der Entzündung, die durch akuten Rauch verursacht wird, wurden WT Mäuse, p65- und I κ B α -knockout-Mäuse Rauch ausgesetzt. Auf diese Weise konnte untersucht werden, wie sich die gewebespezifische Deletion der NF- κ B-Untereinheit p65 (p65-knockout) und des NF- κ B-Inhibitors I κ B α (I κ B α -knockout) in myeloiden Zellen auf die rauchinduzierte Entzündung auswirkt. Die Manipulation des myeloiden NF- κ B-Signalweges wirkte sich schon im Grundzustand auf das Zellbild in der BALF aus. Die Anzahl an Gesamtleukozyten (Abb. 11 A)

und Makrophagen (Abb. 11 B) war in der BALF von raumluftexponierten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen signifikant vermindert. Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten war in raumluftexponierten $\text{p}65$ -defizienten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 11 C). Im Grundzustand waren bei den $\text{p}65$ -defizienten Mäusen mehr Lymphozyten nachweisbar als bei den WT Mäusen (Abb. 11 D). Akute Rauchexposition führte bei beiden knockout-Stämmen zu einer Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl in der BALF. Bei den $\text{p}65$ -knockout-Mäusen ($\text{p}65^{\Delta/-}$) strömten durch Rauchexposition signifikant mehr Zellen in die Lunge als bei rauchexponierten WT Mäusen ein (Abb. 11 A). Nach akuter Rauchexposition erhöhte sich die Zahl der Makrophagen in der BALF bei den $\text{p}65$ -defizienten und WT Mäusen, bei den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen erhöhte sich die Anzahl nicht signifikant (Abb. 11 B). Bei rauchexponierten $\text{p}65$ -defizienten Mäusen strömten signifikant mehr und bei den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen signifikant weniger Monozyten verglichen mit rauchexponierten WT Mäusen in die Lungen ein (Abb. 11 B). Durch akuten Rauch erhöhten sich bei allen 3 Mausstämmen die Zahlen der neutrophilen Granulozyten der BALF. Nach der Rauchexposition war die Anzahl neutrophiler Granulozyten bei $\text{p}65$ -defizienten Mäusen allerdings signifikant geringer als bei rauchexponierten WT Mäusen (Abb. 11 C). Bei den WT Mäusen waren nach akutem Rauch mehr Lymphozyten in der Lunge nachweisbar (Abb. 11 D).



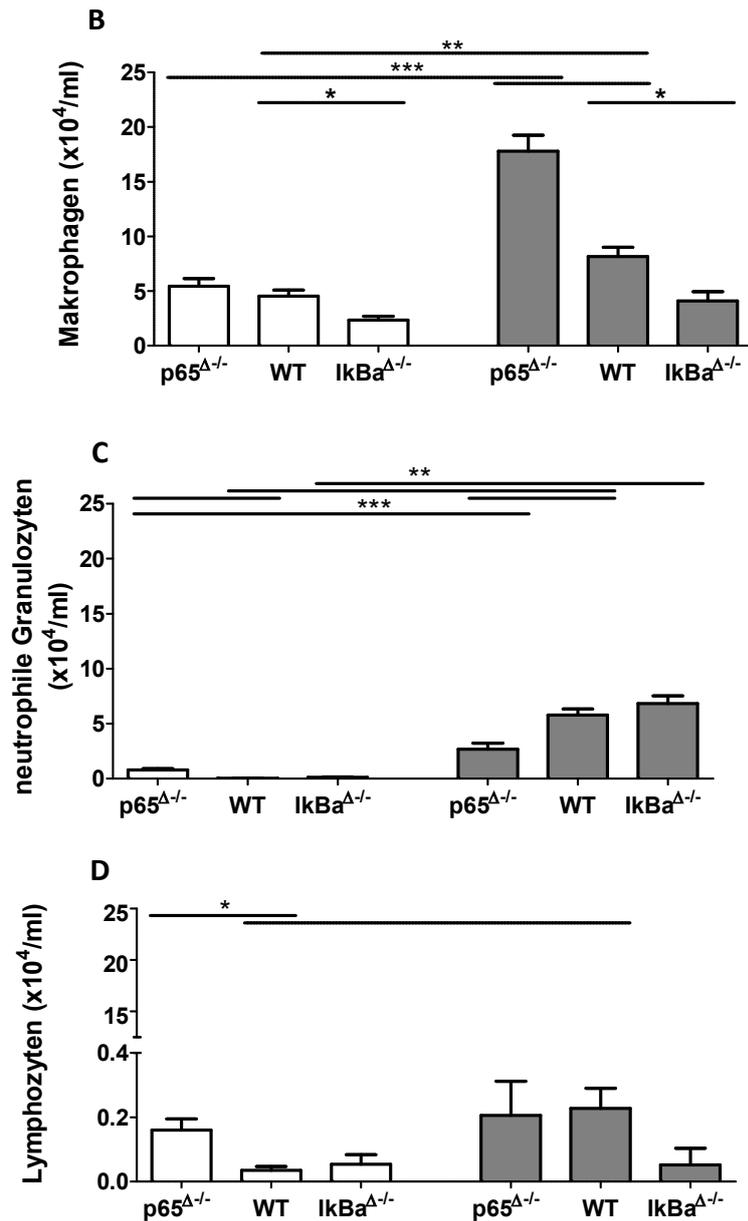


Abbildung 11: Leukozyten in der BALF von NF-κB-knockout Mäusen nach Kurzzeitberauchung. Mäuse, denen in myeloiden Zellen p65 (p65^{Δ/Δ}) bzw. IκBα(IκBα^{Δ/Δ}) fehlt, wurden 3 Tage akutem Rauch ausgesetzt. Nach 16 Stunden wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahlen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozyten in der BALF. B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrollp65^{Δ/Δ} n=7, Kontrolle WT n=6, Kontrolle IκBα^{Δ/Δ} n=5; Rauch p65^{Δ/Δ} n=7, Rauch WT n=10, Rauch IκBα^{Δ/Δ} n=5), mean ±SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die Zahlen der neutrophilen Granulozyten der BALF spiegeln sich in der Konzentration von KC in der BALF wider (Abb. 12).

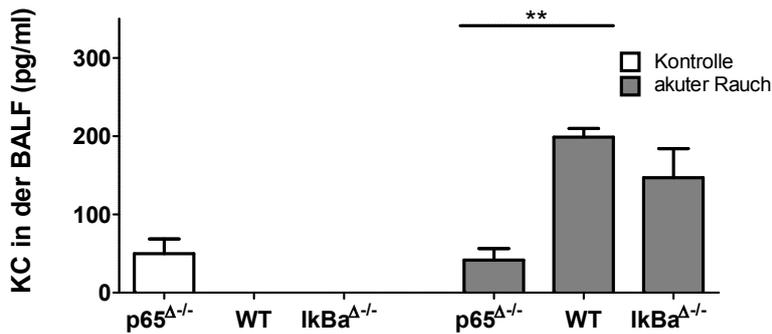
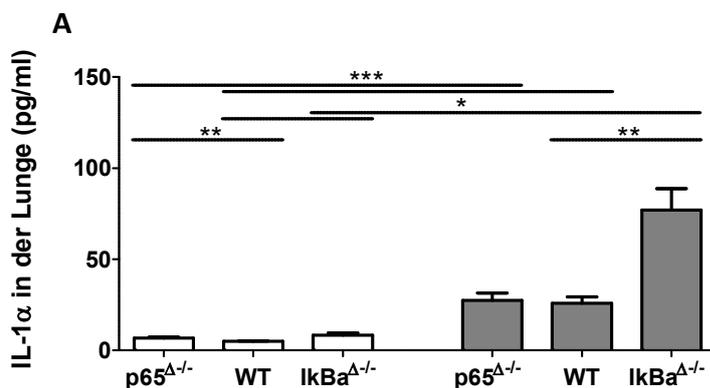


Abbildung 12: Konzentration des proinflammatorischen Chemokins KC in der BALF von myeloid-defizienten p65- und IκBα-Mäusen nach akuter Rauchexposition. Nach 3 Tagen Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurde BALF der Mäuse gewonnen und mittels ELISA die Konzentration an KC bestimmt. (Kontrollep65^{-/-} n=7, Kontrolle WT n=7, KontrolleIκBα^{-/-} n=5; Rauch p65^{-/-} n=7, Rauch WT n=9, RauchIκBα^{-/-} n=5). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveaus: **p<0,01).

Um weitere Einblicke in das inflammatorische Geschehen zu erhalten, wurden verschiedene NF-κB-regulierte Zytokine und Chemokine im Lungenhomogenisat gemessen. Abbildung 13 zeigt die Konzentrationen der Chemokine IL-1α, MIP-1α, KC und G-CSF. Die Deletion von sowohl p65 als auch von IκBα führte schon im Grundzustand zu einer vermehrten Entzündung, gemessen in der Konzentration von KC und IL-1α (Abb. 13 A und C). Die Abbildungen 13 B bis D zeigen, dass die akute Rauchexposition zur Ausschüttung von Neutrophilen-rekrutierenden Chemokinen bei allen Mausgruppen führte. Es wird deutlich, dass das Fehlen des NF-κB-Inhibitors IκBα durch Rauchexposition zu einer höheren Chemokin-Ausschüttung in der Lunge führte als dies bei den WT Mäusen der Fall ist, p65-Knockout-Mäuse zeigten keinen Phänotyp im Vergleich mit WT Mäusen.



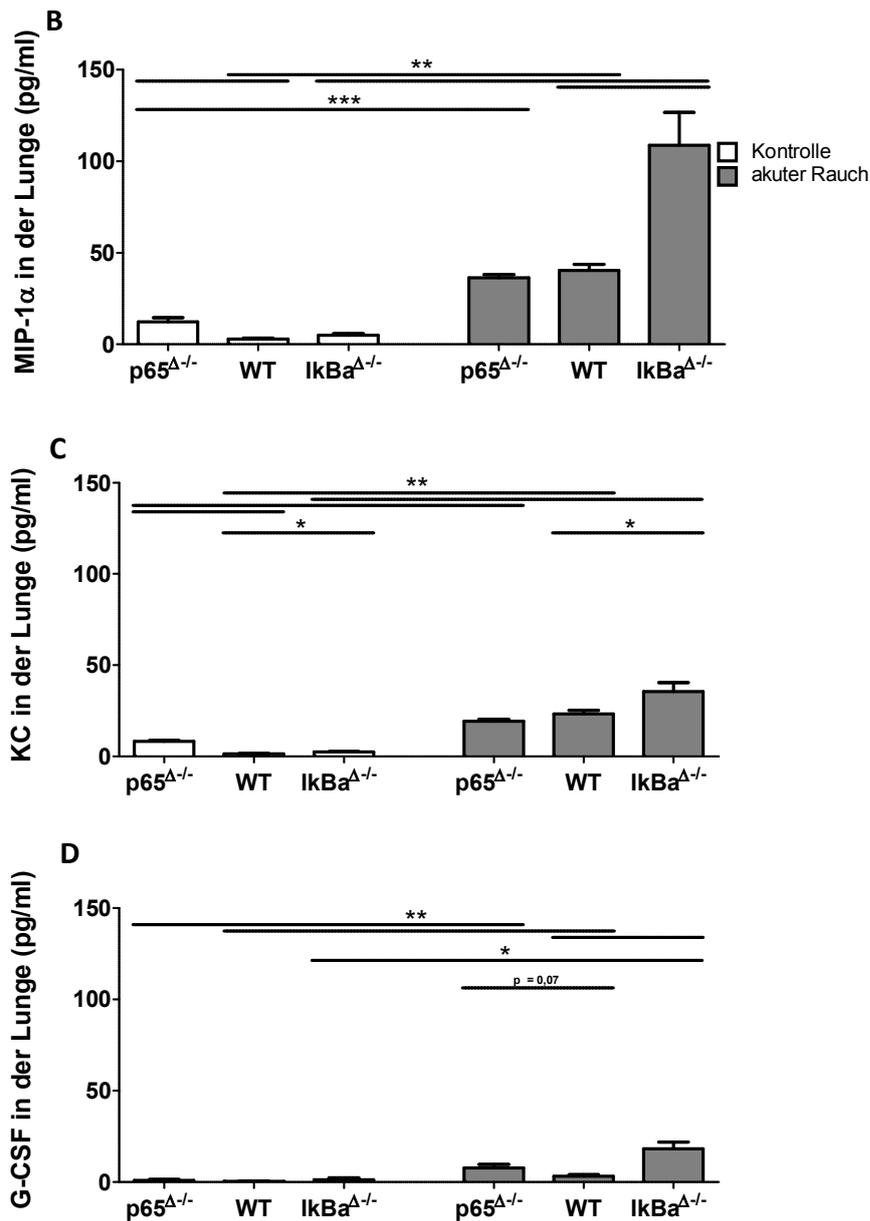


Abbildung 13: Konzentration der Chemokine IL-1α, MIP-1α, KC und G-CSF in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und IκBα-Mäusen nach akuter Rauchexposition. Nach 3 Tagen Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen der Chemokine bestimmt. Konzentration von A) IL-1α. B) MIP-1α. C) KC. D) G-CSF. (Kontrolle p65^{Δ-/-} n=7, Kontrolle WT n=7, Kontrolle IκBα^{Δ-/-} n=5; Rauch p65^{Δ-/-} n=7, Rauch WT n=10, Rauch IκBα^{Δ-/-} n=5). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

In der Lunge wurde außerdem die Bildung der Zytokine IL-1β, IL-6 und IL-10 untersucht (Abb. 14). p65-defiziente Mäuse hatten schon im Grundzustand eine erhöhte IL-1β-Konzentration in der Lunge (Abb. 14 A). Die Abbildungen 14 A bis C zeigen, wie schon Abbildung 13 für die Chemokine, eine verstärkte Bildung der Zytokine bei IκBα-Knockout-Mäusen nach akuter Rauchexposition und eine verstärkte IL-1β-Abgabe bei allen Mausgruppen durch das Rauchen. IL-6 und IL-10 (Abb. 14 B und C) wurden nur von den Knockout-Mäusen durch die

Rauchexposition vermehrt gebildet. Ähnlich wie bei den I κ B α -defizienten Mäusen stieg bei den p65-defizienten Mäusen die Konzentration von IL-10 und IL-1 β im Vergleich mit den WT Mäusen durch Rauchexposition an (Abb. 14 A und C).

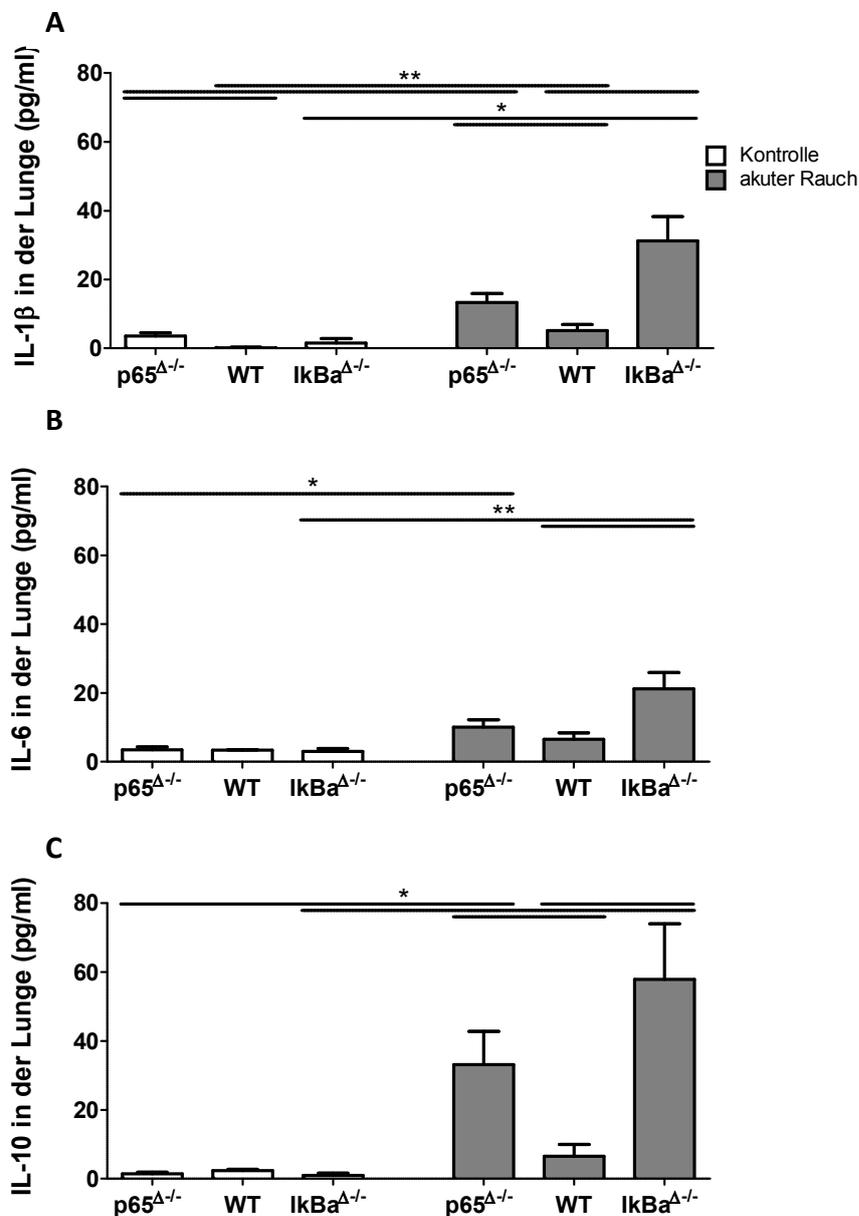


Abbildung 14: Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach akuter Rauchexposition. Nach 3 Tagen Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen der Zytokine bestimmt. Konzentration von A) IL-1 β . B) IL-6. C) IL-10. (Kontrolle p65 Δ/Δ n=7, Kontrolle WT n=7, Kontrolle I κ B α Δ/Δ n=5; Rauch p65 Δ/Δ n=7, Rauch WT n=10, Rauch I κ B α Δ/Δ n=5). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Abbildung 15 zeigt deutlich, dass die p65-Defizienz im Grundzustand zu einer erhöhten Konzentration an MCP-1 in der Lunge führte. Ein deutlicher Anstieg in der Konzentration von

MCP-1 in den Lungen der Mäuse durch die Rauchexposition konnte beobachtet werden, wobei beide Knockout-Stämme signifikant mehr MCP-1 produzierten als die WT Mäuse.

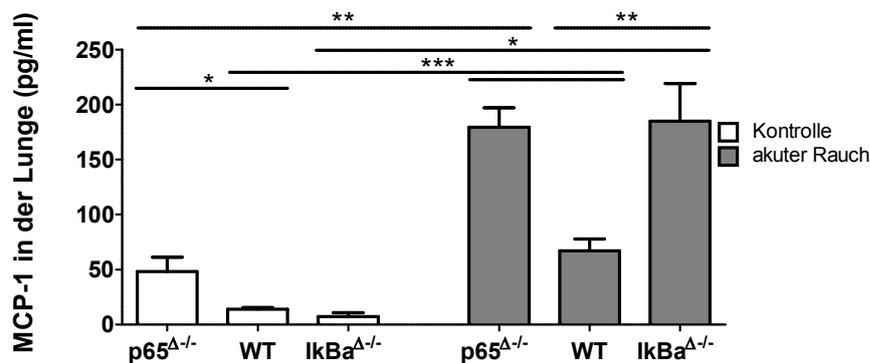


Abbildung 15: Konzentration des Chemokins MCP-1 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und IκBα-Mäusen nach akuter Rauchexposition. Nach 3 Tagen Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen des Chemokins bestimmt. (Kontrolle p65^{Δ/Δ} n=7, Kontrolle WT n=7, Kontrolle IκBα^{Δ/Δ} n=5; Rauch p65^{Δ/Δ} n=7, Rauch WT n=10, Rauch IκBα^{Δ/Δ} n=5) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2.2. NF-κB-knockout-Mäuse im chronischen Rauchmodell: Deletion von p65 oder IκBα in myeloiden Zellen führt zu einer verminderten Lungenfunktion

Im chronischen Rauchmodell wurden die Mäuse 7 Monate chronisch Rauch ausgesetzt und der rauchinduzierte Lungenschaden quantifiziert. Zusätzlich wurden nach 3 Monaten Rauchexposition Entzündungsmediatoren sowie die Zellzahlen und das Differenzialzellbild untersucht. Abbildung 16 A zeigt, dass IκBα-defiziente Mäuse im Grundzustand signifikant weniger Entzündungszellen in der BALF hatten als WT Mäuse. Dies resultierte aus einer verminderten Anzahl an Makrophagen (Abb. 16 B). Im Vergleich zu den WT Mäusen hatten die p65-defizienten Mäuse im Grundzustand signifikant mehr neutrophile Granulozyten und die IκBα-defizienten Mäuse signifikant mehr Lymphozyten in der BALF (Abb. 16 C und D), was einen veränderten inflammatorischen Grundphänotyp auch in 18 Wochen alten Mäusen aufzeigt. Abbildung 16 A zeigt, dass sich die Leukozytenzahl der BALF durch chronische Rauchexposition signifikant bei WT, p65-defizienten und IκBα-defizienten Mäusen erhöhte. Diese Zellpopulationen bestanden zum größten Teil aus Makrophagen (Abbildung 16 B). Im Vergleich zu den WT Mäusen war die Zahl der Makrophagen nach Rauchexposition bei den IκBα-defizienten Mäusen erniedrigt. Chronisches Rauchen führte zu keinem gesteigerten Einstrom von neutrophilen Granulozyten. Durch chronische Rauchexposition verringerte sich

die Anzahl der Lymphozyten bei den IκBα-defizienten Mäusen, sie war allerdings nach Rauchexposition im Vergleich zu WT Mäusen erhöht (Abb. 16 D).

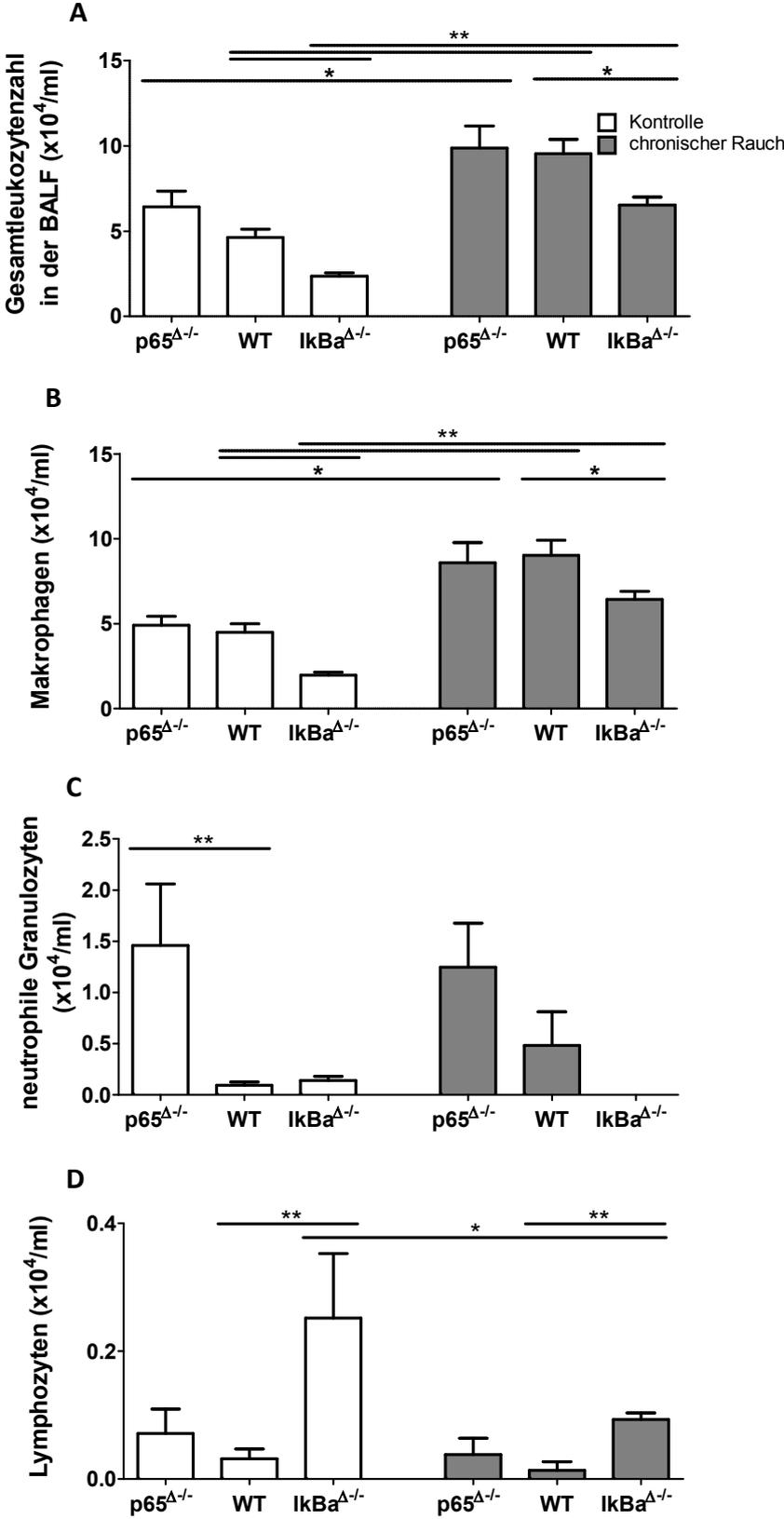


Abbildung 16: Leukozyten in der BALF von NF-κB-knockout Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Mäuse, denen in myeloiden Zellen p65 (p65^{-/-}) bzw. IκBα (IκBα^{-/-}) fehlt, wurden 3 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. 24 Stunden nach

der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozyten in der BALF. B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle $p65^{\Delta/-}$ n=6, Kontrolle WT n=7, Kontrolle $IkBa^{\Delta/-}$ n=5; Rauch $p65^{\Delta/-}$ n=6, Rauch WT n=6, Rauch $IkBa^{\Delta/-}$ n=5), mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die Konzentrationen von KC in der BALF waren wie bei der akuten Rauchexposition mit den Zahlen der neutrophilen Granulozyten in der BALF assoziiert. Im Vergleich zu den WT Mäusen hatten die $p65$ -defizienten Mäuse im Grundzustand erhöhte Konzentrationen an KC in der BALF. Die KC-Konzentrationen wurden durch chronische Rauchenexposition nicht signifikant beeinflusst (Abb. 17 A). Im Serum waren wie in der BALF erhöhte KC-Konzentrationen bei $p65$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen messbar. Durch chronische Rauchexposition verringerte sich die KC-Konzentration der $IkBa$ -defizienten Mäuse, die im Grundzustand im Vergleich zu WT Mäusen erhöht war (Abb. 17 B).

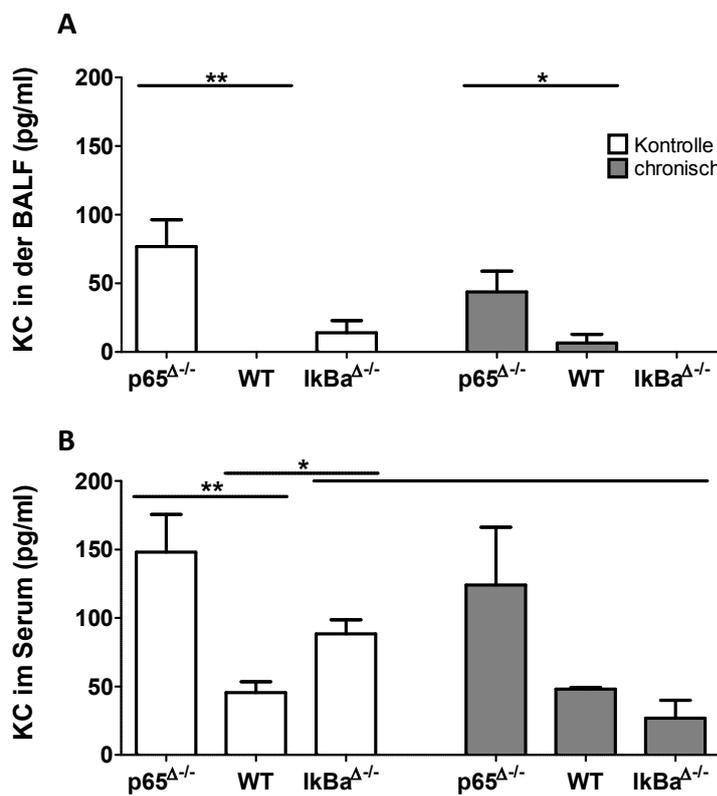
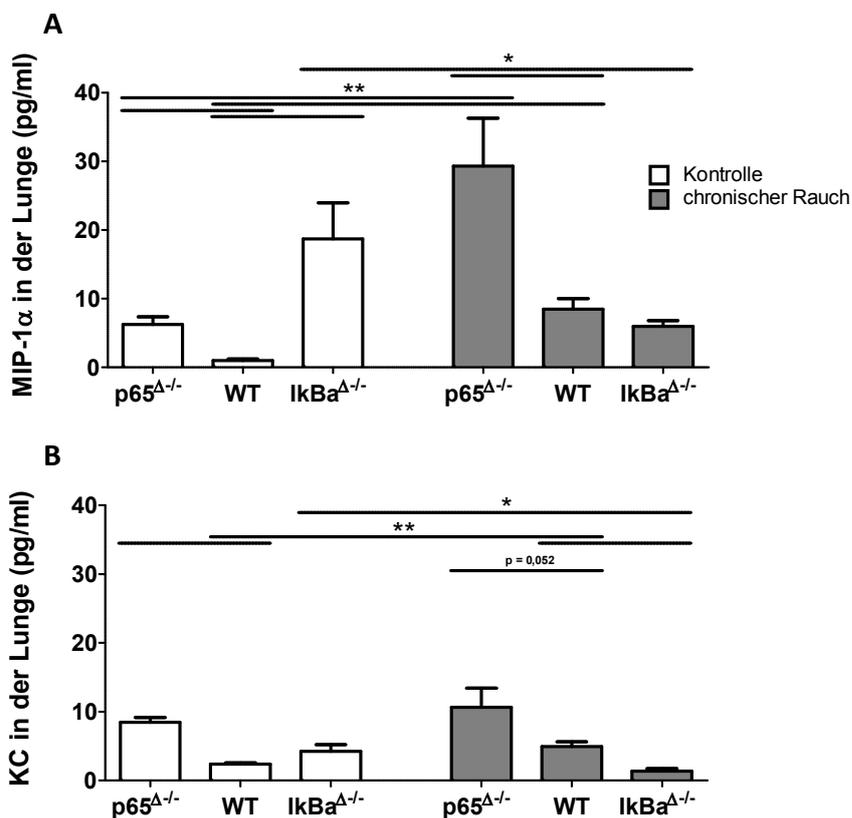


Abbildung 17: Konzentration des proinflammatorischen Chemokins KC in der BALF und im Serum von myeloid-defizienten $p65$ - und $IkBa$ -Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Nach 3 Monaten Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurde Serum und BAL der Mäuse gewonnen und mittels ELISA die Konzentration an KC bestimmt. A) KC-Konzentration in der BALF. B) KC-Konzentration im Serum. (Kontrolle $p65^{\Delta/-}$ n=6, Kontrolle WT n=8, Kontrolle $IkBa^{\Delta/-}$ n=5; Rauch $p65^{\Delta/-}$ n=6, Rauch WT n=6, Rauch $IkBa^{\Delta/-}$ n=5). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Wie nach der akuten Rauchexposition wurden die Konzentrationen von MIP-1 α , KC und IL-1 α in den Lungen gemessen (Abb. 18). Die Konzentrationen der Chemokine waren im Vergleich zur akuten Rauchexposition geringer. Im Grundzustand zeigten die p65-defizienten Mäuse im Vergleich mit den WT Mäusen eine erhöhte Ausschüttung der Chemokine (Abb. 18 A bis C). I κ B α -defiziente Mäusen produzierten ebenfalls im Grundzustand mehr MIP-1 α und IL-1 α (Abb. 18 A und C). Durch die chronische Rauchexposition erhöhten sich die Konzentrationen von MIP-1 α , KC und IL-1 α bei WT Mäusen und die Konzentrationen von MIP-1 α und IL-1 α bei p65-defizienten Mäusen (Abb. 18 A bis C). p65-Knockout-Mäuse hatten nach chronischer Rauchexposition eine höhere Konzentration an MIP-1 α in der Lunge als die WT Mäuse (Abb. 18 A). Bei den I κ B α -defizienten Mäusen verringerte sich die Konzentration von MIP-1 α und KC durch chronische Rauchexposition, die Konzentration von IL-1 α blieb unverändert (Abb. 18 A bis C).



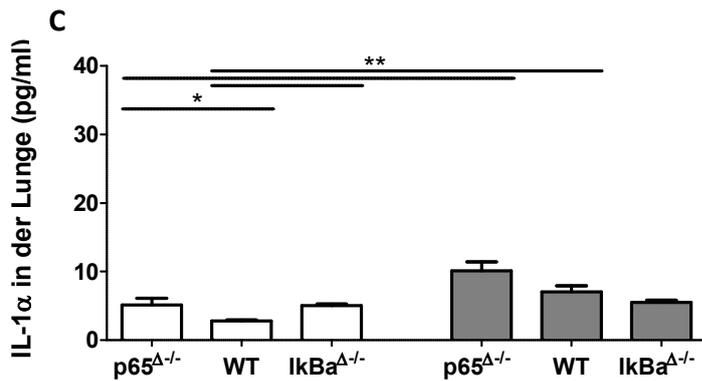


Abbildung 18: Konzentration der Chemokine MIP-1 α , KC und IL-1 α in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Nach 3 Monaten Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen der Chemokine bestimmt. Konzentration von A) MIP-1 α . B) KC. C) IL-1 α . (Kontrolle p65^{Δ-/-} n=6, Kontrolle WT n=9, Kontrolle I κ B α ^{Δ-/-} n=5; Rauch p65^{Δ-/-} n=6, Rauch WT n=7, Rauch I κ B α ^{Δ-/-} n=5). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Bei den I κ B α -defizienten Mäusen zeigte sich sowohl im Grundzustand als auch nach Rauchexposition eine erhöhte IL-6-Konzentration (Abb. 19). Allerdings erhöhte sich die Konzentration von IL-6 durch chronische Rauchexposition nicht und war nur in sehr geringen Mengen vorhanden.

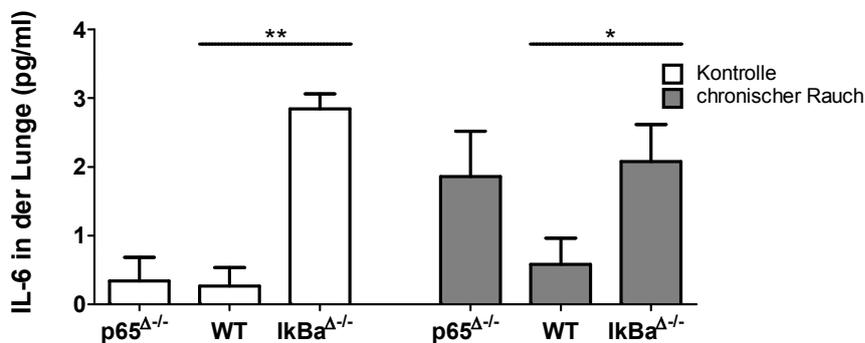


Abbildung 19: Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und I κ B α -Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Nach 3 Monaten Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen des Zytokins bestimmt. (Kontrolle p65^{Δ-/-} n=6, Kontrolle WT n=9, Kontrolle I κ B α ^{Δ-/-} n=5; Rauch p65^{Δ-/-} n=6, Rauch WT n=7, Rauch I κ B α ^{Δ-/-} n=5) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Die Konzentration an MCP-1 in der Lunge wurde durch Rauchexposition nicht beeinflusst (Abb. 20). Die MCP-1 Konzentrationen waren jedoch im Grundzustand und nach Rauchexposition in den Lungen von p65-defizienten Mäusen verglichen mit WT Tieren signifikant erhöht. I κ B α -defiziente Mäuse wiesen nach Rauchexposition hingegen weniger MCP-1 in der Lunge auf.

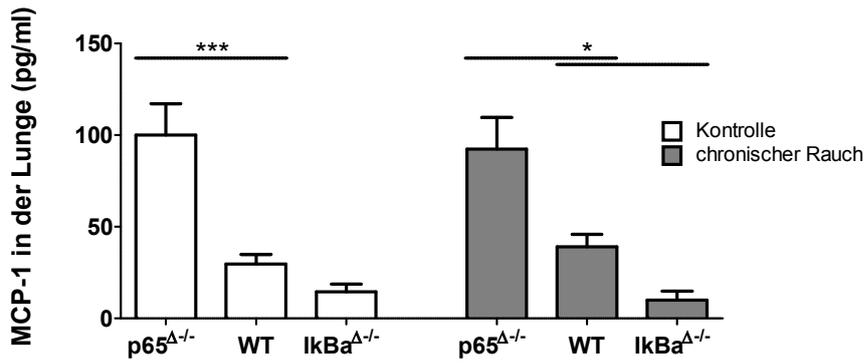
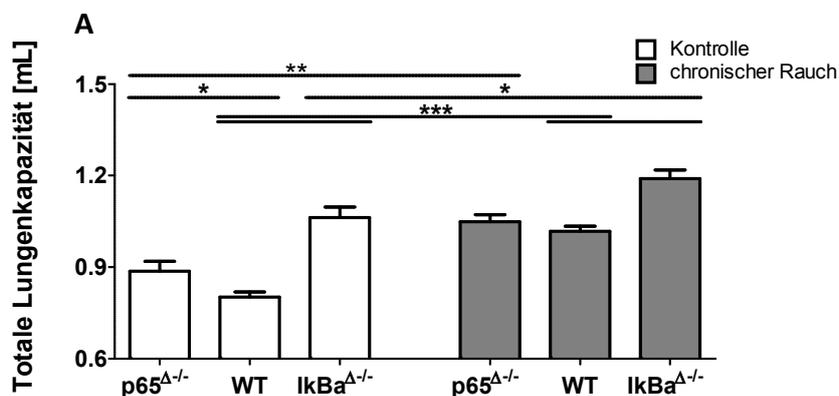


Abbildung 20: Konzentration des Chemokins MCP-1 in der Lunge von myeloid-defizienten p65- und IκBα-Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Nach 3 Monaten Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurde Lungenhomogenisat der Mäuse hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen des Chemokins bestimmt. (Kontrolle p65^{-/-} n=6, Kontrolle WT n=9, Kontrolle IκBα^{-/-} n=5; Rauch p65^{-/-} n=6, Rauch WT n=7, Rauch IκBα^{-/-} n=5) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, ***p<0,001).

Die Lungenfunktionsmessung zeigte, dass chronische Rauchexposition bei IκBα-defizienten, WT und p65-defizienten Mäusen zu einer erhöhten totalen Lungenkapazität führte (Abb. 21 A). Beide knockouts zeigten aber auch schon im Grundzustand im Vergleich zu den WT Mäusen eine erhöhte Lungenkapazität. Darüber hinaus war die Lungenkapazität bei IκBα-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach chronischer Rauchexposition signifikant erhöht. Rauchexposition und Defizienz für IκBα wirkten sich daher additiv auf die Lungenkapazität aus (Abb. 21 A). Bei der quasi-statischen compliance zeigte sich bei den IκBα-defizienten Mäusen ein ähnliches Bild wie bei der totalen Lungenkapazität. Auch bei diesem Wert bewirkte das Fehlen von IκBα sowohl im Grundzustand als auch nach Rauchexposition im Vergleich zu den WT Mäusen eine Verschlechterung der Lungenfunktion. Bei p65-defizienten Mäusen zeigte sich der Effekt des Rauchens in einer Erhöhung der quasi-statischen compliance, jedoch bestand sowohl im Grundzustand als auch nach Rauchexposition kein Unterschied zu den WT Mäusen (Abb. 21 B).



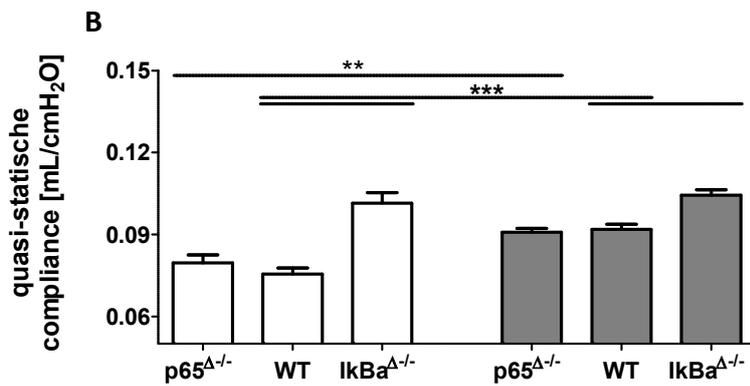
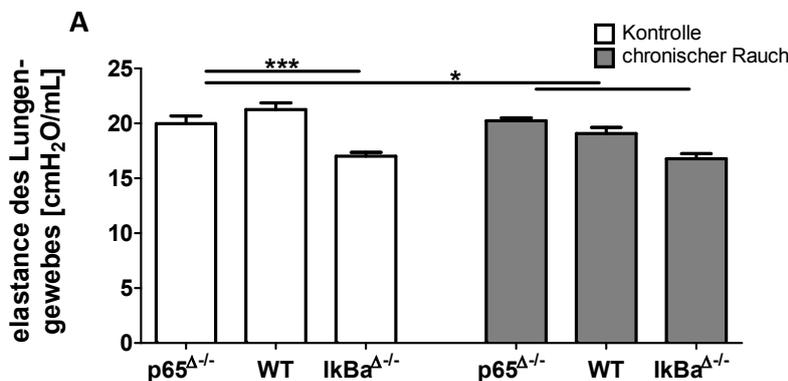


Abbildung 21: Lungenfunktionsmessung der myeloid-defizienten p65- und IkBa-Mäuse nach chronischem Rauch: Totale Lungenkapazität und quasi-statische compliance. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) Totale Lungenkapazität der WT, IkBa-defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Pressure-Volume Loop (P-V Loop)-Messung (Kontrolle p65^{Δ/Δ} n=11, Kontrolle WT n=19, Kontrolle IkBa^{Δ/Δ} n=12, Rauch p65^{Δ/Δ} n=13, Rauch WT n=19, Rauch IkBa^{Δ/Δ} n=8). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ± SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). B) Quasi-statische compliance der WT, IkBa-defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der P-V Loop-Messung (Kontrolle p65^{Δ/Δ} n=11, Kontrolle WT n=19, Kontrolle IkBa^{Δ/Δ} n=12, Rauch p65^{Δ/Δ} n=13, Rauch WT n=19, Rauch IkBa^{Δ/Δ} n=8). Statistik: unpaired t-test, two-tailed, mean ± SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Durch chronische Rauchexposition verlor das Lungengewebe der WT Mäuse an Steifigkeit, gemessen in einer Abnahme der elastance (Abb. 22 A). IkBa-defiziente Mäuse hatten im Vergleich zu WT Mäusen schon im Grundzustand und nach Rauchexposition eine geringere elastance des Lungengewebes, also eine weniger steife Lunge (Abb. 22 A). Bei p65- und IkBa-defizienten Mäusen war kein Effekt durch die Rauchexposition erkennbar. Die WT Mäuse entwickelten durch die chronische Rauchexposition einen Lungenschaden, der mit dem erwarteten Anstieg der compliance des gesamten Atemsystems (mit Ausnahme der oberen Atemwege) einherging (Abb. 22 B). Das Fehlen von IkBa führte zu einer erhöhten compliance im Vergleich zu den WT Mäusen, sowohl im Grundzustand als auch nach Rauchexposition (Abb. 22 B). Allerdings wurde bei IkBa-defizienten Mäusen die compliance durch Rauchexposition nicht weiter gesteigert.



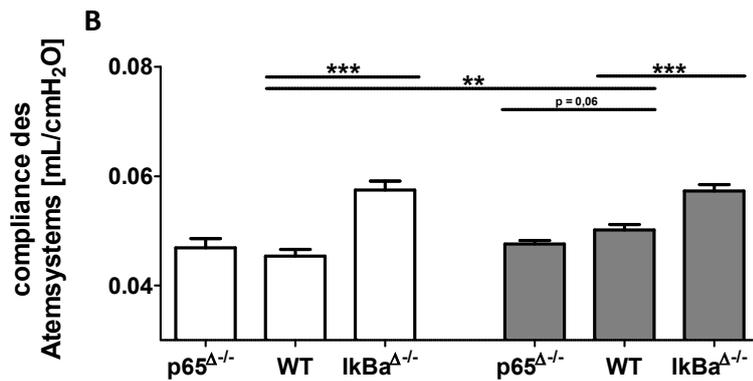


Abbildung 22: Lungenfunktionsmessung der myeloid-defizienten p65- und IkB α -Mäuse nach chronischem Rauch: elastance des Lungengewebes und compliance des gesamten Atemsystems. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) elastance des Lungengewebes der WT, IkB α -defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung, die zwischen Gewebe und Atemwegen unterscheidet. B) compliance des gesamten respiratorischen Systems der WT, IkB α -defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Snapshot Messung. (Kontrolle p65^{Δ-/Δ-} n=11, Kontrolle WT n=19, Kontrolle IkB α ^{Δ-/Δ-} n=12, Rauch p65^{Δ-/Δ-} n=13, Rauch WT n=19, Rauch IkB α ^{Δ-/Δ-} n=8). Statistik: unpaired t-test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die Messung des Widerstands der Atemwege und des Widerstands des gesamten respiratorischen Systems ergab, dass IkB α -defizienten Mäusen nach Rauchexposition einen obstruktiven Phänotyp aufwiesen. Der Widerstand der Atemwege und der Widerstand des gesamten respiratorischen Systems waren bei raumluftexponierten IkB α -Mäusen zwar geringfügig vermindert. (Abb. 23 A und B). Nach Rauchexposition waren diese Parameter bei IkB α -defizienten Mäusen jedoch deutlich erhöht (Abb. 23 A und B). WT Mäuse entwickelten durch die Rauchexposition keinen obstruktiven Phänotyp in den Atemsystems- und Atemwegswiderständen (Abb. 23 A und B). Der Wert tissue damping entspricht dem Energieverlust in den Alveolen (ähnelt dem Widerstand des Gewebes). Dieser Wert war bei IkB α -defizienten Mäusen sowohl im Grundzustand als auch nach Rauchexposition im Vergleich mit den WT Mäusen erniedrigt (Abb. 23 C). p65-defiziente Mäuse zeigten nur im Grundzustand beim Widerstand des Atemsystems niedrigere Werte als die WT Mäuse (Abb. 23 B).

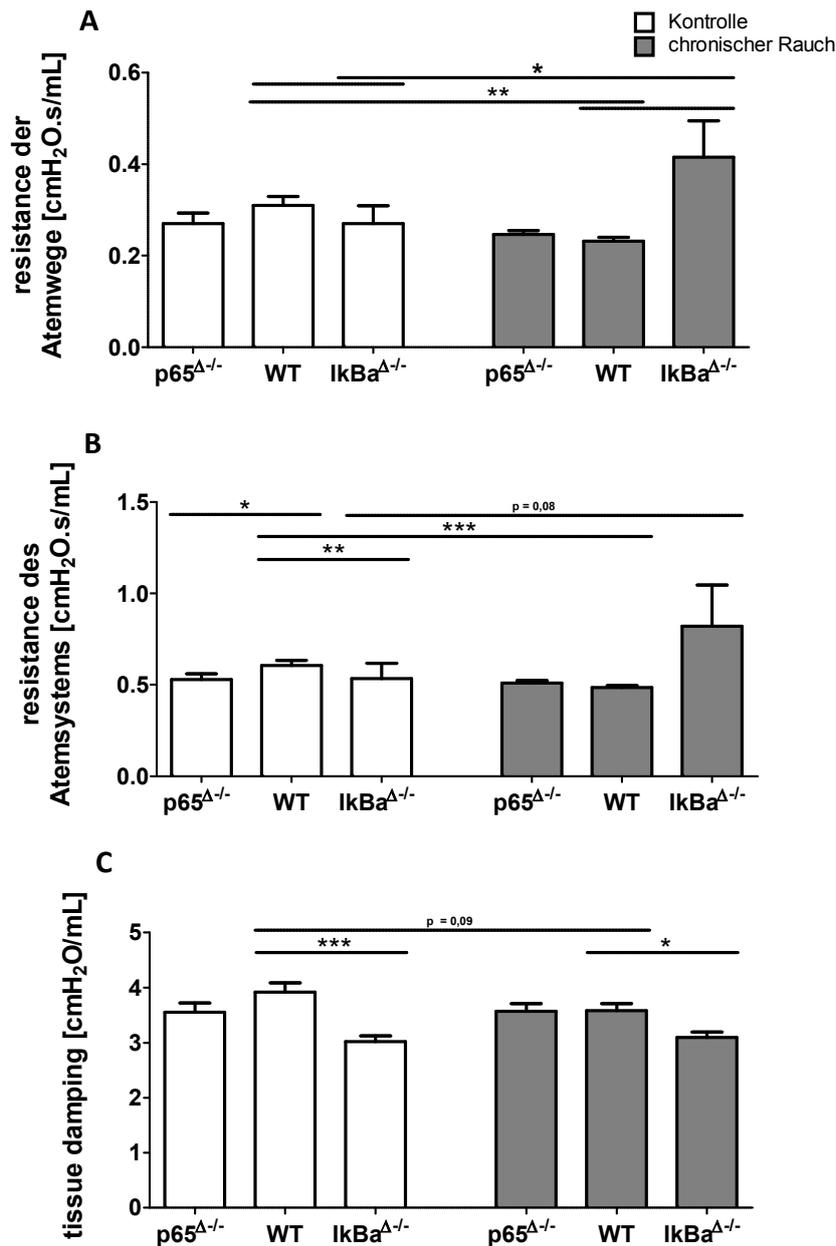


Abbildung 23: Lungenfunktionsmessung der myeloid-defizienten p65- und Ikbα-Mäuse nach chronischem Rauch: Widerstand des Atemsystems, der Atemwege und des Gewebes. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) Widerstand der Atemwege der WT, Ikbα-defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung. B) Widerstand des gesamten respiratorischen Systems der WT, Ikbα-defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Snaphsot-Messung. C) Widerstand des Lungengewebes der WT, Ikbα-defizienten und p65-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung (Kontrolle p65^{Δ/Δ} n=11; Kontrolle WT n=19, Kontrolle Ikbα^{Δ/Δ} n=12, Rauch p65^{Δ/Δ} n=13; Rauch WT n=19, Rauch Ikbα^{Δ/Δ} n=8). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean±SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

In der Stereologie zeigte sich der durch chronische Rauchexposition hervorgerufene Lungenschaden bei den p65-defizienten Mäusen in erhöhten MCL-Werten (Abb. 24). Nach Rauchexposition hatten sowohl p65- als auch Ikbα-defiziente Mäuse verglichen mit WT Mäusen erhöhte MCL-Werte.

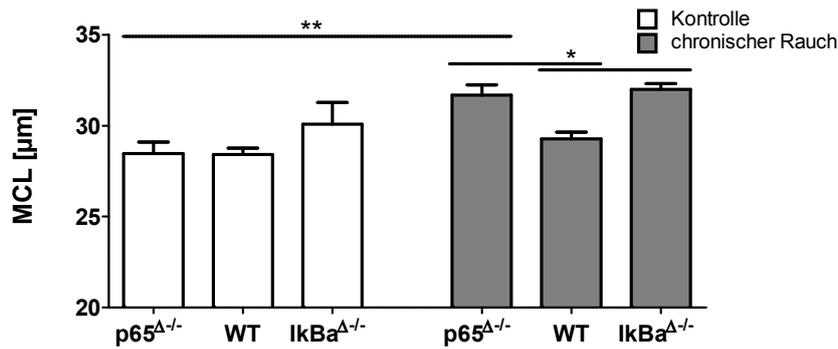


Abbildung 24: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens bei myeloid-defizienten p65- und IκBα-Mäusen. Nach 7 Monaten Rauchexposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition wurden die Lungen der Mäuse in Paraffin eingebettet und Schnitte auf Objektträger mittels HE-Färbung ausgewertet. Messung des mean chord length (MCL), der mittleren freien Distanz innerhalb der Lufträume (Kontrolle p65^{Δ/Δ} n=7, Kontrolle WT n=16, Kontrolle IκBα^{Δ/Δ} n=7, Rauch p65^{Δ/Δ} n=7, Rauch WT n=12, Rauch IκBα^{Δ/Δ} n=4). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05, **p<0,01).

In der Histologie wurde der durch Rauchexposition entstandene Lungenschaden durch eine Vergrößerung der Alveolen sichtbar (Abb. 25).

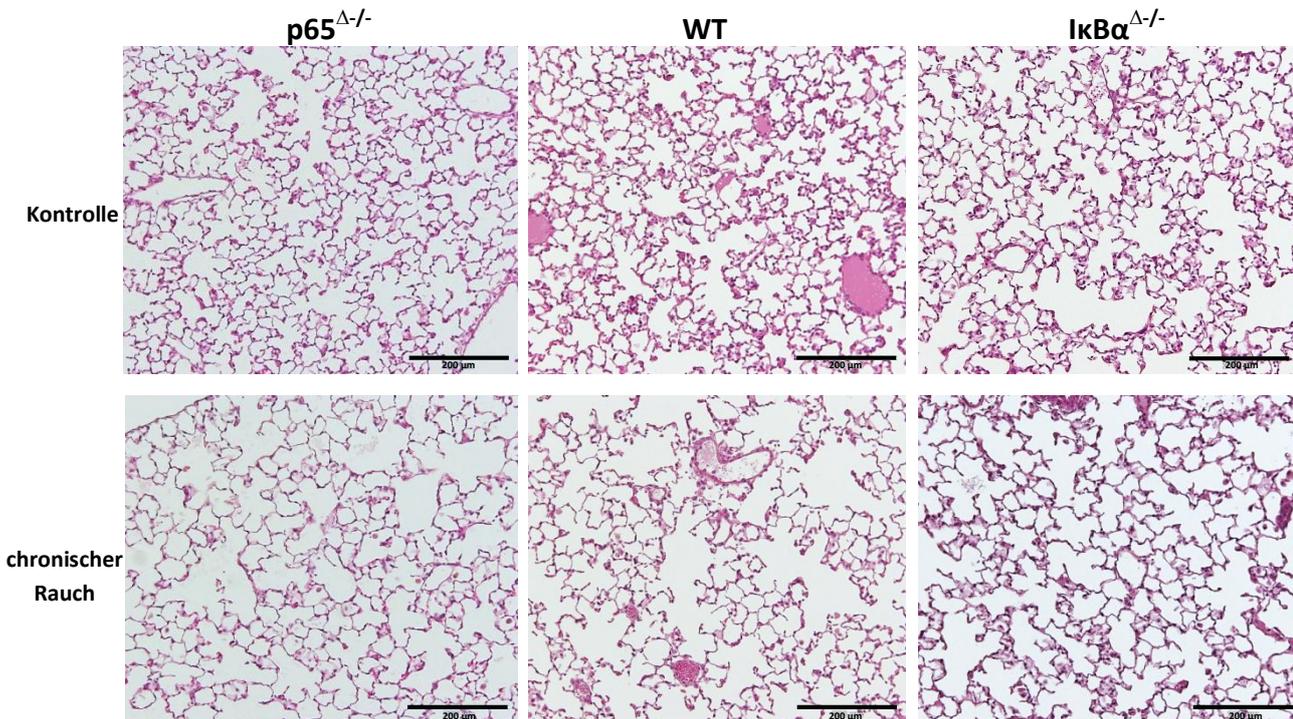


Abbildung 25: Histologie der Lungen der myeloid-defizienten p65- und IκBα-Mäuse nach 7 Monaten Rauch- bzw. RaumlufTEXposition. Die Lungen der Mäuse wurden nach 7 Monaten Rauch- bzw. RaumlufTEXposition und 48 Stunden nach der letzten Exposition in Paraffin eingebettet und in Schnitten auf Objektträger gebracht. Nach HE-Färbung der Schnitte wurde der Lungenschaden lichtmikroskopisch evaluiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine angemessene Aktivierung des myeloiden NF- κ B-Signalwegs für die Gewebshomöostase der Lunge benötigt wird.

4.2.3. IL-17A-knockout-Mäuse im akuten Rauchmodell: IL-17A-Defizienz wirkt sich nicht auf den Einstrom inflammatorischer Zellen in die Lunge aus

IL-17A vermittelt die Sekretion von Neutrophilen-rekrutierenden Chemokinen in Zielzellen (Witowski et al., 2004) wie Atemwegsepithelzellen. Da neutrophile Granulozyten bei der akuten Rauchexposition in die Lunge einströmen und in der BALF nachweisbar sind, wurde die Rolle des Zytokins IL-17A untersucht. Die Gesamtleukozytenzahl in der BALF erhöhte sich durch akutes Rauchen sowohl bei den WT als auch bei den IL-17A-defizienten Mäusen (Abb. 26 A). Durch die akute Rauchexposition strömten sowohl bei WT als auch bei IL-17-defizienten Mäusen neutrophile Granulozyten in die Lunge ein (Abb. 26 C), wohingegen die Zahl der Makrophagen und Lymphozyten unverändert blieb (Abb. 26 B und D). Das Fehlen von IL-17A führte bei akuter Rauchexposition zu keinem verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge (Abb. 26 C).

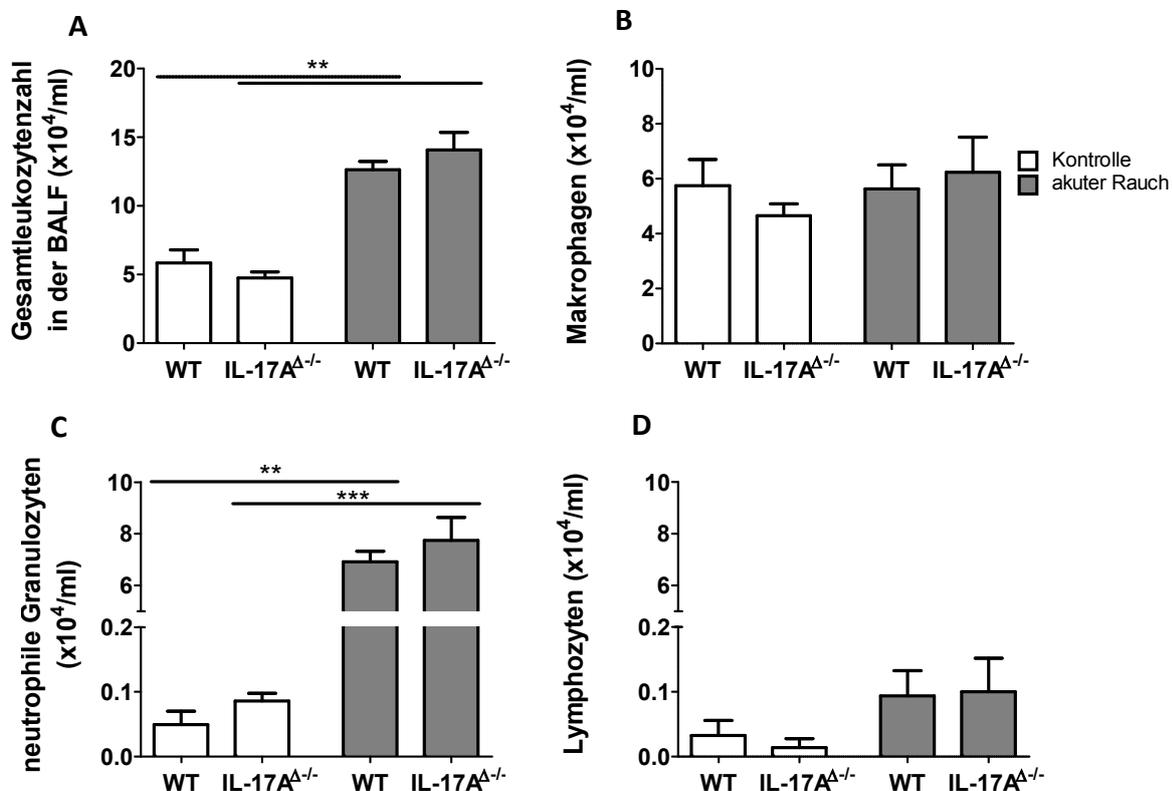


Abbildung 26: Leukozyten in der BALF von IL-17A-knockout Mäusen nach Kurzzeitberauchung. Mäuse, die defizient für IL-17A sind, wurden 3 Tage akutem Rauch ausgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop

differenziert. A) Gesamtleukozyten in der BALF. B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle WT n=6, Kontrolle IL-17A^{Δ/-} n=7, Rauch WT n=6, Rauch IL-17A^{Δ/-} n=7), mean ±SEM (Signifikanzniveaus: **p<0,01, ***p<0,001).

IL-17A konnte in der BALF mithilfe von ELISA weder bei WT noch bei IL-17A-defizienten Mäusen gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.4. IL-17A-knockout-Mäuse im chronischen Rauchmodell: IL-17A-Defizienz führt zu einer gestörten pulmonalen Homöostase und schützt nicht vor einem rauchinduzierten Lungenschaden

Nach 3 Monaten chronischer Rauchexposition wurden die Zellzahlen in der BALF von IL-17A-defizienten Mäusen und von WT Mäusen bestimmt. Rauchexposition führte zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtleukozyten in der BALF von IL-17A-defizienten Mäusen (Abb. 27 A). Im Grundzustand hatten die IL-17A-defizienten Mäuse signifikant weniger Makrophagen in der BALF als die WT Mäuse. Rauchexposition führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Makrophagen bei IL-17A-defizienten Mäusen (Abb. 27 B). Die Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten änderten sich nach chronischer Rauchexposition bei WT und IL-17A-defizienten Mäusen nicht (Abb. 27 C und D).

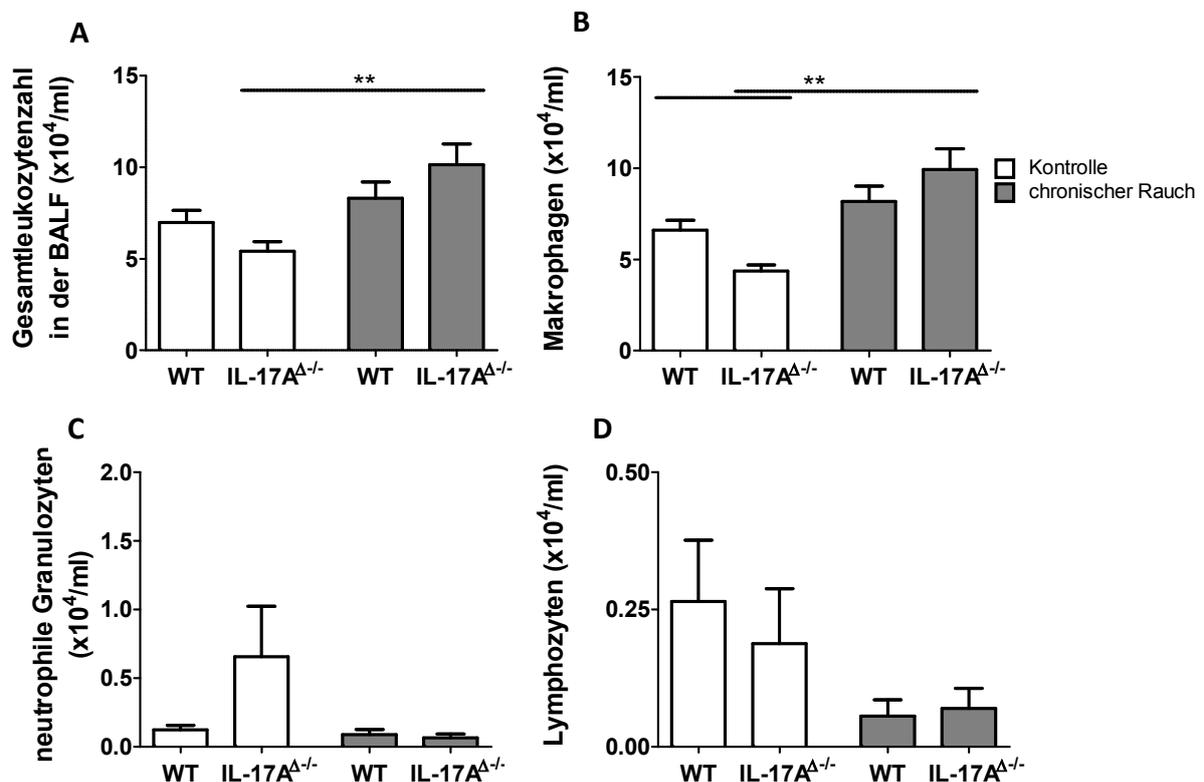


Abbildung 27: Leukozyten in der BALF von IL-17A-knockout Mäusen nach chronischer Rauchexposition. IL-17A-defiziente Mäuse wurden 3 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. Anschließend wurden die Lungen der Mäuse laviert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozyten in der BALF. B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle WT n=6, Kontrolle IL-17A^{Δ/-} n=7, Rauch WT n=7, Rauch IL-17A^{Δ/-} n=8), mean ±SEM (Signifikanzniveau: **p<0,01).

Neben Th17-Zellen sind $\gamma\delta$ T-Zellen die Hauptproduzenten von IL-17A (Tan and Rosenthal, 2013). Um zu untersuchen, ob sich die IL-17A-Defizienz und die Rauchexposition auf die Zahl der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lunge auswirken, wurden Lymphozyten im Durchfluss-Zytometer analysiert. Hierzu wurde nach 3 Monaten Rauchexposition eine Einzelzellsuspension der Lungen hergestellt. Innerhalb der Leukozyten (CD45-positive Zellen) wurde der Anteil der T-Zellen (CD3-positive Zellen) ermittelt. Der prozentuale Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta$ T-Zellen wurde innerhalb der T-Zellen bestimmt (Abb. 28).

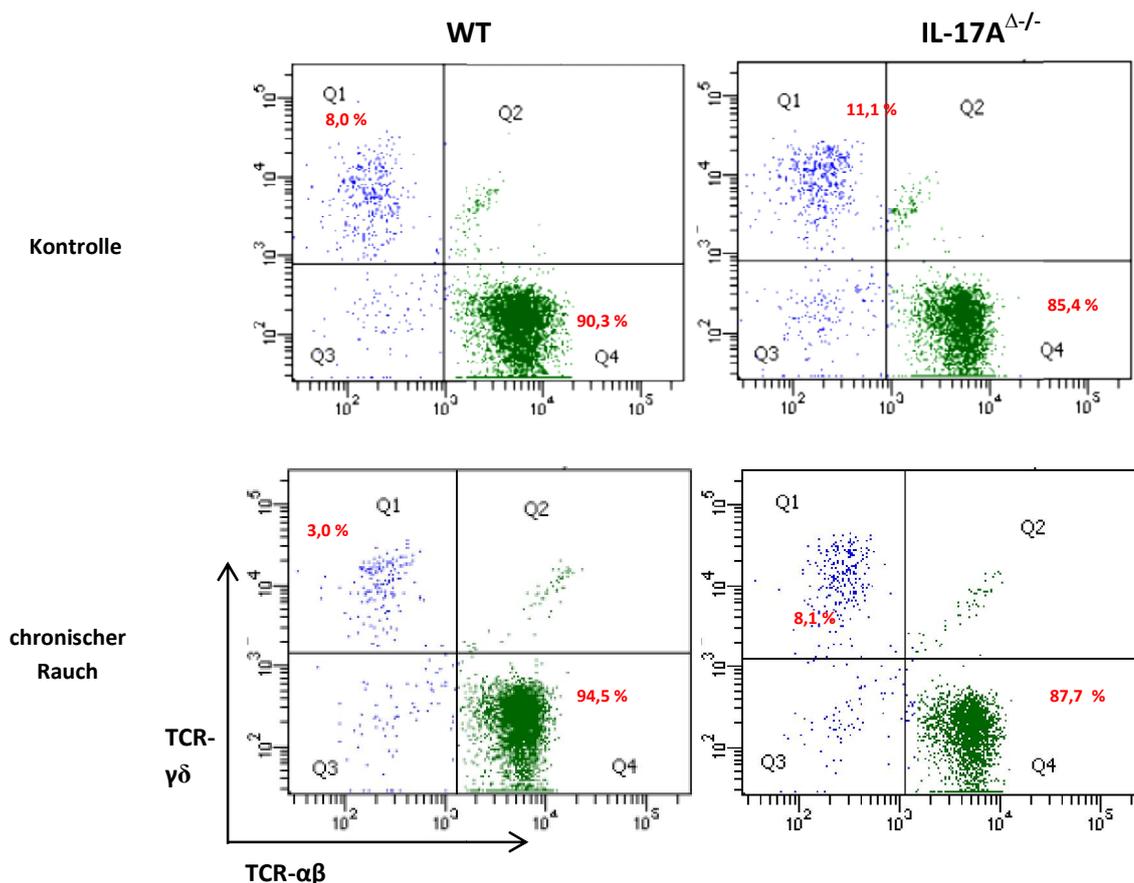


Abbildung 28: Repräsentative Dot Plots der prozentualen Anteile der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen (CD3-positive Zellen) in Einzelzellsuspensionen der Lungen von IL-17A-defizienten und WT Mäusen nach chronischer Rauchexposition. WT und IL-17A-defiziente Mäuse wurden 3 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. Anschließend wurden Einzelzellsuspensionen der Lungen hergestellt und Färbungen mit anti-CD45.2, -CD3, - $\alpha\beta$ -TCR und - $\gamma\delta$ -TCR Antikörpern durchgeführt. Mithilfe eines Durchfluss-Zytometers wurden die prozentualen Anteile der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen bestimmt.

Abbildung 29 zeigt, dass die IL-17A-Defizienz der Mäuse zu einem erhöhten prozentualen Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 29 A) und dementsprechend zu einem geringeren Anteil an $\alpha\beta$ T-Zellen (Abb. 29 B) in den Lungen führte. Durch Rauchexposition erhöhte sich der Anteil der $\alpha\beta$ T-Zellen bei den IL-17A-defizienten Mäusen und tendenziell verringerte sich der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen. Rauchexposition hatte bei den WT Mäusen keine Auswirkung auf den Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen.

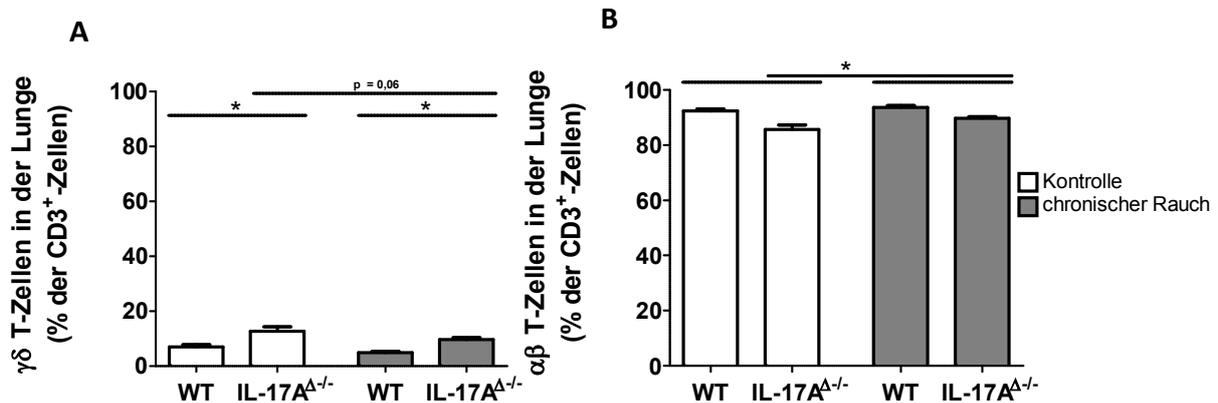


Abbildung 29: Prozentuale Anteile der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen (CD3-positive Zellen) in Einzelzellsuspensionen der Lungen von IL-17A-defizienten und WT Mäusen nach chronischer Rauchexposition. IL-17A-defiziente Mäuse wurden 3 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. Anschließend wurden Einzelzellsuspensionen der Lungen hergestellt und Färbungen mit anti-CD45.2, -CD3, - $\alpha\beta$ -TCR und - $\gamma\delta$ -TCR Antikörpern durchgeführt. Mithilfe eines Durchflusszytometers wurden die prozentualen Anteile der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen bestimmt. Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle WT n=4, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=4, Rauch WT n=4, Rauch IL-17A^{-/-} n=5), mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

IL-17A konnte sowohl bei IL-17A-defizienten Mäusen als auch bei WT Mäusen weder in der Lunge noch in der BALF mittels ELISA nachgewiesen werden. Um die rauchinduzierte Entzündung weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Zytokine und Chemokine im Lungenhomogenisat der Mäuse gemessen. Abbildung 30 zeigt die Konzentrationen von G-CSF und IL-1 α . Die Konzentrationen der Chemokine erhöhten sich in der Lunge durch chronische Rauchexposition sowohl bei den WT als auch bei den IL-17A-defizienten Mäusen signifikant, wenn auch auf niedrigem Niveau. Während bei der Konzentration von IL-1 α zwischen WT und IL-17A-defizienten Mäusen kein Unterschied bestand (Abb. 30 A), produzierten die IL-17A-defizienten Mäuse nach Rauchexposition signifikant weniger G-CSF in der Lunge (Abb. 30 B).

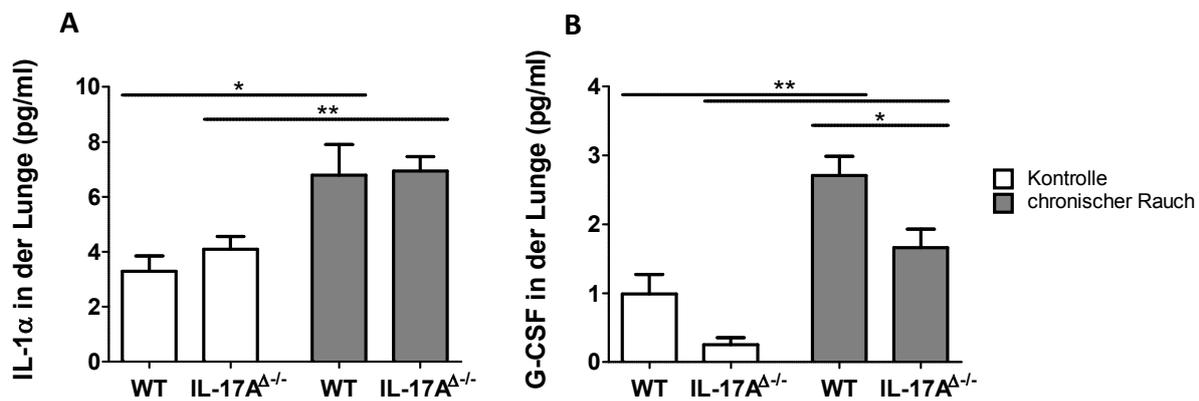


Abbildung 30: Konzentration der Chemokine IL-1 α und G-CSF in der Lunge von IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Nach 3 Monaten Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen der Chemokine bestimmt. Konzentration von A) IL-1 α und B) G-CSF. (Kontrolle WT n=7, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=7; Rauch WT n=7, Rauch IL-17A^{-/-} n=8). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Durch chronische Rauchexposition erhöhten sich ebenfalls sowohl bei WT als auch bei IL-17A-defizienten Mäusen die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β und IL-10 (Abb. 31 A und B). Die Konzentration von IL-1 β war nach Rauchexposition in den Lungen der IL-17A-defizienten Mäusen signifikant geringer als in denen der WT Mäuse (Abb. 31 A). Bei IL-10 bestand kein Unterschied zwischen den rauchexponierten Gruppen (Abb. 31 B).

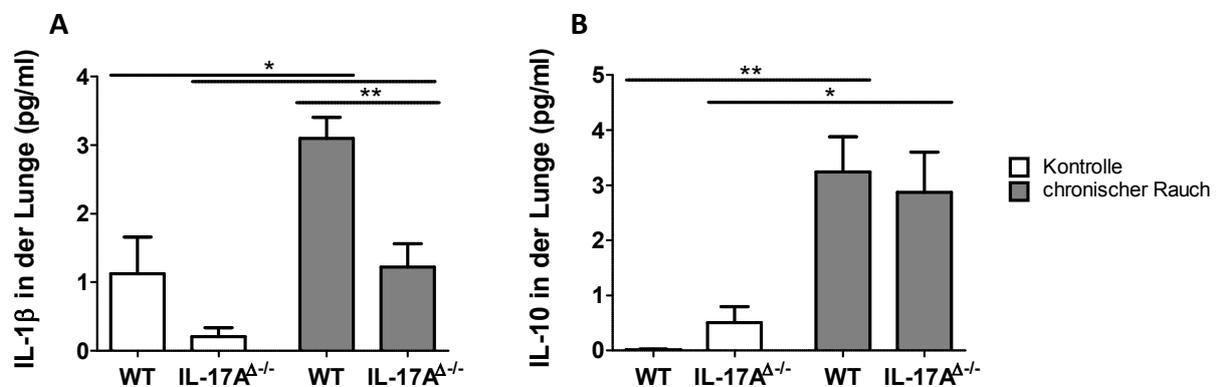


Abbildung 31: Konzentration der Zytokine IL-1 β und IL-10 in der Lunge von IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition. Nach 3 Monaten Rauchexposition und 24 Stunden nach der letzten Exposition wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen der Chemokine bestimmt. Konzentration von A) IL-1 β und B) IL-10. (Kontrolle WT n=7, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=7; Rauch WT n=7, Rauch IL-17A^{-/-} n=8). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Um zu untersuchen, ob das Fehlen von IL-17A einen Einfluss auf die Entstehung eines durch Rauch verursachten Lungenschadens hat, wurden IL-17A-defiziente und WT Mäuse 7 Monate lang Rauch ausgesetzt und anschließend eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Abbildung 32 zeigt die totale Lungenkapazität und die quasi-statische

compliance der WT und IL-17A-defizienten Mäuse nach 7 Monaten Rauch- bzw. Luftexposition. Der durch die chronische Rauchexposition entstandene Lungenschaden zeigte sich bei WT und IL-17A-defizienten Mäusen in einer Erhöhung der totalen Lungenkapazität und der quasi-statischen compliance (Abb. 32 A und B). Im Vergleich zu den WT Mäusen war die totale Lungenkapazität der IL-17A-knockout-Mäuse nach der Rauchexposition verringert (Abb. 32 A).

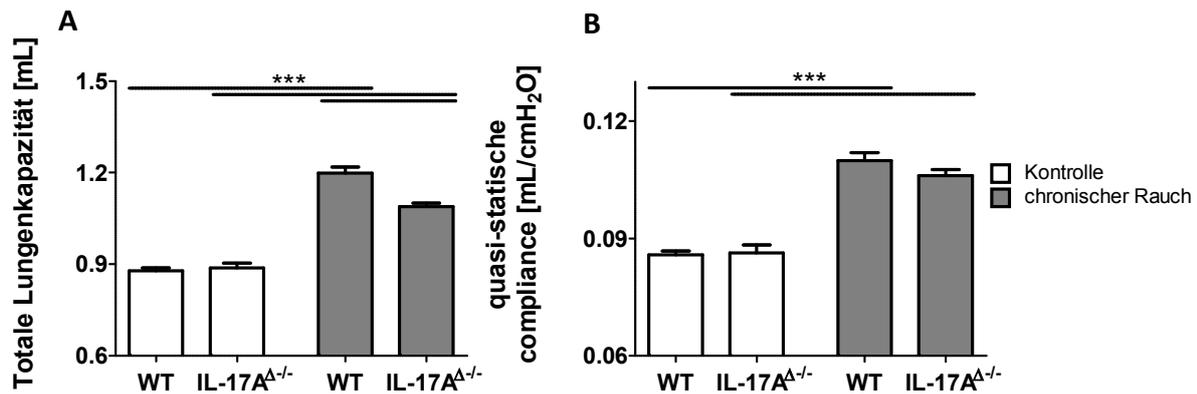


Abbildung 32: Lungenfunktionsmessung der IL-17A-defizienten Mäuse nach chronischem Rauch: Totale Lungenkapazität und quasi-statische compliance. Nach 7 Monaten Rauchexposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) Totale Lungenkapazität der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Pressure-Volume Loop (P-V Loop)-Messung. B) Quasi-statische compliance der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der P-V Loop-Messung (Kontrolle WT n=9, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=9, Rauch WT n=9, Rauch IL-17A^{-/-} n=8). Statistik: unpaired t-test, two-tailed, mean ± SEM (Signifikanzniveaus: ***p<0,001).

Bei der Messung des Wertes elastance zeigte sich, dass durch das Rauchen das Lungengewebe der WT Mäuse weniger steif wurde (Abb. 33 A). Außerdem verringerte sich durch die Rauchexposition die elastance des gesamten respiratorischen Systems bei WT Mäusen (Abb. 33 B). Die elastance des respiratorischen Systems der IL-17A-defizienten Mäuse nach Rauchen war im Vergleich zu den WT Mäusen verringert (Abb. 33 B).

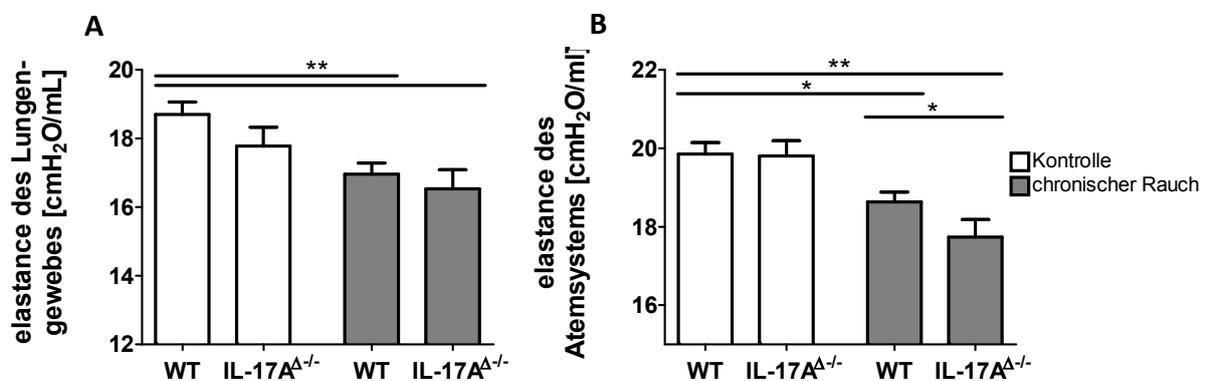


Abbildung 33: Lungenfunktionsmessung der IL-17A-defizienten Mäuse nach chronischem Rauch: elastance des Lungengewebes und compliance des gesamten Atemsystems. Nach 7 Monaten Rauchexposition wurde bei den Mäusen

mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) elastance des Lungengewebes der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung, die zwischen Gewebe und Atemwegen unterscheidet. B) elastance (elastance) des gesamten respiratorischen Systems der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Snapshot Messung (Kontrolle WT n=9, Kontrolle IL-17A^{Δ/-} n=9, Rauch WT n=9, Rauch IL-17A^{Δ/-} n=8). Statistik: unpaired t-test, two-tailed, mean ± SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Bei der weiteren Charakterisierung des Lungenschadens zeigten sich bei den Widerstandsmessungen der Atemwege und des Atemsystems kein Effekt durch das Rauchen und keine Unterschiede zwischen IL-17A-defizienten und WT Mäusen (Abb. 34 A und B). Der Wert tissue damping war allerdings bei den WT Mäusen, die chronischem Rauch ausgesetzt wurden, verringert im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die gleiche Tendenz bestand bei den IL-17A-defizienten Mäusen (Abb. 34 C).

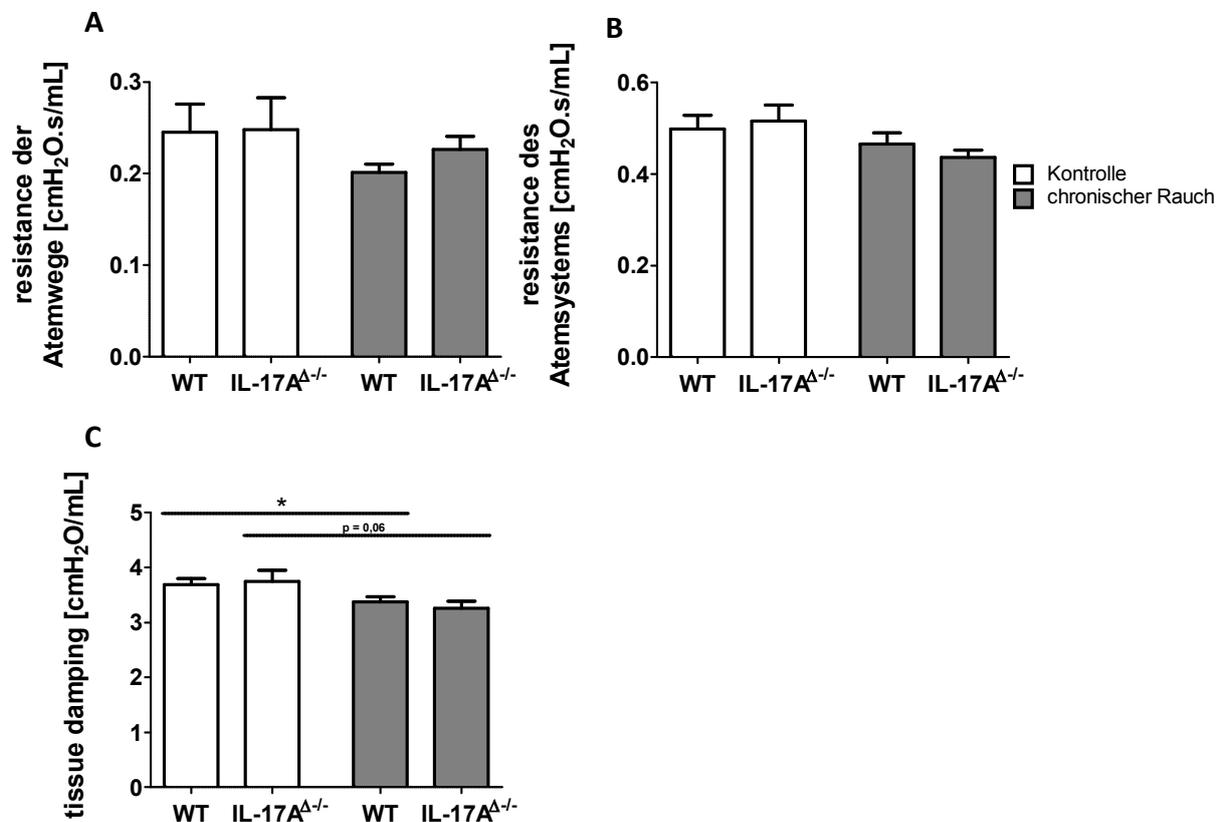


Abbildung 34: Lungenfunktionsmessung der IL-17A-defizienten Mäuse nach chronischem Rauch: Widerstand des Atemsystems, der Atemwege und des Gewebes. Nach 7 Monaten Rauchexposition wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. A) Widerstand der Atemwege der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung. B) Widerstand des gesamten respiratorischen Systems der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Snapshot-Messung. C) Widerstand des Lungengewebes der WT und IL-17A-defizienten Mäuse gemessen mithilfe der Quick-Prime 3 Messung (Kontrolle WT n=9, Kontrolle IL-17A^{Δ/-} n=9, Rauch WT n=9, Rauch IL-17A^{Δ/-} n=8). Statistik: unpaired t-test, two-tailed, mean ± SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05).

In der Stereologie zeigte sich der Gewebsschaden durch chronische Rauchexposition in einer Erhöhung des MCL-Wertes bei den WT Mäusen (Abb. 35 A). IL-17A-defiziente Mäuse hatten

schon im Grundzustand einen signifikant erhöhten MCL-Wert im Vergleich zu den WT Mäusen, nach Rauchexposition bestand eine Tendenz einer Erhöhung zu den luftexponierten IL-17A-defizienten Mäusen ($p = 0,11$) und eine signifikante Erhöhung zu den luftexponierten Kontrollmäusen. Der Anteil der Alveolen am Gesamtparenchym wurde durch Rauch sowohl bei den WT als auch bei den IL-17A-defizienten Mäusen signifikant geringer (Abb. 35 B). IL-17A-defiziente Mäuse zeigten allerdings schon ohne Rauchexposition einen signifikant verringerten Anteil an Alveolen im Vergleich zu WT Mäusen.

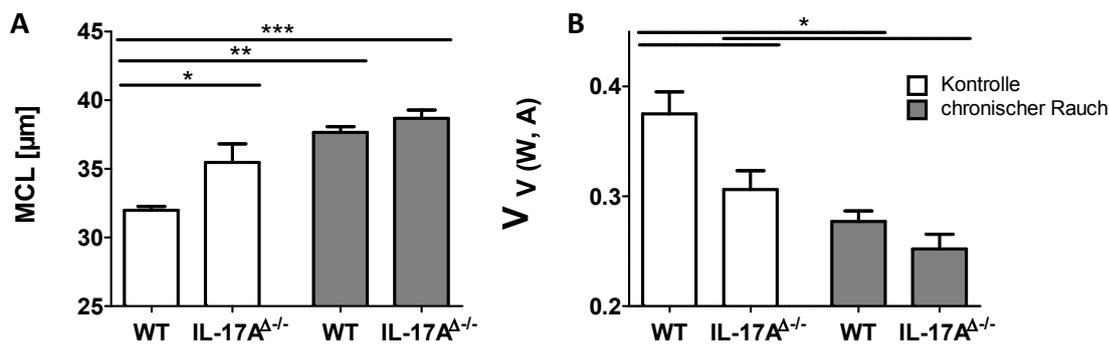


Abbildung 35: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens bei IL-17A-defizienten Mäusen. Nach 7 Monaten Rauchexposition wurden die Lungen der Mäuse in Paraffin eingebettet und Schnitte auf Objektträger mittels HE-Färbung ausgewertet. A) Messung des mean chord length (MCL), der mittleren freien Distanz innerhalb der Lufträume. B) Verhältnis von Alveolen zum Gesamtparenchym ($Vv(W, A)$) (Kontrolle WT $n=10$, Kontrolle IL-17A^{-/-} $n=9$, Rauch WT $n=4$, Rauch IL-17A^{-/-} $n=5$). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Durch die chronische Rauchexposition wurde der prozentuale Anteil an Alveolar-Luftraum bei den WT Mäusen signifikant erhöht (Abb. 36). IL-17A-defiziente Mäuse zeigten schon im Grundzustand einen signifikant höheren Anteil an Alveolar-Luftraum im Vergleich zu den WT Mäusen; dieser Effekt zeigte sich auch nach Rauchexposition im Vergleich zu den luftexponierten WT Mäusen.

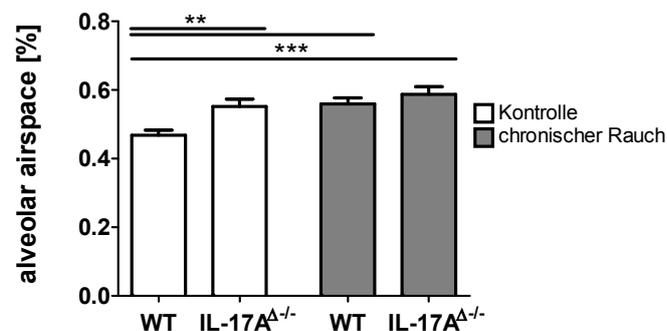


Abbildung 36: Stereologische Evaluation des durch chronische Rauchexposition entstandenen Lungenschadens bei IL-17A-defizienten Mäusen. Nach 7 Monaten Rauchexposition wurden die Lungen der Mäuse in Paraffin eingebettet und Schnitte

auf Objektträger mittels HE-Färbung ausgewertet. Bestimmung des prozentualen Anteils des alveolar airspace (Kontrolle WT n=10, Kontrolle IL-17A^{Δ/-} n=9, Rauch WT n=4, Rauch IL-17A^{Δ/-} n=5). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05, **p<0,01).

Tabelle 3 zeigt die morphometrischen Daten der rauchexponierten WT und IL-17A-defizienten Mäuse als relative Änderung (%) zu den luftexponierten Mäusen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Änderungen von der Baseline beim mean chord length, alveolar airspace und dem Verhältnis von Alveolen zum Gesamtparenchym zwischen rauchexponierten WT und rauchexponierten IL-17A-defizienten Mäusen.

Tabelle 3: Morphometrische Daten gezeigt als Änderung von der Baseline (% der luftexponierten Mäuse)

	Mean chord length	alveolar airspace	Verhältnis von Alveolen zum Gesamtparenchym
WT (Erhöhung mit Rauchexposition%)	18.09 (±1.32)	15,32 (±3.60)	-26,11 (±2.52)
*p	0.002	0.002	0.014
IL-17 ^{Δ/-} (Erhöhung mit Rauchexposition%)	14,46 (±1.76)	8,05 (±4.32)	-17,36 (±4.34)
*p	0.002	0.082	0.042
+p	0.19	0.28	0.28

*p-Werte, die die prozentuale Erhöhung der luftexponierten zu den rauchexponierten Mäusen vergleichen

+p-Werte, die die prozentuale Erhöhung von rauchexponierten WT Mäusen zur prozentualen Erhöhung von rauchexponierten IL-17A-defizienten Mäusen vergleichen

In der histologischen Untersuchung der Lungen (Abb. 37) zeigte sich bei den IL-17A-defizienten Mäusen bereits ohne Rauchexposition, dass die Alveolen im Vergleich zu denen der WT Mäuse vergrößert waren. Chronische Rauchexposition zeigte sich bei WT und 17A-defizienten Mäusen in vergrößerten Alveolen.

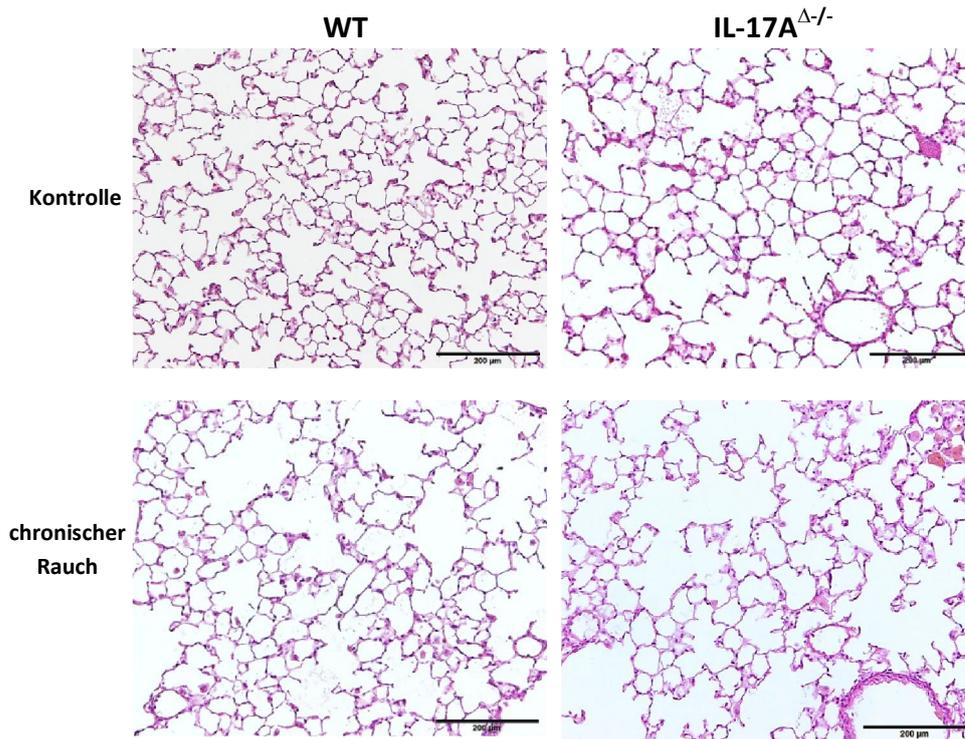


Abbildung 37: Histologie der Lungen der IL-17A-defizienten Mäuse nach 7 Monaten Rauch- bzw. RaumlufTEXposition. Die Lungen der Mäuse wurden nach 7 Monaten Rauch- bzw. RaumlufTEXposition in Paraffin eingebettet und in Schnitten auf Objektträger gebracht. Nach HE-Färbung der Schnitte wurde der Lungenschaden lichtmikroskopisch evaluiert.

Um zu untersuchen, ob IL-17A-Defizienz zu einer veränderten Expression von strukturellen Komponenten der Lunge führt, wurde die Expression von Collagen III und von Elastin in der gesamten Lunge untersucht. Die Collagen III Expression unterschied sich zwischen den Gruppen und nach der Rauchexposition nicht (Abb. 38 A). Die Elastin-Expression verringerte sich durch die Rauchexposition bei den WT Mäusen, bei den IL-17A-defizienten Mäusen war sie im Vergleich zu den WT Mäusen schon im Grundzustand signifikant erniedrigt (Abb. 38 B).

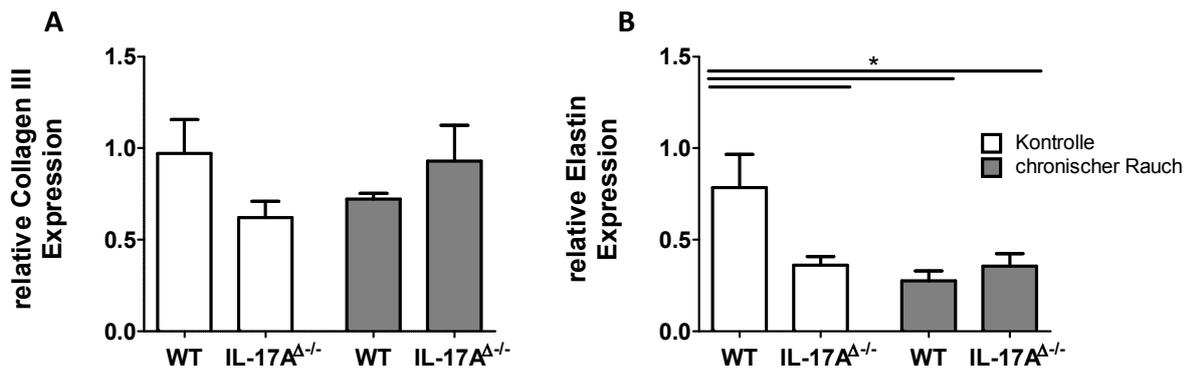


Abbildung 31: Relative Expression von Collagen III und Elastin nach 3 Monaten Rauchexposition in IL-17A-defizienten Mäusen. Nach 3 Monaten Rauchexposition wurde die Gesamt-RNA aus der ganzen Lunge isoliert und nach cDNA-Synthese mithilfe einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) die Expression von Collagen III und Elastin untersucht. A) Relative Expression von Collagen III normiert auf die WT Kontrollmäuse (Kontrolle WT n=7, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=9, Rauch WT n=6, Rauch IL-17A^{-/-} n=7). B) Relative Expression von Elastin normiert auf die WT Kontrollmäuse (Kontrolle WT n=5, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=7, Rauch WT n=6, Rauch IL-17A^{-/-} n=7). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

Bei der Elastin-Proteingehaltsbestimmung der Lungen zeigte sich, dass die verminderte Expression von Elastin der IL-17A-defizienten Mäuse in einem signifikant geringeren Elastin-Gehalt der Lunge resultierte (Abb. 39). Rauchexposition führte bei WT Mäusen zu einem geringeren Elastin-Gehalt der Lungen, bei IL-17A-defizienten Mäusen blieb der Elastin-Gehalt so gering wie im Grundzustand.

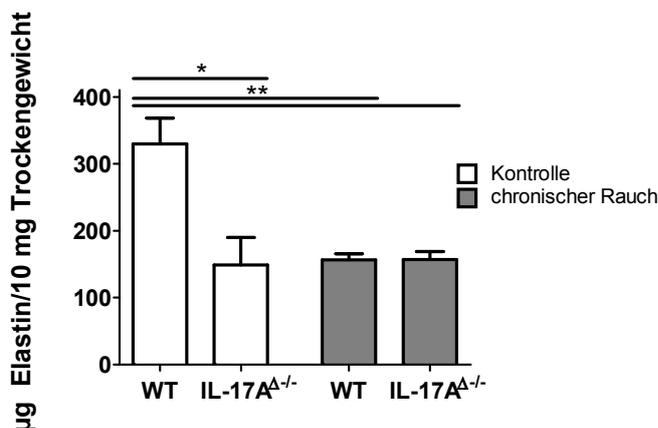


Abbildung 39: Elastin-Proteingehalt in der Lunge nach 3 Monaten Rauchexposition in IL-17A-defizienten Mäusen. Nach 3 Monaten Rauchexposition wurde die Proteinkonzentration von Elastin aus Lungenhomogenisat der Mäuse bestimmt (Kontrolle WT n=7, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=7, Rauch WT n=7, Rauch IL-17A^{-/-} n=9). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05, **p<0,01).

Studien zeigten, dass neutrophile Elastase und MMP12, aber nicht MMP9 für die Entwicklung eines rauchinduzierten Emphysems in Mäusen benötigt werden (Atkinson et al., 2011; Hautamaki et al., 1997; Shapiro et al., 2003). Des Weiteren führte die intranasale

Stimulation von Mäusen mit IL-17A zu erhöhten Konzentrationen von MMP9 in den Lungen der Mäuse (Prause et al., 2004). Es wurde deshalb die Aktivität von Elastase und MMP12 im Lungengewebe aus Mäusen, die 7 Monate Zigarettenrauch exponiert wurden, untersucht. Rauchexposition führte zu einer erhöhten Aktivität von MMP12 in WT Mäusen verglichen mit raumluftexponierten WT Mäusen, aber nicht in IL-17A-defizienten Mäusen (Abb. 40 A). Die Elastaseaktivität war in den Lungen der raumluftexponierten IL-17A-defizienten Mäuse erhöht (Abb. 40 B). IL-17A-Defizienz und Rauchexposition führten zu reduzierten Proteinkonzentrationen von MMP9. Die Proteinkonzentrationen von MMP9 waren in den Lungen der luft- und rauchexponierten IL-17A-defizienten Mäuse und in den Lungen der rauchexponierten WT Mäuse im Vergleich zu raumluftexponierten WT Mäusen verringert (Abb. 40 C).

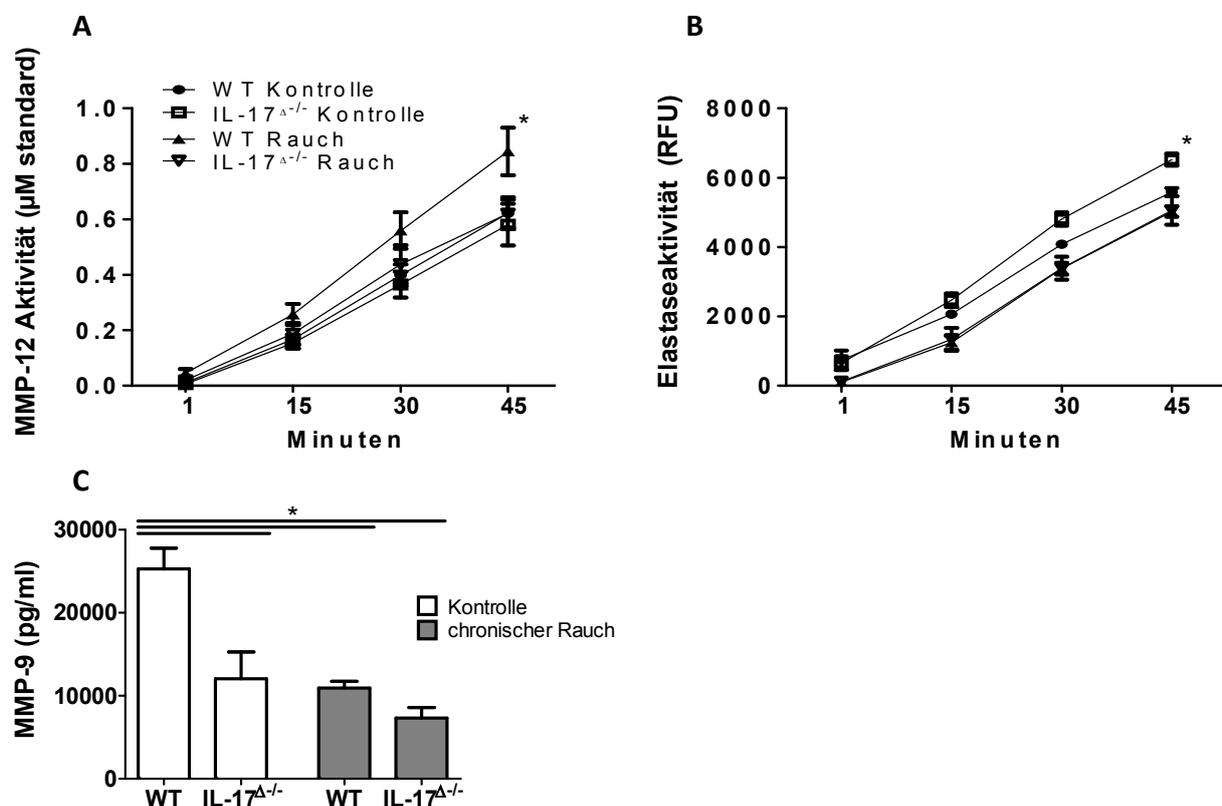


Abbildung 40: IL-17A-Defizienz wirkt sich auf Lungenelelastase, MMP12 und MMP9 aus. MMP12 und Elastaseaktivität und MMP9 Konzentrationen wurden in Lungengewebe von Mäusen gemessen, die 7 Monate Rauch oder Raumluft ausgesetzt waren. A) MMP12 Aktivität wurde mithilfe des Sensolyte 520 MMP12 assay kinetic read Kits bestimmt. B) Neutrophile Elastase wurde mithilfe des Molecular Probes' EnzChek Elastase Assays bestimmt. Statistik: 2way ANOVA, mean \pm SEM, (Signifikanzniveau: * $p < 0.05$ verglichen mit luftexponierten WT Mäusen, $n \geq 4$ pro Gruppe. C) MMP9 Konzentrationen wurden mithilfe eines ELISAs bestimmt. Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, $n \geq 4$ pro Gruppe).

Um zu demonstrieren, dass IL-17A nach Rauchexposition nur in Kombination mit bakterieller Stimulation produziert wird, wurden IL-17A-defiziente und WT Mäuse 5 Monate lang chronischem Rauch ausgesetzt und im 6. Monat zusätzlich zur Rauchexposition einmal pro Woche mit Lysat von NTHi vernebelt. Im Differenzialzellbild der BALF wurde die Stimulation durch die Bakterien-Lysate durch den enormen Einstrom von neutrophilen Granulozyten deutlich (Abb. 41 B). IL-17A-defiziente Mäuse hatten nach Rauchexposition und bakterieller Stimulation weniger neutrophile Granulozyten in der BALF als die WT Mäuse nach Rauchexposition und als die IL-17A-defizienten Mäuse im Grundzustand (Abb. 41 B). Sowohl bei Makrophagen als auch bei Lymphozyten bestand zwischen den Gruppen kein Unterschied (Abb. 41 A und C).

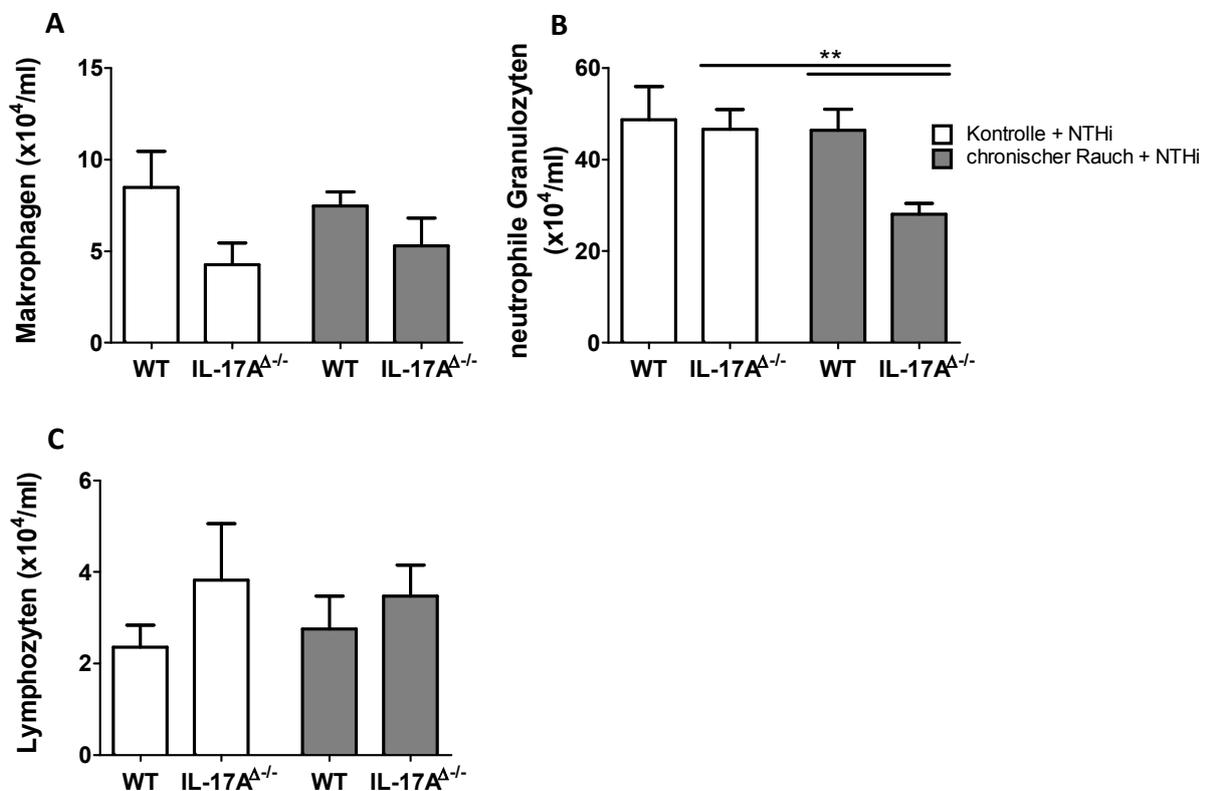


Abbildung 41: Leukozyten in der BALF von IL-17A-knockout Mäusen nach 6 Monaten Rauch und NTHi Verneblung. Mäuse, die defizient für IL-17A sind, wurden 6 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. Im letzten Rauchmonat wurden die Mäuse zusätzlich einmal pro Woche mit NTHi-Lysaten vernebelt. Die Lungen der Mäuse wurden lavagiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) bis C) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF (Zellen/ml). (Kontrolle WT n=6, Kontrolle IL-17A^{-/-} n=4, Rauch WT n=6, Rauch IL-17A^{-/-} n=6), Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveaus: **p<0,01).

In der Lungenfunktion war der Effekt der Rauchexposition nicht mehr erkennbar, die totale Lungenkapazität erhöhte sich nicht (Abb. 42). Bei starker Entzündung und eventueller Ödembildung scheint die Lungenfunktion verfälscht zu sein.

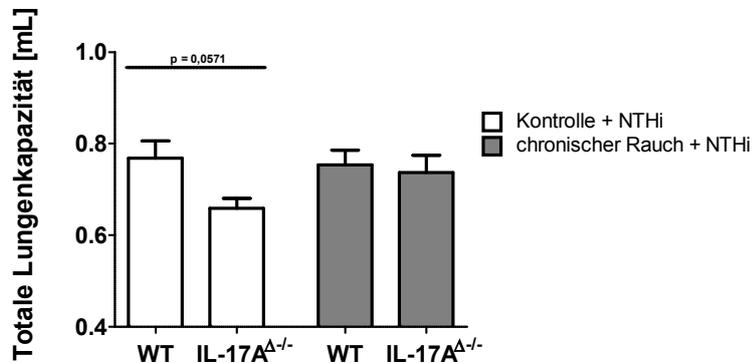


Abbildung 42: Lungenfunktionsmessung zur Bestimmung der totalen Lungenkapazität der IL-17A-defizienten Mäusenach 6 Monaten Rauch und non-typeable Haemophilus influenzae (NTHi) Verneblung. Mäuse, die defizient für IL-17A sind, wurden 6 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. Im letzten Rauchmonat wurden die Mäuse zusätzlich einmal pro Woche mit NTHi-Lysaten vernebelt. Es wurde bei den Mäusen mithilfe des FlexiVent Systems eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt (Kontrolle WT n=4, Kontrolle IL-17A^{Δ-/-} n=4, Rauch WT n=6, Rauch IL-17A^{Δ-/-} n=6). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM).

In der BALF war IL-17A bei den WT Mäusen sowohl im Grundzustand mit NTHi-Verneblung als auch nach chronischer Rauchexposition mit NTHi-Verneblung nachweisbar, wobei Rauch tendenziell zu einer Erhöhung der IL-17A-Ausschüttung führte (Abb. 43).

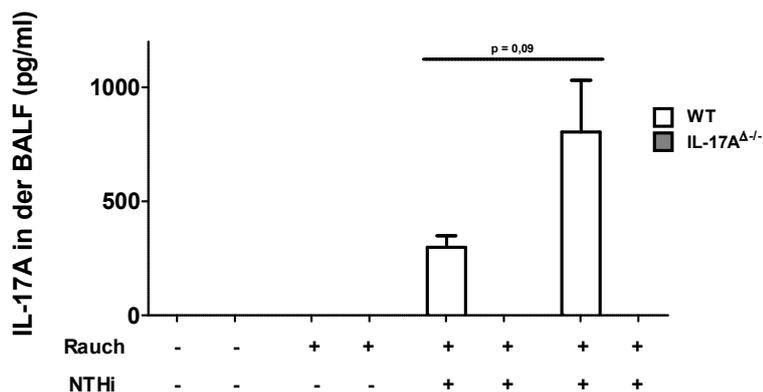


Abbildung 43: Konzentration des Zytokins Interleukin-17A (IL-17A) in der BALF von IL-17A-defizienten Mäusen nach chronischer Rauchexposition und viermaliger Verneblung mit NTHi. Mäuse, die defizient für IL-17A sind, wurden 6 Monate chronischem Rauch ausgesetzt. Im letzten Rauchmonat wurden die Mäuse zusätzlich einmal pro Woche mit NTHi-Lysaten vernebelt. Die Konzentration von IL-17A in der BALF wurde im ELISA bestimmt (Kontrolle WT n=4, Kontrolle IL-17A^{Δ-/-} n=4, Rauch WT n=6, Rauch IL-17A^{Δ-/-} n=6). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean ±SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-17A in unserem Modell der sterilen Rauchexposition zur normalen Lungenhomöostase beiträgt und den rauchinduzierten Verlust an Lungenstruktur und Lungenfunktion nicht vermittelt.

4.3. Bakteriell Kolonisierungsmodell der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* 6A und non-typeable *H. influenzae* nach chronischer Rauchexposition

Mit dem Modell der chronischen Rauchexposition mit anschließender nasopharyngealen Kolonisierung wurde untersucht, ob Rauch zu erhöhter bakterieller Kolonisierung und vermehrter Translokation der Bakterien von den oberen Atemwegen in die Lunge führt. Dies ist z.B. bei COPD von klinischer Bedeutung (Sethi, 2000). Dafür wurden Mäuse (C57BL/6N) 3 oder 7 Monate lang Rauch ausgesetzt. 24 Stunden nach der letzten Rauchexposition wurden die oberen Atemwege infiziert. Es wurden Patientenisolate der Bakterien *S. pneumoniae* (Stamm 6A) und *H.influenzae* (NTHi) genutzt, da diese die wichtigsten Bakterien bei Exazerbationen der COPD sind. Zudem haben Raucher und Kinder, die passivrauchen, ein erhöhtes Risiko an invasiven Infektionen mit diesen Bakterien zu erkranken (Huttunen et al., 2011).

4.3.1. Kolonisierung der oberen Atemwege mit non-typeable *H. influenzae* (NTHi) nach 3 und 7 Monaten Rauchexposition

Abbildung 44 zeigt die bakterielle Last in den oberen Atemwegen der Mäuse nach 24 Stunden Kolonisierung mit NTHi. Es zeigte sich eine signifikant höhere bakterielle Last in den oberen Atemwegen der Mäuse, die chronisch Rauch ausgesetzt wurden (Abb. 44 A und B).

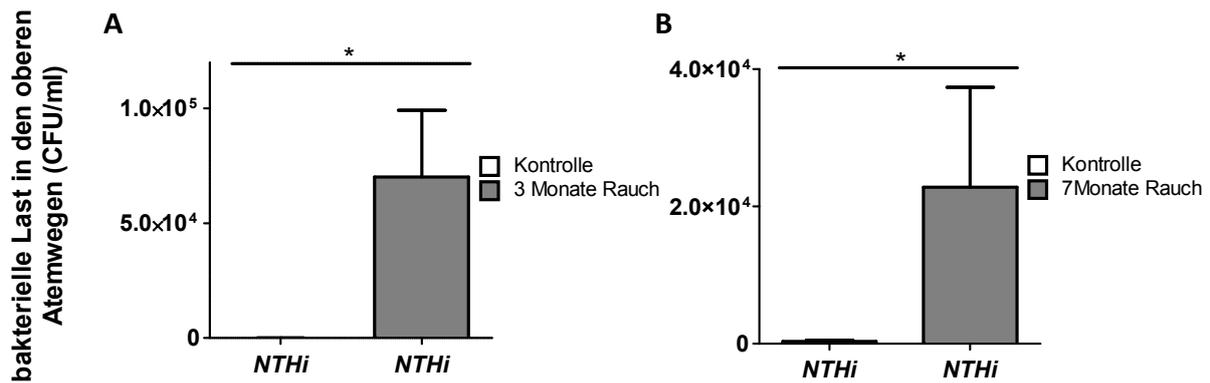
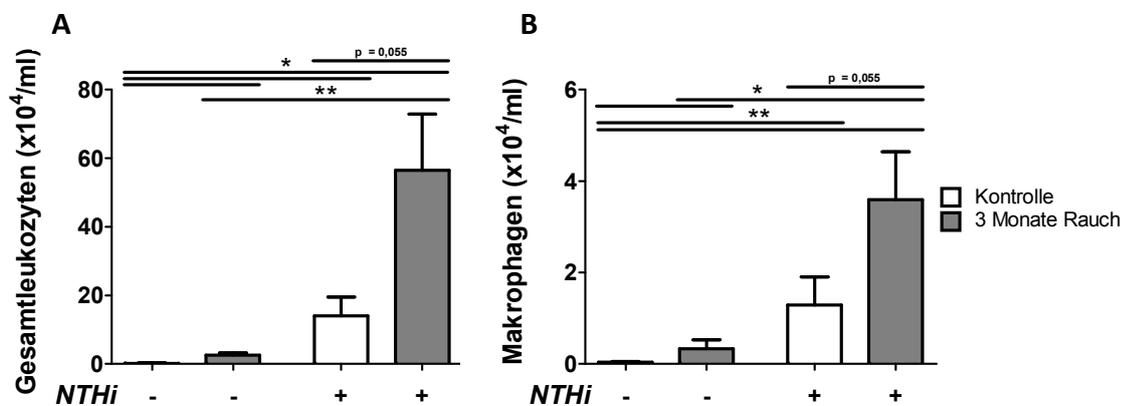


Abbildung 44: Bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege nach Infektion der oberen Atemwege mit non-typeable *H. influenzae* (NTHi). Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 oder 7 Monaten Rauch- oder Raumlufteexposition mit NTHi infiziert. Die Lavage der oberen Atemwege wurde nach 24 Stunden auf Kochblutagarplatten ausplattiert, um die bakterielle Last (CFU, colony forming units) zu bestimmen. A) Bakterielle Last in der Lavage der oberen Atemwege der Mäuse nach 24 Stunden NTHi Infektion ($5,5 \times 10^6$ CFU/10 μ l) und 3 Monaten Rauchexposition (Kontrolle n=5, Rauch n=5). B) Bakterielle Last in der Lavage der oberen Atemwege der Mäuse nach 24 Stunden NTHi Infektion ($7,1 \times 10^7$ CFU/10 μ l) und 7 Monaten Rauchexposition (Kontrolle n=10, Rauch n=10). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

In der Lunge waren weder nach 3 monatiger Rauchexposition noch nach 7 monatiger Rauchexposition NTHi im Lungenhomogenisat nachweisbar.

Rauchexposition, Infektion und Rauchexposition mit folgender Infektion führte in den oberen Atemwegen zu einem signifikanten Anstieg an Gesamtleukozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 45 A bis C). Zudem wiesen Mäuse, die nach Rauchexposition infiziert wurden, in den oberen Atemwegen signifikant mehr Gesamtleukozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyte auf als rauchexponierte Mäuse, die nicht infiziert wurden. Lymphozyten waren nur bei rauchexponierten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 45 D).



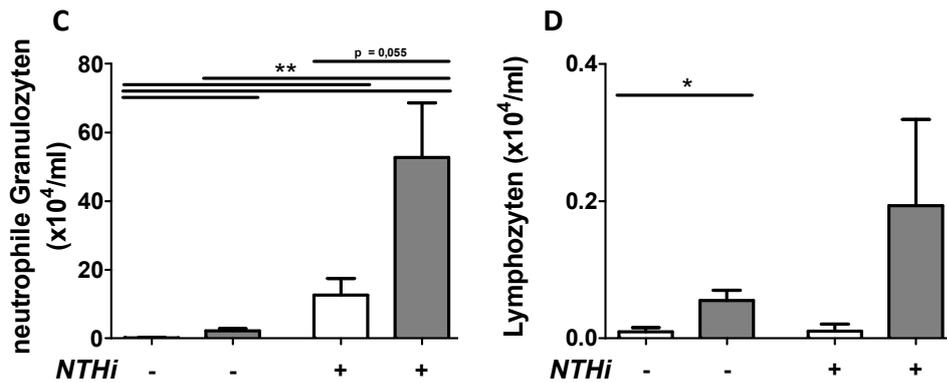


Abbildung 45: Leukozyten in der Lavage der oberen Atemwege nach Infektion der oberen Atemwege mit non-typeable *H. influenzae* (NTHi). Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder Raumluftexposition mit NTHi ($5,5 \times 10^6$ CFU/10 μ l) infiziert. Nach 24 Stunden wurden die oberen Atemwege der Mäuse lavagiert und die Zellzahlen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozytenzahl in der Lavage der oberen Atemwege ($\times 10^4$ /ml). B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Lavage der oberen Atemwege ($\times 10^4$ /ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrollenicht infiziert n=5, Rauch nicht infiziert n=5, Kontrolle infiziert n=5; Rauch infiziert n=5), mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Um die Entzündung in den oberen Atemwegen weiter zu charakterisieren, wurden die Konzentrationen von KC, RANTES und IL-6 in den oberen Atemwegen gemessen. Die Konzentrationen von KC und IL-6 waren im Vergleich zu Kontrollmäusen nur in den oberen Atemwegen von rauchexponierten Mäusen, die mit NTHi infiziert wurden, signifikant erhöht (Abb. 46 A und B). KC war darüber hinaus in den oberen Atemwegen von rauchexponierten und anschließend mit NTHi infizierten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die nur mit NTHi infiziert wurden, signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen sezernierten rauchexponierte Mäuse und rauchexponierte Mäuse, die mit NTHi infiziert wurden, signifikant mehr RANTES (Abb. 46 C) in den oberen Atemwegen. RANTES war darüber hinaus in den oberen Atemwegen von rauchexponierten und anschließend mit NTHi infizierten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die nur mit NTHi infiziert wurden, signifikant erhöht. Die verstärkte Entzündung der oberen Atemwege von rauchexponierten und mit NTHi infizierten Mäusen assoziiert mit den erhöhten Zahlen von neutrophilen Granulozyten im Differenzialzellbild der oberen Atemwege (Abb. 45 B).

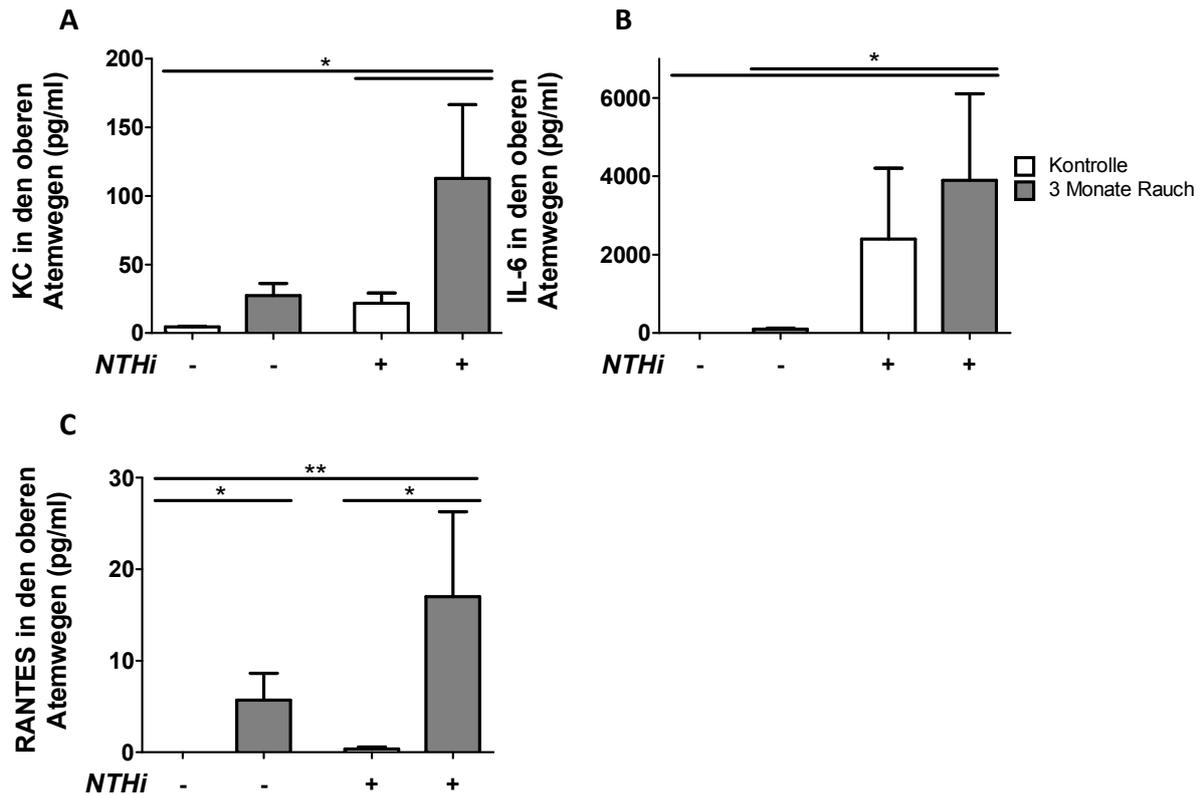


Abbildung 46: Konzentration der Chemokine KC und RANTES und des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der Lavage der oberen Atemwege nach Infektion der oberen Atemwege mit NTHi. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition mit NTHi ($5,5 \times 10^6$ CFU/10 μ l) infiziert. Nach 24 Stunden wurden die oberen Atemwege der Mäuse lavagiert und die Konzentrationen von KC IL-6 und RANTES gemessen. Konzentration von A) KC., B) IL-6, Und C) RANTES in den oberen Atemwegen. (Kontrolle nicht infiziert n=5, Rauch nicht infiziert n=5, Kontrolle infiziert n=5, Rauch infiziert n=5) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05).

Da die NTHi-Bakterien trotz stärkerer Entzündung in den oberen Atemwegen der Rauchmäuse besser kolonisieren und überleben konnten, stellt sich die Frage, ob die antimikrobielle Abwehr der Rauchmäuse gestört ist. Dazu wurde die Expression von Lysozym M, mouse β Defensin-1 (mBD-1) und, als Kontrolle der verstärkten Entzündung, MIP-2 in den oberen Atemwegen nach NTHi-Infektion gemessen. Bei mBD-1 gab es eine starke Tendenz dahingehend, dass die Rauchmäuse weniger mBD-1 als Antwort auf die Infektion in den oberen Atemwegen im Vergleich zu den Kontrollmäusen exprimierten (Abb. 47 A). Die Lysozym M Expression in den oberen Atemwegen unterschied sich bei den Gruppen nicht (Abb. 47 B). Im Gegensatz dazu war die Expression des Chemokins MIP-2 in den oberen Atemwegen der Rauchmäuse tendenziell erhöht (Abb. 47 C).

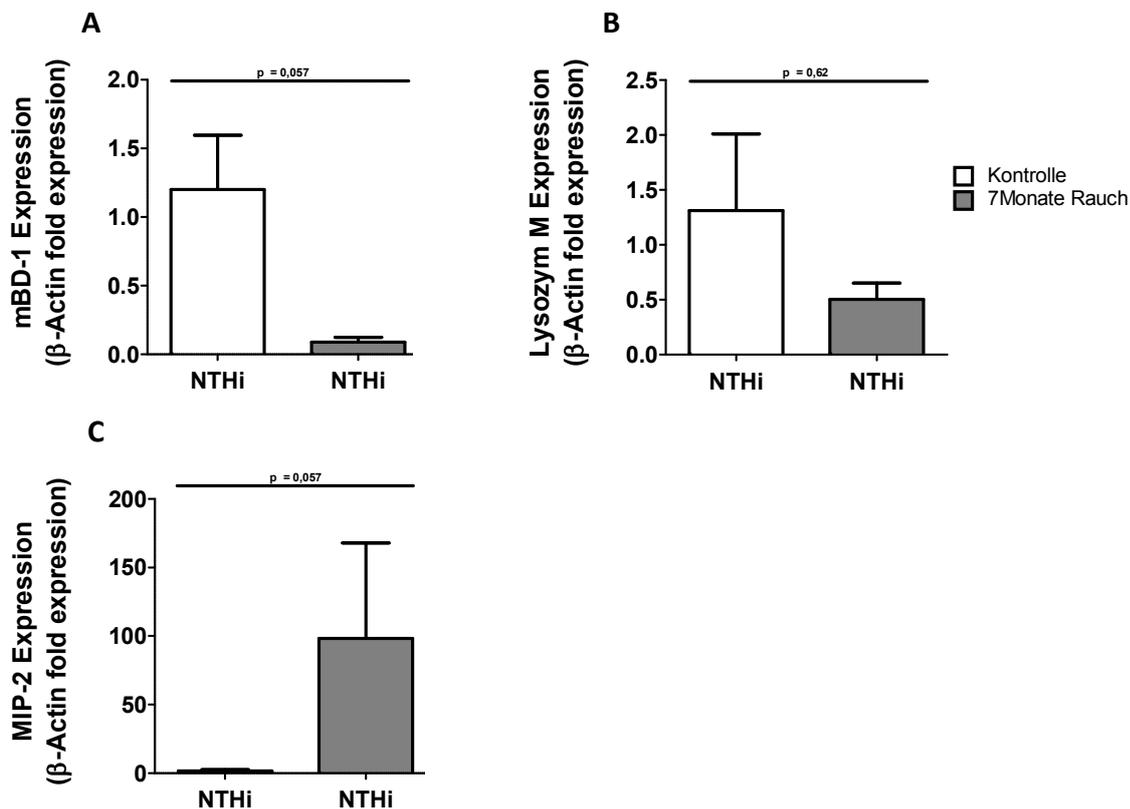


Abbildung 47: Expression von mouse β Defensin-1 (mBD-1), Lysozym M und MIP-2 in den oberen Atemwegen der Mäuse nach 7 Monaten Rauch und 24 Stunden NTHi Infektion der oberen Atemwege. Nach 7 Monaten Rauch- oder Raumluftexposition wurden die oberen Atemwege der Mäuse für 24 Stunden mit NTHi infiziert. Die oberen Atemwege wurden lavagiert. Anschließend wurde mithilfe von Lyspuffer die RNA aus den oberen Atemwegen durch erneutes Lavagieren isoliert. Nach cDNA-Synthese wurde mithilfe einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) die Expression von mBD-1, Lysozym M und MIP-2 gemessen und auf β -Actin normiert. A) Expression von mBD-1 (Kontrolle infiziert n=4, Rauch infiziert n=3). B) Expression von Lysozym M (Kontrolle infiziert n=3, Rauch infiziert n=4). C) Expression von MIP-2 (Kontrolle infiziert n=4, Rauch infiziert n=4). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM.

Rauchexposition führte zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtleukozyten und der Makrophagen in der BALF (Abb. 48 A und B). Obwohl in den Lungen der Mäuse 24 Stunden nach der Kolonisierung keine NTHi nachweisbar waren, wirkte sich die Infektion auf die Entzündungszellen in der Lunge aus. In den BALFs von raumluftexponierten Mäusen konnten nach 24 Stunden NTHi-Infektion der oberen Atemwege erhöhte Zellzahlen gemessen werden (Abb. 48 A). Diese Zellen bestanden zum größten Teil aus Makrophagen (Abb. 48 B). Die Gesamtzellzahl und die Anzahl der Makrophagen erhöhten sich durch die Infektion auch bei den rauchexponierten Mäusen. Die Anzahl an Gesamtleukozyten und Makrophagen war bei rauchexponierten Mäusen nach NTHi Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten rauchexponierten Mäusen und NTHi infizierten raumluftexponierten Mäusen signifikant erhöht. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten änderte sich durch die Infektion und Rauchexposition nicht (Abb. 48 C und D).

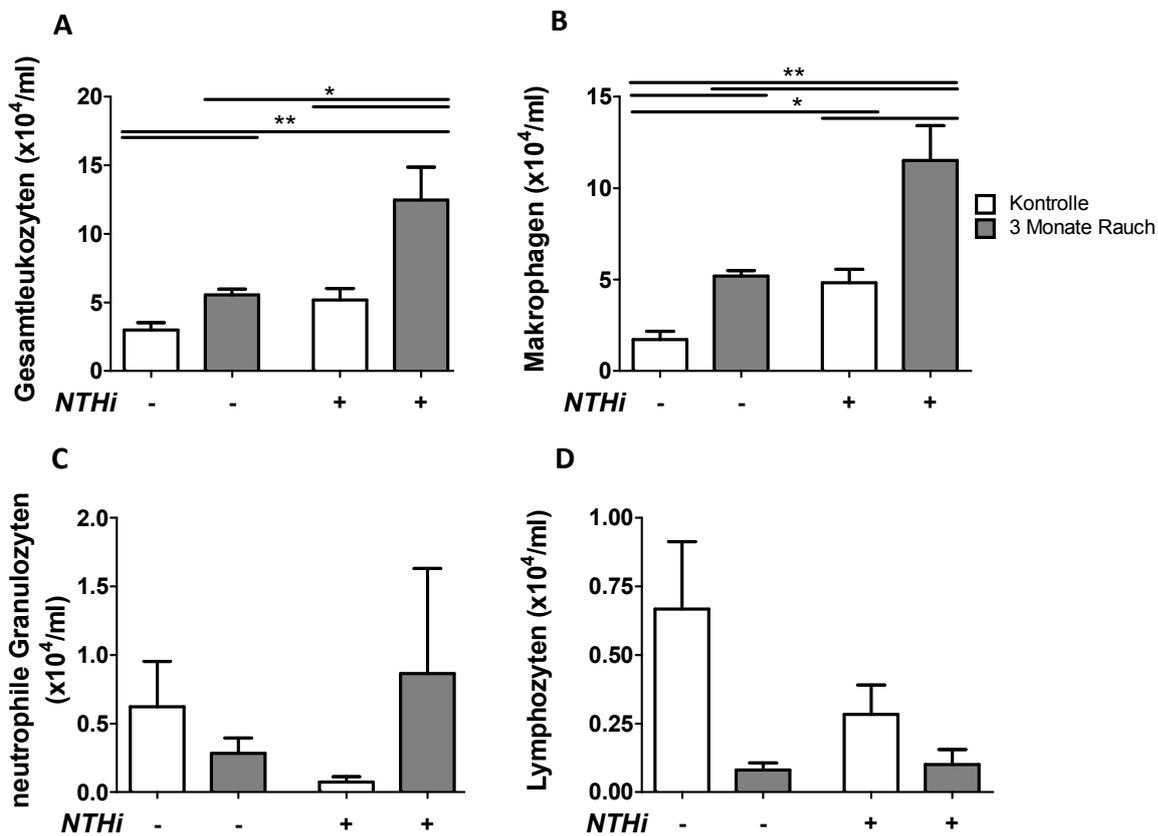


Abbildung 48: Leukozyten in der BALF nach Infektion der oberen Atemwege mit non-typeable *H. influenzae* (NTHi). Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition mit NTHi ($5,5 \times 10^6$ CFU/10 μl) infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahlen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozytenzahl in der BALF ($\times 10^4/\text{ml}$). B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF ($\times 10^4/\text{ml}$). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrollen nicht infiziert $n=5$, Rauch nicht infiziert $n=5$, Kontrolle infiziert $n=5$; Rauch infiziert $n=5$), mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Um die Funktionalität von Alveolarmakrophagen aus rauchexponierten Mäusen zu überprüfen, wurden die Alveolarmakrophagen *ex vivo* mit NTHi für 4 Stunden infiziert und anschließend die Konzentration des Chemokins KC gemessen. Abbildung 49 zeigt deutlich, dass kein Defekt in der Ausschüttung von KC bei den Makrophagen aus rauchexponierten Mäusen bestand.

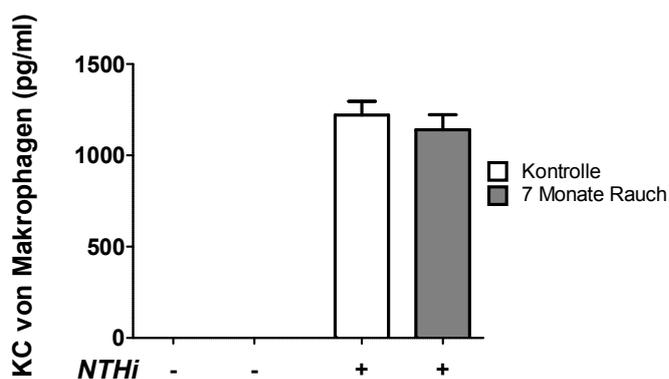


Abbildung 49: Konzentration des Chemokins KC nach ex vivo Infektion von Alveolarmakrophagen nach chronischem Rauch. Die Lunge der Mäuse wurde nach 7 Monaten Rauch- oder Raumluftexposition lavagiert und die Alveolarmakrophagen für 4 Stunden mit NTHi infiziert. Die Konzentration von KC wurde bestimmt. (Kontrollen nicht infiziert n=3, Rauch nicht infiziert n=4, Kontrolle infiziert n=7, Rauch infiziert n=8) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM.

4.3.2. Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* nach 3 und 7 Monaten Rauchexposition

Abbildung 50 zeigt die Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* (*S.p.*) 6A nach 3 (Abb. 50 A) und 7 (Abb. 50 B) Monaten Rauchexposition. Die Mäuse, die chronischem Rauch ausgesetzt wurden, waren in den oberen Atemwegen sowohl nach 3 als auch nach 7 Monaten signifikant stärker kolonisiert als die Kontrollmäuse (Abb. 50).

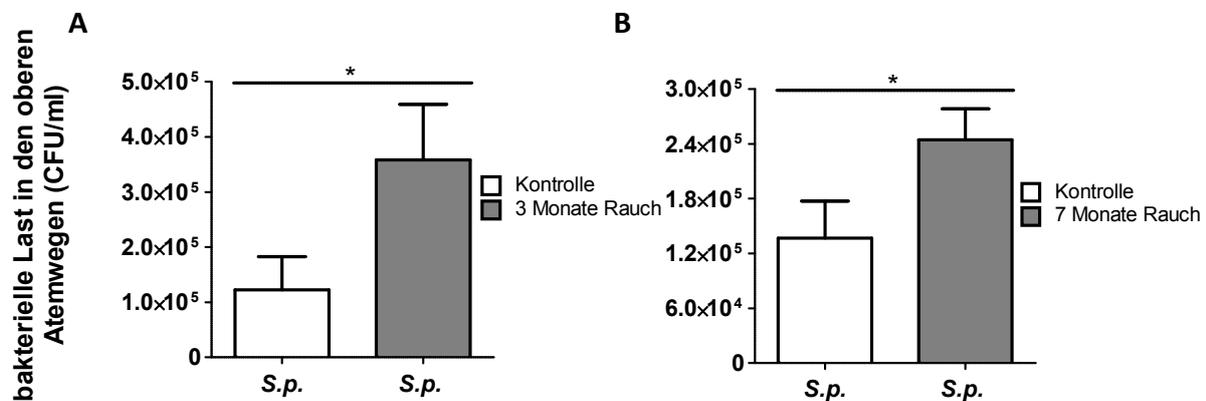


Abbildung 50: Bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* (*S.p.*) 6A. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 oder 7 Monaten Rauch- oder Raumluftexposition mit *S.p.* 6A kolonisiert und nach 4 oder 7 Tagen lavagiert. Die Lavage wurde auf Blutagarplatten ausplattiert, um die bakterielle Last (CFU, colony forming units) zu bestimmen. A) Bakterielle Last in den oberen Atemwegen der Mäuse nach 3 Monaten Rauchexposition und 4 Tagen *S.p.* 6A Kolonisierung ($1,55 \times 10^7$ CFU/10 μ l) (Kontrolle n=10, Rauch n=9). B) Bakterielle Last in den oberen Atemwegen der Mäuse nach 7 Monaten Rauchexposition und 7 Tagen *S.p.* 6A Kolonisierung ($2,5 \times 10^7$ CFU/10 μ l) (Kontrolle n=5, Rauch n=7). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

Eine deutliche Translokation der Bakterien von den oberen Atemwegen in die Lungen der rauchexponierten Mäuse war erkennbar (Abb. 51). Wobei der Unterschied nach 3 Monaten Rauchexposition im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant war (Abb. 51 A).

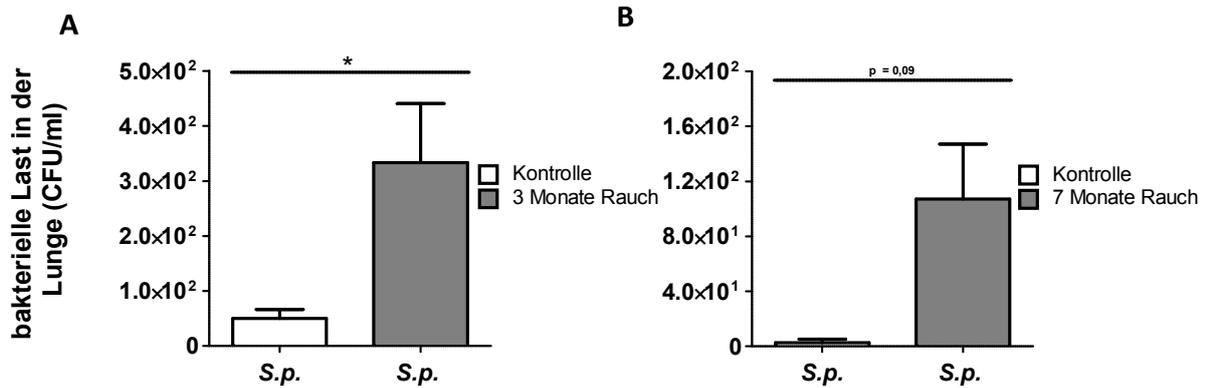


Abbildung 51: Bakterielle Last in der Lunge nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* (*S.p.*) 6A nach chronischer Rauchexposition. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 oder 7 Monaten Rauch- oder Raumluftexposition mit *S.p.* 6A kolonisiert und die Lunge wurde nach 4 oder 7 Tagen homogenisiert und auf Blutagarplatten ausplattiert, um die bakterielle Last (CFU, colony forming units) zu bestimmen. A) Bakterielle Last in der Lunge der Mäuse nach 3 Monaten Rauchexposition und 4 Tagen *S.p.* 6A Kolonisierung ($1,55 \times 10^7$ CFU/10 μ l) (Kontrolle n=10, Rauch n=9). B) Bakterielle Last in der Lunge der Mäuse nach 7 Monaten Rauchexposition und 4 Tagen *S.p.* 6A Kolonisierung ($2,5 \times 10^7$ CFU/10 μ l) (Kontrolle n=5, Rauch n=7). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: * $p < 0,05$).

Die Gesamtleukozytenzahl und die Anzahl der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in den oberen Atemwegen waren nach Infektion bei den rauchexponierten Mäusen höher als bei den Kontrollmäusen, jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 52 A). In der Lavage der oberen Atemwege befanden sich nach 3 Monaten Rauch und 4 Tagen *S. pneumoniae* Kolonisierung vor allem neutrophile Granulozyten (Abb. 52 C).

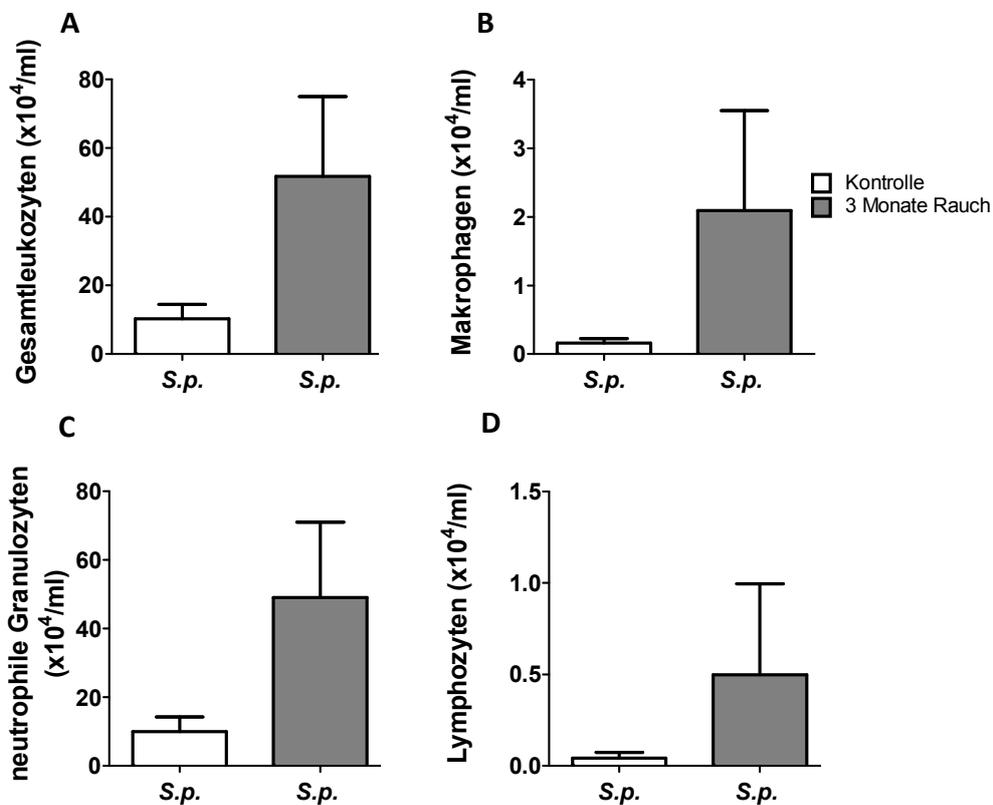


Abbildung 52: Leukozyten in der Lavage der oberen Atemwege nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) 6A. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition mit S.p. 6A ($1,55 \times 10^7$ CFU/10 μ l) kolonisiert. Nach 4 Tagen wurden die oberen Atemwege der Mäuse lavagiert und die Zellzahlen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozytenzahl in der Lavage der oberen Atemwege ($\times 10^4$ /ml). B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Lavage der oberen Atemwege ($\times 10^4$ /ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle infiziert n=5; Rauch infiziert n=4), mean \pm SEM.

Nach der Infektion waren die Konzentrationen von KC und IL-6 in den oberen Atemwegen der rauchexponierten Mäuse verglichen mit luftexponierten Mäusen nicht signifikant erhöht (Abb. 53 A und B).

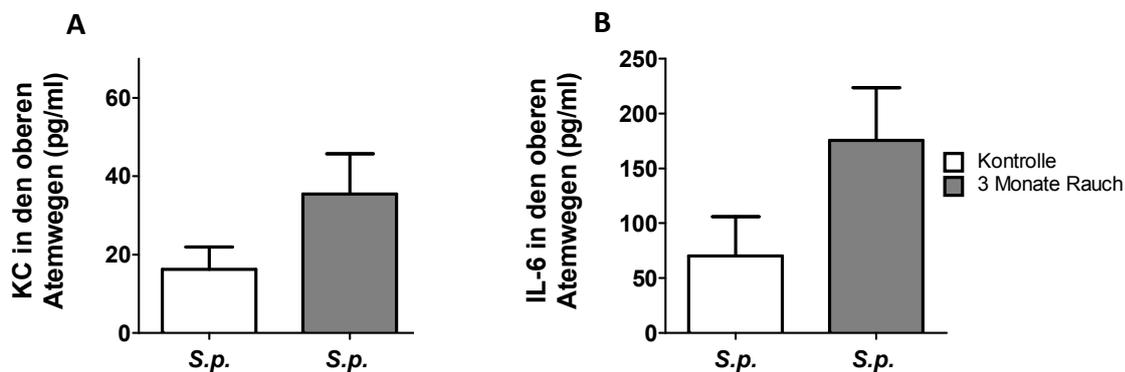


Abbildung 53: Konzentration von KC und IL-6 in der Lavage der oberen Atemwege nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* (S.p.) 6A. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition mit S.p. 6A ($1,55 \times 10^7$ CFU/10 μ l) kolonisiert. Nach 4 Tagen wurden die oberen Atemwege der Mäuse lavagiert und die Konzentrationen von KC und IL-6 gemessen. Konzentration von A) KC und B) von IL-6 in den oberen Atemwegen. (Kontrolle infiziert n=10, Rauch infiziert n=9) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM.

Die Expression von MIP-2, Lysozym M und mBD-1 in den oberen Atemwegen unterschied sich nach Infektion der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* und 7 Monaten Rauchexposition zwischen beiden Gruppen nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Anzahl der Gesamtleukozytenzahl und Makrophagen war in der BALF von rauchexponierten *S. pneumoniae* infizierten Mäusen im Vergleich zu raumlufTEXponierten *S. pneumoniae* signifikant erhöht (Abb. 54 A und B). Verglichen mit raumlufTEXponierten Mäusen war die Anzahl neutrophiler Granulozyten bei rauchexponierten Mäusen nach *S. pneumoniae* tendenziell (Abb. 54 B) und die Anzahl an Lymphozyten (Abb. 54 D) signifikant vermindert.

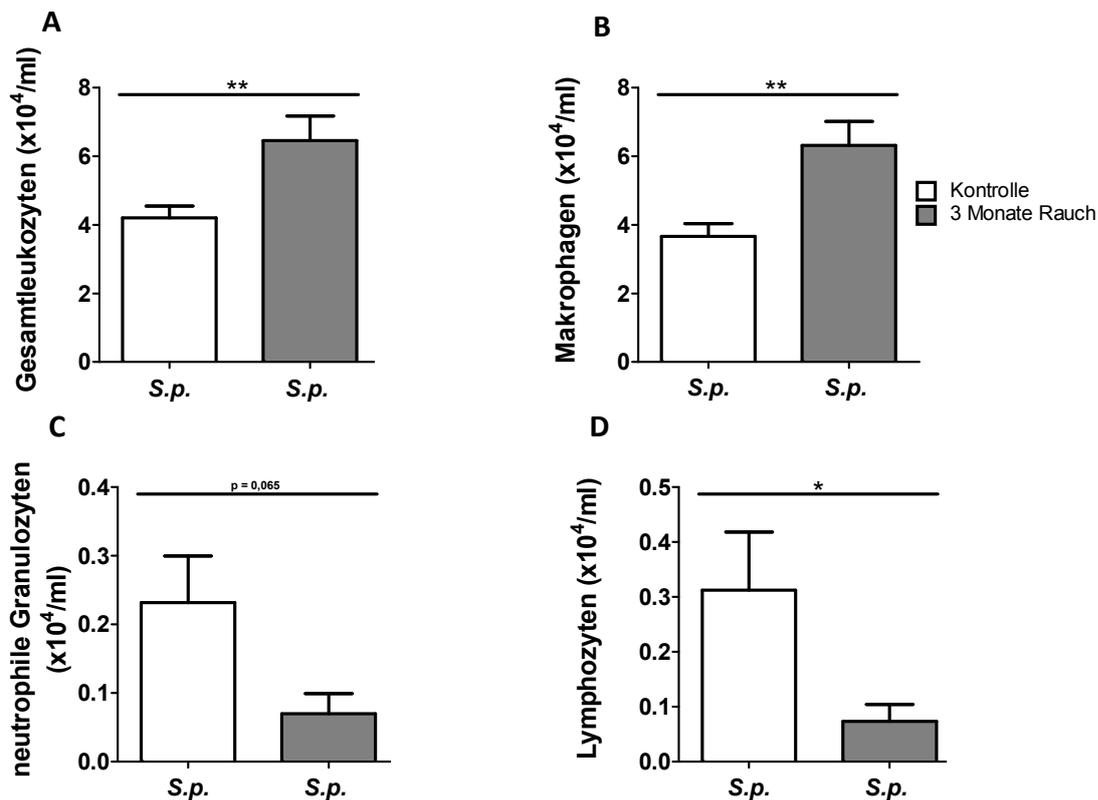


Abbildung 54: Leukozyten in der BALF nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* (*S.p.*) 6A. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition mit *S.p.* 6A (mit $1,55 \times 10^7$ CFU/10 μ l) kolonisiert. Nach 4 Tagen wurden die Lungen der Mäuse lavagiert und die Zellzahlen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Diff-Quik-Färbung wurden die Zellen im Lichtmikroskop differenziert. A) Gesamtleukozytenzahl in der BALF ($\times 10^4$ /ml). B) bis D) Absolute Zellzahlen der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF ($\times 10^4$ /ml). Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed (Kontrolle infiziert n=10; Rauch infiziert n=9), mean \pm SEM (Signifikanzniveau: *p<0,05, **p<0,01).

Um herauszufinden, ob die Kolonisierung der oberen Atemwege einen Einfluss auf das inflammatorische Geschehen in der Lunge hat, wurden in der Lunge die Konzentrationen der Chemokine IL-1 α und MCP-1 bestimmt. Durch die chronische Rauchexposition wurde in der Lunge tendenziell mehr IL-1 α gebildet (p = 0,11). Nach der Kolonisierung sank die Konzentration bei den rauchexponierten Mäusen (Abb. 55 A). Bei den Kontrollmäusen gab es keinen Unterschied nach der Infektion und im Vergleich mit den Rauch-exponierten Mäusen. MCP-1 wurde durch die chronische Rauchexposition in der Lunge tendenziell weniger stark ausgeschüttet als bei den Kontrollmäusen (Abb. 55 B). Nach der Infektion stieg die Konzentration bei den Rauch-exponierten Mäusen an.

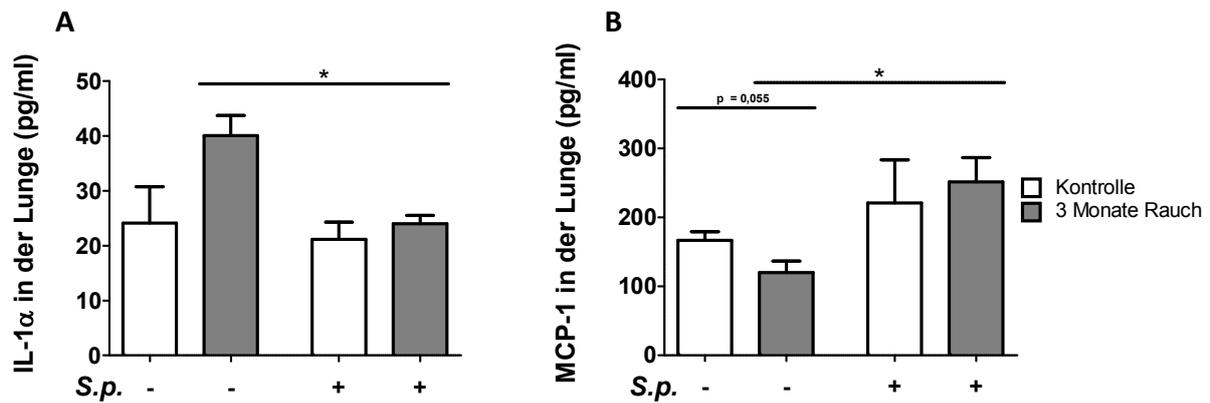


Abbildung 55: Konzentration der Chemokine IL-1 α und MCP-1 in der Lunge nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* (S.p.) 6A. Die oberen Atemwege der Mäuse wurden nach 3 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition mit *S.p.* 6A ($1,55 \times 10^7$ CFU/10 μ l) kolonisiert. Nach 4 Tagen Infektion wurden Lungenhomogenisate hergestellt und mittels CBA die Konzentrationen der Chemokine bestimmt. Konzentration von A) IL-1 α und B) MCP-1. (Kontrolle nicht infiziert n=5, Rauch nicht infiziert n=5, Kontrolle infiziert n=5; Rauch infiziert n=4) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveaus: *p<0,05).

Um zu überprüfen, ob Alveolarmakrophagen von Rauchmäusen adäquat auf Stimulation mit Bakterien reagieren können, wurden Alveolarmakrophagen von Rauch- und Kontrollmäusen nach 7 Monaten *ex vivo* für 4 Stunden mit *S. pneumoniae* 6A infiziert. Abbildung 56 zeigt, dass die Alveolarmakrophagen sowohl von Rauch- als auch von Kontrollmäusen hohe Konzentrationen von KC sezernierten und dass kein Defekt in der KC-Produktion bei rauchexponierten Mäusen vorlag.

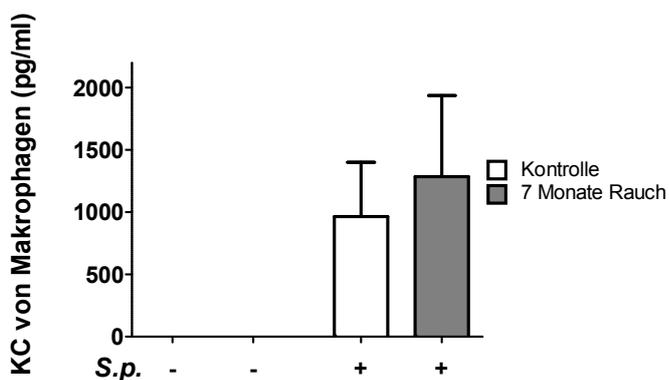


Abbildung 56: Konzentration des Chemokins KC nach *ex vivo* Infektion von Alveolarmakrophagen nach chronischem Rauch. Die Lunge der Mäuse wurde nach 7 Monaten Rauch- oder RaumlufTEXposition lavagiert und die Alveolarmakrophagen für 4 Stunden mit *S.p.* 6A infiziert. Die Konzentration von KC wurde bestimmt. (Kontrolle nicht infiziert n=4, Rauch nicht infiziert n=3, Kontrolle infiziert n=3, Rauch infiziert n=4) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM.

4.3.3. Reduzierte Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten des Bluts aus rauchexponierten Mäusen

Um zu überprüfen, ob Rauchexposition durch Hemmung der Phagozytose zu erhöhter Kolonisierung nach Infektion führt, wurde ein Phagozytose-Aktivitätsassay mit Monozyten und Granulozyten aus Vollblut der Mäuse und FITC-markierten *Escherichia coli* Bakterien durchgeführt. Abbildung 57 zeigt deutlich, dass die Phagozytoseaktivität der Zellen der Mäuse, die 3 Monate Zigarettenrauch ausgesetzt waren, im Vergleich zu denen der Kontrollmäusen signifikant verringert war.

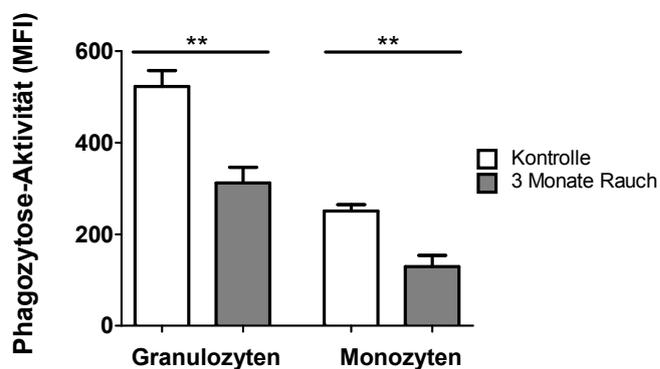


Abbildung 57: Phagozytose-Aktivität von Granulozyten und Monozyten aus Vollblut nach chronischem Rauch. Vollblut der Mäuse, die 3 Monate rauchexponiert waren, und der Kontrollmäuse wurde mit FITC-markierten *E. coli* inkubiert. Die Analyse erfolgte mithilfe eines FACS Calibur Zytometers (Kontrolle Granulozyten n=6, Rauch Granulozyten n=6, Kontrolle Monozyten n=6, Rauch Monozyten n=6.) Statistik: Mann-Whitney-Test, two-tailed, mean \pm SEM (Signifikanzniveau: $**p < 0,01$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Rauchexposition bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege begünstigt und die Eliminierung von Pathogenen an der Mukosa der oberen Atemwege hemmt. Dies führt zu verstärkter Entzündung und Translokation von Pathogenen in die Lunge.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Mausmodelle der akuten und chronischen Zigarettenrauchexposition entwickelt. Im akuten Modell kam es zu einer Neutrophilen-dominierten Entzündung und im chronischen Modell zur Entstehung eines emphysemartigen Lungenschaden. Es zeigte sich, dass sowohl der NF- κ B-Signalweg in myeloiden Zellen als auch IL-17A Lungenfunktion und Gewebshomöostase in der Lunge im Grundzustand und bei Exposition mit Zigarettenrauch regulieren. Mithilfe von Kolonisierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass Rauchexposition die Akquirierung bakterieller Pathogene begünstigt, was mit einer verminderten Phagozytoseaktivität von Mononzyten und Granulozyten, erhöhter Entzündung des Respirationstrakts und vermehrter Translokation von Bakterien in die Lunge einhergeht.

5.1. Zigarettenrauchinduzierte Entzündung und Lungenschaden in der Maus als Modell der COPD

Rauchen ist der Hauptrisikofaktor der COPD (Decramer et al., 2012). Die Lungen von COPD-Patienten zeigen meist 4 Arten von anatomischen Läsionen: Emphysem, pathologische Umformung der kleinen Atemwege, vaskuläre Umformung mit pulmonaler Hypertonie und erhöhte Anzahl an Becherzellen und somit Mukus-Überproduktion (Churg et al., 2008). Chronischer Husten wird als ein Initialsymptom der COPD gesehen. Kennzeichnend für den Verlauf der COPD ist eine Verschlechterung der Lungenfunktion, einhergehend mit Exazerbationen. Als häufigste Ursache für Exazerbationen gelten bakterielle und virale Infektionen der Atemwege und wiederkehrende sowie chronische Bronchitis sind typisch für eine COPD (Churg et al., 2008). Mithilfe von Mausmodellen können emphysemartige Läsionen und leichte Läsionen der kleinen Atemwege erreicht werden, was einem milden COPD-Phänotyp entspricht und somit den Beginn der COPD im Menschen abbildet (Churg et al., 2011). Um die Mechanismen des Fortschreitens der Krankheit zu verstehen, sind Mausmodelle deshalb von großer Bedeutung. Es gibt daher eine Vielzahl von Studien, die mithilfe von Mausmodellen den Effekt von Zigarettenrauch auf die Lunge erforschen. Um die Entstehung des zigarettenrauchinduzierten Lungenschadens auf zellulärer Ebene mechanistisch zu verstehen, werden in solche Studien häufig Knockout-Mäusen einbezogen,

die für Faktoren (z.B. Metalloproteasen), von denen vermutet wird, dass sie rauchinduzierte Lungenschäden vermitteln, defizient sind (Churg et al., 2008;Churg et al., 2011;Perez-Rial et al., 2014). Mithilfe des in dieser Arbeit entwickelten Modells wurde bei Mäusen ein struktureller Lungenschaden erzeugt, der durch Veränderungen der Lungenfunktion funktionelle Charakteristika eines menschlichen Emphysems aufweist; dazu zählen ein Verlust an Lungenparenchym, eine erhöhte quasi-statische compliance und eine erhöhte totale Lungkapazität (Guerassimov et al., 2004). In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten wurde die Lungenfunktion mittels einer invasiven Methode (FlexiVent) bestimmt, da diese im Vergleich zur nicht-invasiven Messung der Plethysmografie, deren Messwerte allein auf Druckänderungen der Untersuchungskammer beruhen, akkurate Ergebnisse liefert (Bates and Irvin, 2003). Vanoirbeek *et al.* zeigten, dass mit der invasiven Messung der Lungenfunktion im Elastase-Emphysem-Modell ein Verlust an Lungenfunktion und ein hiermit einhergehender struktureller Lungenschaden nachgewiesen werden kann (Vanoirbeek et al., 2010). So zeigte sich z.B. im Elastase-Emphysem-Modell eine erhöhte totale Lungkapazität und eine erhöhte quasi-statische compliance, was die Zerstörung des Lungengewebes durch Abbau der elastischen Fasern aufzeigt (Vanoirbeek et al., 2010). Wie im Elastasemodell kam es in unserem chronischen Rauchmodell zu einer erhöhten Lungkapazität und quasi-statischen compliance, was auf einen Verlust an Lungenstruktur hinweist. Zusätzlich zur Lungenfunktion wurde in dieser Arbeit der entstandene Lungenschaden mittels stereologischer Verfahren untersucht. Die Stereologie wies einen Verlust an Lungenstruktur nach chronischer Rauchexposition nach und bestätigte somit die Ergebnisse aus der invasiven Lungenfunktion.

Um Mechanismen eines rauchinduzierten Lungenschadens zu untersuchen, wie er bei einer COPD auftritt, ist eine chronische Rauchexposition aussagekräftiger als das Elastasemodell. Chronische Zigarettenrauchexposition hat gegenüber dem Elastasemodell den entscheidenden Vorteil, dass sie den langsam fortschreitenden Verlauf der COPD und das hiermit verbundene Entzündungsgeschehen besser abbildet (Stevenson and Birrell, 2011). So kommt es im Mausmodell z.B. zu einem Anstieg von Alveolarmakrophagen, der in auch in Patienten zu beobachten ist (Karimi et al., 2012;Tetley, 2002). Adaptive Immunmechanismen spielen bei der Entstehung eines strukturellen Lungenschadens eine Rolle. Dies konnte in Mausmodellen gezeigt werden (Motz et al., 2008;Motz et al., 2010;Sullivan et al., 2005) und ist aus Patientenstudien bekannt (Cosio et al., 2009;Saetta et al., 1998). Die Möglichkeit,

auch adaptive Immunmechanismen zu untersuchen, ist ein weiterer Vorteil des Rauchmodells gegenüber dem Elastasemodell. Das in dieser Arbeit beschriebene Modell ähnelt publizierten Emphysemmodellen, in denen eine Zigarettenrauchexposition von 4 bis 8 Monaten zu einem strukturellen Lungenschaden führt (Churg et al., 2009;John-Schuster et al., 2014;Seimetz et al., 2011;Yao et al., 2012). So wurde in einer Arbeit von Seimetz *et al.* ein Rauchmodell verwendet, das dem in dieser Arbeit beschriebenen chronischen Rauchmodell in Dauer und Art der Rauchexposition sowie verwendeter TSP-Konzentration sehr ähnlich ist (Seimetz et al., 2011). Die Autoren konnten mithilfe von Stereologie und Lungenfunktion einen emphysemartigen Lungenschaden nachweisen, dessen Ausprägung in Bezug auf Struktur und Funktion des Gefäßsystems und der Alveolen von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) abhängig war (Seimetz et al., 2011). Wie in der Arbeit von Seimetz *et al.* erhöhte sich durch die chronische Rauchexposition in unserem Modell nicht nur die totale Lungenkapazität und die quasi-statische compliance, sondern auch die mittlere freie Distanz innerhalb der distalen Lufträume (MCL). Es verringerte sich auch die Dicke der Alveolarwände (Seimetz et al., 2011). Wie auch von anderen Gruppen beschrieben (John et al., 2014;Wright and Churg, 2010), führte chronische Rauchexposition in unserem Modell zu einer erhöhten Anzahl an Alveolarmakrophagen, während die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in Lungen von rauchexponierten Mäusen nicht erhöht war. Der Einstrom von neutrophilen Granulozyten und eine verstärkte Bildung von Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-17A hingen hingegen ausschließlich von einer zusätzlichen Exposition mit NTHi ab. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass das in dieser Arbeit etablierte Modell der chronischen Rauchexposition einen emphysemähnlichen Lungenschaden hervorruft, der physiologisch durch invasive Lungenfunktion und histologisch durch Stereologie nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Zusätzlich zum chronischen Modell wurde ein akutes Rauchmodell etabliert. Im Gegensatz zum chronischen Modell kommt es im akuten Rauchmodell durch die alleinige Nutzung von Mainstream-Rauch zu einer akuten Entzündung in der Lunge, die durch einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten und einer erhöhten Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten-rekrutierenden Chemokinen gekennzeichnet ist (John et al., 2014).

Diese Modelle wurden in den weiteren experimentellen Arbeiten verwendet, um die Entstehung des rauchinduzierten Lungenschadens mechanistisch zu verstehen. Hierfür wurden genetisch manipulierte Mäuse mit einbezogen. Die Funktion von NF- κ B und IL-17A bei der Entstehung eines rauchinduzierten Lungenschadens und bei einer durch akute Rauchexposition ausgelösten Entzündung wurden mithilfe der beiden in dieser Arbeit etablierten Rauchmodelle untersucht.

5.2. Die Rolle von p65 und I κ B α in myeloiden Zellen bei akuter und chronischer Rauchexposition

Der NF- κ B-Signalweg ist aufgrund seiner zentralen Stellung im Immunsystem bei der Erforschung der zigarettenrauchinduzierten Entzündung und des rauchinduzierten Lungenschadens von großem Interesse, da eine Manipulation der NF- κ B-Signalkaskade ein potentieller Therapieansatz sein könnte. Die Analyse humanen Materials sowie Zellkultur- und Mausstudien legen nahe, dass NF- κ B-regulierte Entzündung eine Funktion bei der Pathogenese der COPD hat. Bei COPD-Patienten mit Exazerbationen konnte von Caramori *et al.* eine verstärkte nukleäre Lokalisation von p65 in Sputum-Makrophagen nachgewiesen werden (Caramori et al., 2003). In einer anderen Studie konnte in bronchialen Biopsien sowohl von Rauchern als auch von stabilen COPD-Patienten eine erhöhte p65-Expression besonders im Epithel gezeigt werden (Di et al., 2002). Szulakowski *et al.* fanden in ihrer Studie einen verminderten Proteingehalt von I κ B α in der Lunge von gesunden Rauchern und Ex-Rauchern oder Rauchern mit COPD, was bei Rauchern auch mit einer erhöhten NF- κ B-DNA-Bindeaktivität einherging (Szulakowski et al., 2006). Eine erhöhte Phosphorylierung von I κ B α und somit eine erhöhte NF- κ B-Aktivität konnte ebenfalls in Atemwegs-Epithelzellen in Lungenschnitten von COPD-Patienten nachgewiesen werden (Yagi et al., 2006). Im Tiermodell konnte durch Hemmung von IKK- β und der damit herbeigeführten Hemmung der nukleären Translokation von p65 ein verminderter Einstrom von neutrophilen Granulozyten nach akuter Zigarettenrauchexposition und somit ein antiinflammatorischer Effekt erreicht werden (Rajendrasozhan et al., 2010b). In einer Studie von Rajendrasozhan *et al.* verschlimmerte sich der Effekt sowohl akuter als auch chronischer Zigarettenrauchexposition im Mausmodell wie z.B. erhöhter Einstrom von

inflammatorischen Zellen und vermehrte Produktion proinflammatorischer Mediatoren durch genetische Ablation von p50, welches als Heterodimer zusammen mit p65 an der Transaktivierung von NF- κ B regulierten Genen beteiligt ist (Rajendrasozhan et al., 2010a). Darüber hinaus bestand in p50-defizienten Tieren schon im Grundzustand eine Vergrößerung der Alveolen (Rajendrasozhan et al., 2010a). Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren Studie keine erhöhte NF- κ B-Aktivität durch akute Rauchexposition von Mäusen für 3 und 14 Tage und ebenso keine erhöhte NF- κ B-DNA-Assoziation im Lungengewebe von Rauchern und Patienten mit Emphysem im Vergleich zu Nichtrauchern nachgewiesen werden, woraus die Autoren schlussfolgern, dass NF- κ B bei der zigarettenrauchinduzierten Entzündung keine Rolle spielt (Rastrick et al., 2013). Da die Zellzahlen von Alveolarmakrophagen in der Lunge und dem Alveolarraum von COPD-Patienten erhöht sind, wird vermutet, dass Alveolarmakrophagen bei der Pathogenese der COPD eine entscheidende Rolle spielen (Barnes, 2004a; Tetley, 2002). Mausstudien zeigten, dass Proteasen, die von myeloiden Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet werden, bei der Entstehung des rauchinduzierten Lungenschadens von Bedeutung sind (Hautameki, 1997; Shapiro 2003). In einer Studie von Ortiz *et al.* wurde mithilfe eines Mausmodells die Beteiligung von myeloid-abgeleiteten Suppressor-Zellen (MDSC) bei der Lungenkrebsentstehung nach chronischer Rauchexposition untersucht (Ortiz et al., 2014). Die Autoren untersuchten in diesem Zusammenhang auch die Auswirkung von chronischer Rauchexposition auf die myeloide Zellpopulation im Allgemeinen und fanden, dass die Population der Gr-1⁺CD11b⁺-Zellen, die aus Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten besteht, nach 4 Monaten in der Lunge erhöht war (Ortiz et al., 2014), was ebenfalls auf eine wichtige Rolle der myeloiden Zellen bei der Pathogenese des Lungenschadens hinweist. Aufgrund der zentralen Stellung von NF- κ B in der Regulation von Entzündung und der beschriebenen klinischen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion des NF- κ B-Signalwegs in myeloiden Zellen auf die Lungenfunktion und Lungenstruktur unter basalen Bedingungen und bei rauchinduzierter Entzündung untersucht. Bis dato gibt es keine Studie, die den Effekt von Rauchexposition auf Mäuse, die in myeloiden Zellen für p65-defizient sind, untersucht; eine systemische Deletion von p65 ist embryonal letal (Li and Verma, 2002). Es wurde daher insbesondere untersucht, ob sich die myeloide Defizienz von p65 durch Dämpfung der Entzündung positiv und die myeloide Defizienz von I κ B α durch Verstärkung der Entzündung negativ auf den Verlauf des

zigarettenrauchinduzierten Lungenschadens auswirkt. Eine ähnlich umfassende Analyse wurde bis dato nicht publiziert.

5.2.1. Deletion von p65 und I κ B α in myeloiden Zellen führt spontan zur Störung der Homöostase in der Lunge und zu einer verschlechterten Lungenfunktion

Aufgrund seiner proinflammatorischen Wirkungen wurde lange angenommen, dass die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs antiinflammatorische Wirkungen hat. In Mausstudien zeigte sich jedoch, dass eine gewebsspezifische Deletion von NF- κ B in epithelialen Zellen und von Faktoren, die NF- κ B regulieren, häufig zu einer verstärkten Entzündung führt (Pasparakis, 2009). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Deletion von IKK β in Keratinozyten bei Mäusen einige Tage nach der Geburt zu einer inflammatorischen Hauterkrankung führte, die mit erhöhten Zytokinkonzentrationen und Infiltration von Immunzellen einherging (Pasparakis et al., 2002). Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen konnten jedoch nicht aufgeklärt werden (Pasparakis, 2009). Eine andere Studie zeigte, dass die Deletion von NEMO, der regulatorischen Untereinheit des IKK-Komplexes, der I κ B α phosphoryliert, in intestinalen Epithelzellen ebenfalls zu spontaner Entzündung, nämlich zu chronischer Kolitis führt (Nenci et al., 2007). Im Gegensatz dazu führte der Knockout von IKK β in Clara-Zellen zu keiner spontanen Entzündung (Broide et al., 2005). Der Knockout von IKK β bewirkt jedoch keine vollständige Inhibition von NF- κ B und ist somit eventuell nicht ausreichend, in der Lunge eine spontane Entzündung auszulösen (Pasparakis, 2009). In unserem Modell zeigte sich die Defizienz sowohl von p65 als auch von I κ B α in myeloiden Zellen bei 8 Wochen und bei 5 Monate alten Mäusen in einem veränderten Zellbild in der Lunge. I κ B α -defiziente Mäuse hatten sowohl nach 8 Wochen als auch nach 5 Monaten im Vergleich zu den WT Mäusen weniger Makrophagen und nach 5 Monaten mehr Lymphozyten in der BALF. Eine Studie von Goossens *et al.* zeigt, dass die Deletion von I κ B α in myeloiden Zellen unter anderem zu einer erhöhten Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen *in vitro* führt (Goossens et al., 2011). Dieser Effekt der I κ B α -Deletion könnte dazu führen, dass durch die verstärkte Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen weniger Monozyten in die Lunge einwandern können und somit weniger Makrophagen in der BALF nachgewiesen werden können. Die Störung der Homöostase zeigte sich auch in erhöhten Zytokinkonzentrationen in der Lunge. Die Deletion von I κ B α in

myeloiden Zellen führte unter anderem zu einer vermehrten Sekretion von IL-1 α , KC und MIP-1 α in der Lunge, was durch die NF- κ B-abhängige Regulation dieser Gene erklärbar ist (Pahl, 1999). Eine Studie von Ruwanpura *et al.* zeigt, dass gp130-Knockout-Mäuse, die einen deregulierten IL-6-Signalweg haben, im Alter von 6 Monaten spontan ein Emphysem entwickeln, das durch ein erhöhtes Lungenvolumen und eine erhöhte statische compliance charakterisiert ist (Ruwanpura et al., 2011). Der Effekt war IL-6 abhängig, da nur IL-6 in den Lungen der Knockout-Mäuse signifikant hochreguliert war und der Doppelknockout von gp130 und IL-6 die Emphysementstehung verhinderte (Ruwanpura et al., 2011). Die Konzentration von IL-6 war in den Lungen unserer I κ B α -defizienten Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen erhöht und ging mit einem emphysemartigen Lungenschaden mit erhöhter quasi-statischer compliance, compliance des gesamten respiratorischen Systems, verringerter Gewebsteifigkeit und totaler Lungkapazität einher. Überraschenderweise zeigte sich bei p65-defizienten Mäusen ein ähnlicher Phänotyp bezüglich der Entzündung und Lungenfunktion. Die Deletion von p65 in myeloiden Zellen führte sowohl nach 8 Wochen als auch nach 5 Monaten zu einem Anstieg der Zahl an neutrophilen Granulozyten und nach 8 Wochen zu einem Anstieg der Zahl an Lymphozyten in der BALF. Ähnlich wie bei den I κ B α -defizienten Mäusen zeigte sich die Störung der Homöostase auch bei p65-defizienten Mäusen in erhöhten Konzentrationen von IL-1 α , KC und MIP-1 α in der Lunge der p65-defizienten Mäuse, obwohl diese Gene NF- κ B reguliert sind (Pahl, 1999). Die verstärkte Entzündung in den Lungen der Mäuse trotz Fehlen der NF- κ B-Untereinheit p65 in myeloiden Zellen lässt auf kompensatorische Mechanismen innerhalb der myeloiden Zellen oder verstärkte Entzündung der Strukturzellen schließen. Eine erhöhte totale Lungkapazität zeigte sich im Grundzustand nach 7 Monaten auch bei den p65-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen. Die durch die Deletion von p65 in myeloiden Zellen hervorgerufene Entzündung geht also mit einer veränderten Lungenfunktion einher.

Das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg bewirkte eine spontane Entzündung in der Lunge und einen Verlust an Lungenfunktion, ohne dass die Lungen der Mäuse zusätzlich stimuliert wurden. Dies macht deutlich, dass ein funktionierender myeloider NF- κ B-Signalweg für die Homöostase der Lunge essentiell ist. Weitere Studien werden zeigen, inwiefern myeloides NF- κ B die Interaktion von Alveolarmakrophagen mit Epithelzellen reguliert und dies zur Gewebshomöostase in der Lunge beiträgt.

5.2.2. Das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg durch Deletion von p65 oder I κ B α führt zu einer gesteigerten Entzündung in der Lunge nach akuter Rauchexposition

Akute Rauchexposition führte in unserem Modell in Lungen von I κ B α -defizienten Mäusen zu einer gesteigerten Entzündung, was sich in erhöhten Konzentrationen aller gemessenen Zytokine/Chemokine zeigte. Wie bereits beschrieben, wurde eine umfassende Analyse des Effekts der I κ B α -Defizienz auf die Lungenstruktur und Lungenfunktion im Grundzustand und nach Rauchexposition bislang nicht publiziert. Einige Studien untersuchten jedoch mithilfe von Mausmodellen den Effekt der I κ B α -Defizienz in anderen Organen. In einem Dermatitis-Modell führte z.B. die systemische I κ B α -Defizienz zu einer anhaltenden NF- κ B-Antwort (Klement et al., 1996). In einem Pankreatitis-Modell wurde ebenfalls eine konstitutive NF- κ B-Antwort durch eine Pankreas-spezifische Deletion von I κ B α beobachtet (Neuhofer et al., 2013). Im Gegensatz dazu führte die Deletion in myeloiden Zellen in einem Atherogenese-Modell nicht zu einer konstitutiven NF- κ B-Aktivierung mit verstärkter Entzündung in Makrophagen (Goossens et al., 2011). In einer anderen Arbeit zeigten Knochenmark-abgeleitete Makrophagen (bone marrow derived macrophages, BMDM) ebenfalls keine spontane NF- κ B-Aktivierung, jedoch eine verstärkte Produktion von KC und MIP-2 nach LPS-Stimulation (Han et al., 2009). Unsere Ergebnisse liefern einen weiteren Beweis dafür, dass die I κ B α -Defizienz in myeloiden Zellen bei gleichzeitigem Vorhandensein der restlichen I κ B-Proteine nach starker Stimulation, die die Zigarettenrauchexposition in unserem Modell darstellt, zu erhöhter NF- κ B-Aktivität führt. Dies konnte durch erhöhte Proteinkonzentrationen der NF- κ B-regulierten Gene MIP-1 α , KC, IL-1 α , G-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10 und MCP-1 (Pahl, 1999) in der Lunge gezeigt werden. Es ist darüber hinaus denkbar, dass die gesteigerten Konzentrationen von KC und IL-6 in Lungen von rauchexponierten I κ B α -defizienten Mäusen auch verstärkt von Epithelzellen gebildet werden, da die Expression dieser Zytokine in Epithelzellen durch IL-1 α und IL-1 β induziert wird.

Obwohl der NF- κ B-Signalweg zahlreiche inflammatorische Mediatoren wie Zytokine und Chemokine reguliert, führte die Deletion von p65 in myeloiden Zellen zu einer gesteigerten Entzündung in Lungen von rauchexponierten Mäusen. Die Konzentration der Zytokine IL-1 β und IL-10 und des Monozyten-rekrutierenden Chemokins MCP-1 sowie die Anzahl der gesamten Leukozyten und Makrophagen waren in Lungen von Mäusen nach

Kurzzeitberauchung erhöht. IL-1 β , IL-10 und MCP-1 werden sowohl von myeloiden Zellen als auch von Strukturzellen der Lunge gebildet. Ein kompensatorischer Effekt der Strukturzellen durch die vermehrte Sekretion von IL-1 β , IL-10 und MCP-1 ist deshalb vorstellbar. p65 tritt meist in einem Heterodimer mit p50 auf und ist Teil des klassischen NF- κ B-Signalwegs (Liou, 2002). p50 kann allerdings auch als Homodimer vorliegen und dann nach Stimulation die Expression von IL-10 bewirken (Cao et al., 2006). Die Deletion von p65 könnte dazu führen, dass mehr p50-Homodimere vorliegen und somit IL-10 stärker exprimiert wird. Bei MIP-1 α , KC, IL-1 α , G-CSF und IL-6 bestand kein Unterschied zu den rauchexponierten WT Mäusen. Da Zytokine wie KC und IL-6 auch von Epithelzellen gebildet werden und die Konzentrationen von KC und IL-6 sich zwischen WT und p65-defizienten nach Kurzzeitberauchung nicht unterschieden, ist es denkbar, dass im Kurzzeitmodell Strukturzellen die Hauptsächliche Quelle dieser Zytokine sind.

Das nach Rauchexposition veränderte Zytokinprofil in p65- und I κ B α -defizienten Mäusen ging auch mit einer veränderten Rekrutierung von Entzündungszellen einher. Obwohl die Konzentration des Monozyten-rekrutierenden Chemokins MCP-1 (CCL2) (Deshmane et al., 2009) sowohl bei p65- als auch bei I κ B α -defizienten Mäusen durch akute Rauchexposition in der Lunge anstieg, konnte eine differenzielle Rekrutierung von Monozyten beobachtet werden. Die p65-Defizienz führte nach akuter Rauchexposition zu einer erhöhten Anzahl an Alveolarmakrophagen, wohingegen sich die Zahl der Alveolarmakrophagen bei I κ B α -defizienten Mäusen durch akute Rauchexposition nicht veränderte und verglichen mit rauchexponierten WT Mäusen verringert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass der myeloide NF- κ B-Signalweg einen Einfluss auf die Rekrutierung von Entzündungszellen nach starker Stimulation hat. Bemerkenswerter Weise war die Anzahl an Entzündungszellen in Lungen von rauchexponierten myeloid p65-defizienten Mäusen erhöht, obwohl der Einstrom an neutrophilen Granulozyten verringert war. Die Inaktivierung von NF- κ B führte also zu einem verstärkten Einstrom von Entzündungszellen wie Monozyten, die über die Bildung von Proteasen wie MMP-12 (Perez-Rial et al., 2013) zu rauchinduzierten Lungenschäden beitragen.

Die Experimente mit p65- und I κ B α -defizienten Mäusen zeigen, dass myeloides NF- κ B die rauchinduzierte Entzündung im Kurzzeitmodell reguliert. Das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg bewirkt bei akuter Rauchexposition eine verstärkte Entzündung, die sich in

erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zeigt, und eine deregulierte Rekrutierung von Entzündungszellen. Die Ergebnisse aus dem Kurzzeitmodell zeigen daher, dass der myeloide NF- κ B-Signalweg wie bei unbehandelten Mäusen auch bei rauchexponierten Mäusen für die Homöostase der Lunge essentiell ist. Durch eine Inhibierung des myeloiden NF- κ B-Signalwegs über die Deletion von p65 lässt sich die rauchinduzierte Entzündung nicht vermindern. Die Überaktivierung des myeloiden NF- κ B-Signalwegs führt hingegen zu einer deutlich gesteigerten pulmonalen Entzündung.

5.2.3. Das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg durch Deletion von p65 oder I κ B α führt zu einem Verlust an Lungenstruktur und Lungenfunktion nach chronischer Rauchexposition

Chronische Rauchexposition führte in einem Mausmodell zu einem Makrophagen-dominierten Phänotyp der Entzündung mit geringer Sekretion inflammatorischer Mediatoren (John et al., 2014). In einer Arbeit von Karimi *et al.* wurde gezeigt, dass die Zellzahlen der BALF von Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern und Ex-Rauchern erhöht ist und diese Zellen zum größten Teil aus Makrophagen bestehen (Karimi et al., 2012). Auch bei COPD-Patienten ist die Zahl der Makrophagen in der Lunge und dem Sputum um das 5- bis 10-fache erhöht (Barnes, 2004b). In unserem Modell der chronischen Rauchexposition erhöhte sich die Zahl der Makrophagen bei allen Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, wobei die Anzahl bei den I κ B α -defizienten Mäusen nach Rauchexposition geringer war als bei den rauchexponierten WT Mäusen. Dies könnte, wie schon für den Grundzustand beschrieben, die Folge einer verstärkten Adhäsion der I κ B α -defizienten myeloiden Zellen an Endothelzellen sein (Goossens et al., 2011). Die geringeren Makrophagenzahlen in der BALF könnten auch eine Folge der geringeren Konzentration von MCP-1 in den Lungen der I κ B α -defizienten Mäuse nach chronischer Rauchexposition sein, welches nach Induktion durch oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren gebildet wird (Deshmane et al., 2009). Im chronischen Rauchmodell zeigte sich im Vergleich zum akuten Rauchmodell eine gedämpfte inflammatorische Antwort aufgrund der Art des Zigarettenrauches (John et al., 2014). Wie schon im Grundzustand war jedoch die Konzentration von IL-6 in den Lungen der I κ B α -defizienten Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen erhöht. Außerdem zeigte sich eine Verschlimmerung des Lungenschadens in der Lungenfunktion der I κ B α -defizienten Mäuse. Sowohl die totale Lungenkapazität und die

beiden compliance Werte als auch der Widerstand der Atemwege zeigten eine Verschlechterung im Vergleich mit den WT Mäusen. Dies könnte, wie schon beschrieben, ein Effekt der erhöhten IL-6 Konzentration in der Lunge sein, die in der Studie von Ruwanpura *et al.* ausreichte, um in 6 Monate alten Mäusen spontan einen emphysemartigen Zustand zu induzieren (Ruwanpura *et al.*, 2011). In der stereologischen Auswertung zeigten beide knockout-Stämme im Vergleich zu den WT Mäusen nach chronischer Rauchexposition einen erhöhten MCL-Wert; auch hier wirkte sich das Eingreifen in den myeloiden NF- κ B-Signalweg negativ auf die Lungenstruktur und -funktion aus.

Diese Experimente legen nahe, dass sich die Manipulation des NF- κ B-Signalwegs negativ auf Homöostase der Lunge, Lungenfunktion und die Entwicklung eines Lungenemphysems auswirkt. Der myeloide NF- κ B-Signalweg bietet sich daher nicht als therapeutisches Ziel an. Der NF- κ B-Signalweg scheint vielmehr in der gesunden Lunge fein reguliert zu sein. Eine deregulierte Aktivierung von NF- κ B, sei es Suppression oder Überaktivierung, trägt möglicherweise zum Verlust an Lungenfunktion bei Rauchern und COPD-Patienten bei.

5.3. Die Rolle von IL-17A bei akuter und chronischer Rauchexposition

Durch seine Funktion als proinflammatorisches Zytokin, das zur Neutrophilen- und Monozyten-Rekrutierung beiträgt (Witowski *et al.*, 2004), ist die Rolle von IL-17A bei rauchinduzierter Entzündung und COPD interessant. In COPD Patienten konnten im Vergleich mit gesunden Menschen erhöhte Zahlen von IL-17A-positiven Zellen in der Submukosa der Lunge detektiert werden. Außerdem korrelierte die Sputum-IL-17A-Konzentration mit einer Abnahme der Lungenfunktion allerdings ohne nachweisbare neutrophile Entzündung (Doe *et al.*, 2010). Die Funktion von IL-17A und IL-17A-positiven Immunzellen wie T-Helferzellen bei der Entstehung der COPD ist jedoch unklar (Tan and Rosenthal, 2013). In einem Mausmodell der Ozon-Exposition wurde mithilfe von IL-17-Rezeptor-Knockoutmäusen gezeigt, dass die Entstehung des Emphysems und der Entzündung durch Ozon nicht IL-17A-abhängig ist (Pinart *et al.*, 2013). Eine andere Studie zeigte jedoch, dass IL-17A-defiziente Mäuse vor der rauchinduzierten Entstehung eines Emphysems geschützt sind (Shan *et al.*, 2012). Mithilfe unserer Mausmodelle der akuten und

chronischen Rauchexposition wurde die Auswirkung der systemischen IL-17A-Defizienz auf die Lungenstruktur und Lungenfunktion untersucht.

5.3.1. Die IL-17A-Defizienz wirkt sich negativ auf die Lungenstruktur aus und führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Entzündungszellen in der Lunge

Eine Studie von Hirota *et al.* zeigt mithilfe von IL-17A-cre-eYFP-Reporter-Mäusen, dass im basalen Zustand ohne Stimulation fast keine IL-17A-produzierenden Th17-Zellen in der Maus nachweisbar sind (Hirota *et al.*, 2011). Eine weitere IL-17A-produzierende Zellpopulation, die $\gamma\delta$ -T-Zellen, machen in der Lunge im Grundzustand nur etwa 3% der T-Zellen aus und werden erst durch Infektionen stark induziert (Kirby *et al.*, 2007). IL-17A war in unseren Modellen auf Proteinebene in der Lunge unter der Nachweisgrenze. Trotzdem führte die systemische Defizienz von IL-17A spontan zu einer verschlechterten Lungenstruktur in 8 Monate alten raumluftexponierten Mäusen. Dies zeigte sich in einem erhöhten MCL, einem erhöhten Anteil des alveolären Luftraums und einem verringerten Anteil der Alveolen am Gesamtparenchym ($V_v(W,A)$). In der invasiven Lungenfunktionsmessung wurden jedoch keine Unterschiede zu WT Mäusen festgestellt. Da keine strukturellen Veränderungen in der Lunge bei jungen, d.h. 8 Wochen alten IL-17A defizienten Mäusen festgestellt wurden, scheinen sich diese erst in adulten Tieren zu entwickeln und kein Entwicklungsdefekt zu sein. Die strukturellen Veränderungen der Lunge könnten auf die verringerte Elastin-Expression und Elastin-Proteingehalt in den Lungen der IL-17A-defizienten Mäuse zurückzuführen sein. Elastin ist neben Kollagen und Proteoglykanen Teil der extrazellulären Matrix und hauptverantwortlich für die reversible Compliance während des Atemzyklus (Shifren *et al.*, 2007). In einer Studie von Wendel *et al.* wurde gezeigt, dass Elastin-defiziente Mäuse aufgrund der aus dem Fehlen von Elastin resultierenden Entwicklungsstörung der Lunge Charakteristika eines Emphysems aufweisen, wie z.B. vergrößerte distale Alveolen (Wendel *et al.*, 2000). Es stellt sich die Frage, wie die IL-17A-Defizienz die Expression von Elastin beeinflusst. Es ist bekannt, dass IL-17A die Halbwertszeit verschiedener Chemokine und Zytokine erhöhen kann, indem es die normalerweise instabilen mRNAs stabilisiert (Datta *et al.*, 2010; Hartupée *et al.*, 2007). Ein solcher stabilisierender Mechanismus ist auch für die Elastin-mRNA denkbar, da die Expression von Elastin posttranskriptional reguliert wird (Parks, 1997). Darüber hinaus zeigten frühere Studien, dass Entzündungsmediatoren die

Expression von Elastin regulieren (Sproul and Argraves, 2013). IL-1 β vermindert die Expression von Elastin in neonatalen Lungenfibroblasten über das Enhancer Protein C/EBP β und verstärkt die Elastinexpression in adulten dermalen Fibroblasten (Kuang et al., 2002; Kuang and Goldstein, 2003; Mauviel et al., 1993). Weitere Studien sind notwendig, um zu zeigen, ob IL-17A und sein Rezeptor IL-17RA, der C/EBP β negativ reguliert (Shen et al., 2009), die Elastin Expression direkt regulieren oder indirekt über die Induktion von Entzündungsmediatoren wie IL-1 β . Da in Lungen von IL-17A-defizienten Mäusen auch eine leicht erhöhte Elastaseaktivität gemessen wurde, ist es auch denkbar, dass Elastase zu dem verminderten Elastingehalt in Lungen von IL-17A-defizienten Tieren beiträgt. Übereinstimmend mit einer Studie, die zeigte, dass intranasale Gabe von IL-17A die Expression von MMP-9 in der Lunge induziert (Prause et al., 2004), führte die Defizienz von IL-17A darüber hinaus zu einer verminderten pulmonalen Expression von MMP-9. Die pulmonale Expression von MMP-9 korrelierte jedoch nicht mit der Lungenfunktion und -struktur, da die Konzentrationen von MMP-9 auch in Lungen von rauchexponierten Tieren vermindert waren. Unsere Ergebnisse bezüglich MMP-9 stimmen jedoch mit einer Studie überein, in der gezeigt wurde, dass die Defizienz für MMP-9 nicht vor rauchinduzierter Entzündung und Lungenschaden bei Mäusen schützt (Atkinson et al., 2011). Eine weitere Veränderung in den Lungen der IL-17A-defizienten Mäuse stellt die veränderte Zusammensetzung der T-Zellen dar. Die IL-17A-Defizienz führte zu einem erhöhten Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb der CD3-positiven Zellen. $\gamma\delta$ -T-Zellen wird eine schützende Rolle in der Lunge zugeschrieben, da sie meist in direktem Kontakt mit Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommen, die eine Überwachungsfunktion in der Lunge haben (Wands et al., 2005). In unserer Studie könnte es aufgrund des Fehlens von IL-17A zu einem kompensatorischen Anstieg des Anteils der $\gamma\delta$ -T-Zellen gekommen sein, dessen Auswirkungen auf die Lungenstruktur und -funktion in weiteren Versuchen untersucht werden müssen. Die Analyse der IL-17A-defizienten Tiere legt nahe, dass eine basale IL-17A Expression zur Homöostase in der Lunge beiträgt. Da Proteasen nicht nur unter pathologischen Bedingungen Lungenschäden vermitteln sondern auch höchstwahrscheinlich zur Gewebshomöostase und Wundheilung in der gesunden Lunge beitragen (Davey et al., 2011; Loffek et al., 2011), ist es denkbar, dass deregulierte Proteasen, abnormale Expression von strukturellen Komponenten der Lunge und eine veränderte Zusammensetzung von Entzündungszellen zu dem basalen Verlust an alveolarer Struktur in IL-17A defizienten Tieren

führen. Eine beeinträchtigte basale Homöostase der Lunge könnte ebenfalls IL-17-defiziente Mäuse für rauchinduzierte Lungenschäden anfällig machen.

5.3.2. Die Defizienz von IL-17A hat keinen Effekt auf die Auswirkungen von akuter Rauchexposition auf die Lunge

In unserem Modell der akuten Rauchexposition strömten neutrophile Granulozyten in die Lungen der IL-17A-defizienten und WT Mäuse ein. Durch die Defizienz an IL-17A liegt also kein Defekt in der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten vor. Eine Arbeit von John *et al.* zeigt, dass IL-17A durch akute Rauchexposition nicht vermehrt ausgeschüttet wird (John *et al.*, 2014). Dies konnten wir mithilfe eines ELISAs ebenfalls zeigen. In einer Studie von Li *et al.* konnte eine erhöhte IL-17A-Expression nach akuter Rauchexposition für 3 Tage festgestellt werden. Es wurden jedoch weder Proteindaten gezeigt, noch wurde das Rauchprotokoll in Bezug auf TSP und CO-Konzentration näher charakterisiert (Li *et al.*, 2014b). Die Anzahl der Makrophagen änderte sich durch die akute Rauchexposition bei WT und IL-17A defizienten Mäusen nicht. Durch unsere Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass IL-17A bei akuter Rauchexposition Entzündung nicht vermittelt.

5.3.3. IL-17A-Defizienz schützt nicht vor rauchinduziertem Lungenschaden durch chronische Rauchexposition

Shan *et al.* zeigen in einer Studie, dass in ihrem Modell der chronischen Rauchexposition IL-17A in den Lungen der Mäuse auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert wird und dass hierfür höchstwahrscheinlich CD4-positive und $\gamma\delta$ -T-Zellen verantwortlich sind. Die Depletion von $\gamma\delta$ -T-Zellen resultierte in einem Anstieg der inflammatorischen Th17-Zellen als Folge der Rauchexposition (Shan *et al.*, 2012). Die Studie zeigt auch, dass Mäuse, die IL-17A-defizient sind, vor rauchinduziertem Lungenschaden geschützt sind, während Mäuse, die IL-17A überexprimieren, einen verschlimmerten Phänotyp des Lungenschadens nach Rauchexposition aufweisen, welcher mithilfe einer μ CT-Analyse quantifiziert wurde (Shan *et al.*, 2012). Eine umfassende Lungenfunktionsanalyse mit anschließender stereologischer Auswertung wurde in der Arbeit nicht gemacht. Die histologische Evaluation ist aufgrund der

Unschärfe der gezeigten Histologie darüber hinaus schwierig. Shan *et al.* zeigten *in vitro* mit CD4⁺-T-Zellen aus der Milz, dass dendritische Zellen aus der Lunge von rauchexponierten Mäusen eine Th17-Differenzierung wirksamer induzieren konnten als Alveolarmakrophagen oder dendritische Zellen aus Kontrollmäusen. Außerdem zeigten sie, dass Antigen präsentierende Zellen (APCs), die mithilfe von CD11c beads nach 12 Wochen Rauchexposition aus den Lungen der Mäusen isoliert und intraperitoneal in naive Mäuse injiziert wurden, nach 12 Wochen ohne Rauchexposition ein Emphysem hervorrufen konnten. Dies ging mit verstärkter Entzündung einher und war IL-17A abhängig. Die geringe Anzahl der eingesetzten Mäuse (n = 3) ist jedoch problematisch. Sie identifizierten *SPP1* als das Gen, das in dendritischen Zellen aus Lungen mit Emphysem am stärksten exprimiert wurde. Auch bei diesem Experiment ist die geringe Anzahl der Mäuse (n = 3) problematisch und es wurde auch keine angemessene statistische Auswertung gemacht. In unserem Modell hatten die IL-17A-defizienten Mäuse nach Rauchexposition einen strukturellen Lungenschaden. Mithilfe der Stereologie konnten wir einen verringerten Anteil von Alveolen am Gesamtparenchym im Vergleich mit den Kontrollmäusen zeigen. Bei rauchexponierten IL-17A-defizienten Mäusen waren im Vergleich zu luftexponierten Kontrollmäusen die Werte des MCL und des Anteils des alveolären Luftraums erhöht und die des Anteils von Alveolen am Gesamtparenchym erniedrigt. Diese veränderten Werte deuten auf eine emphysemartige Veränderung der Lungenstruktur nach Rauchexposition hin und beweisen somit, dass IL-17A-Defizienz vor der Entstehung eines rauchinduzierten Lungenschadens nicht schützt. Die invasive Lungenfunktionsmessung mithilfe des FlexiVent-Geräts liefert eine umfassende Analyse der physiologischen Lungenfunktion und untersucht auch Parameter, die bei Emphysem im Menschen verändert sind, wie z.B. die compliance der Lunge (Hoymann, 2006; Irvin and Bates, 2003; Vanoirbeek et al., 2010). Die invasive Lungenfunktionsmessung zeigte, dass die Defizienz von IL-17A zu keinem Schutz der Mäuse vor rauchinduziertem Lungenschaden führt. Mithilfe der Lungenfunktionsmessung konnten wir zeigen, dass das Fehlen von IL-17A nicht zu einem Schutz der Mäuse vor einem Anstieg der totalen Lungkapazität und der compliance führte. In der compliance des gesamten respiratorischen Systems konnte eine tendenzielle Verschlimmerung und in der elastance des gesamten respiratorischen Systems sogar eine signifikante Verschlimmerung des Lungenschadens festgestellt werden. Methodische Unterschiede könnten ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zu sein. Shan *et al.* nutzten ein 4-monatiges

Rauchexpositionsmodell, um einen strukturellen Lungenschaden zu erzeugen, während in unserem Modell nach 7 Monaten Rauchexposition ein struktureller Lungenschaden festgestellt werden konnte. Gegensätzlich zu unserem Modell war bei Shan *et al.* nach chronischer Rauchexposition eine Entzündung der Lunge mit erhöhten Zahlen an neutrophilen Granulozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen nachweisbar. Eine kürzlich erschienene Studie von Pinart *et al.* zeigte, dass die Defizienz des IL-17A-Rezeptors IL-17RA Mäusen keinen Vorteil bei der Exposition mit oxidativem Stress bietet (Pinart et al., 2013). Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen waren IL-17RA-defiziente Mäuse nicht vor einem Lungenschaden durch chronische Ozonexposition geschützt. Es konnten sogar signifikant erhöhte Emphysemwerte bei IL-17RA-defizienten Mäusen nach Ozonexposition festgestellt werden (Pinart et al., 2013). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Elastin-Expression und die Elastin-Proteinkonzentration in der Lunge durch Rauchexposition bei beiden Mausgruppen verringert waren, allerdings war dies bei den IL-17A-defizienten Mäusen schon im Grundzustand der Fall. Ein verringerter Elastin-Proteingehalt in der Lunge führte in einer Mausstudie zu einem verschlimmerten Lungenschaden nach Rauchexposition (Shifren et al., 2007). Mäuse, die heterozygot für Elastin waren, wiesen einen verringerten Elastingehalt in der Lunge auf, was nach Rauchexposition zu einer erhöhten compliance der Lunge führte (Shifren et al., 2007). Die chronische Rauchexposition führte in unserem Modell sowohl bei WT als auch bei IL-17A-defizienten Mäusen zu erhöhten Konzentrationen von G-CSF, IL-1 α , IL-1 β und IL-10 in der Lunge. Die IL-17A-Defizienz führte dazu, dass die Konzentrationen von G-CSF und IL-1 β nach Rauchexposition geringer waren als bei den WT Mäusen, wodurch sich allerdings keine Unterschiede in der Zellzusammensetzung der BALF ergaben. Da die gemessenen Zytokine in sehr geringen Konzentrationen in der Lunge vorkamen und auch durch Rauchexposition nicht stark erhöht wurden, ist keine Auswirkung dieser Zytokine auf die Entzündung oder die Lungenfunktion im chronischen Rauchmodell zu erwarten.

Eine wichtige Funktion von IL-17A in der Lunge besteht in der Immunabwehr bakterieller Pathogene, indem es auf verschiedene Zelltypen der hämatopoetischen und epithelialen Linie wirkt (Tan and Rosenthal, 2013), die dann durch Chemokin-Sekretion neutrophile Granulozyten rekrutieren (Witowski et al., 2004) oder vermehrt antimikrobielle Peptide bilden (Tsai et al., 2013). Bei einer Infektion der Lunge kommt es zu einer Entzündung mit Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6 und IL-23, die dann zur Differenzierung von Th17-Zellen führen (Nembrini et al., 2009). Wie für ein

Lungeninfektionsmodell mit *Klebsiella pneumoniae* gezeigt wurde, führt die bakterielle Stimulation über die TLR4-IL-23-Achse zur IL-17 Produktion (Happel et al., 2003;Ye et al., 2001a). IL-17 regt dann Effektorzellen zur Sekretion von Chemokinen an, was zur Rekrutierung von Makrophagen und vor allem neutrophile Granulozyten führt (Mills, 2008). Um in unserem Modell eine stabile IL-17A-Antwort auszulösen, wurden die Mäuse zusätzlich zur Rauchexposition einem NTHi-Lysat ausgesetzt. Nach 4 Wochen zeigten sich in der BALF der WT Mäuse hohe IL-17A-Konzentrationen, die durch Rauchexposition tendenziell noch erhöht wurden. In unserem Modell kam es nach Exposition mit NTHi zu einer massiven Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowohl bei WT als auch bei IL-17A-defizienten Mäusen, sodass geschlussfolgert werden kann, dass in diesem Modell nicht IL-17A allein für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach NTHi Exposition verantwortlich ist. Die Defizienz von IL-17A wurde erst durch den additiven Effekt der Rauchexposition deutlich, indem IL-17A-defiziente Mäuse nach kombinierter Rauch- und Bakterienexposition deutlich weniger neutrophile Granulozyten in der BALF hatten. In der naiven Lunge sind Makrophagen die ersten Zellen, die auf bakterielle Pathogene mit Phagozytose, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der Sekretion inflammatorischer Zytokine und Chemokine reagieren und somit andere Immunzellen in die Lunge rekrutieren (Gwyer and Hussell, 2012). Es ist wahrscheinlich, dass in diesem naiven Zustand die Defizienz von IL-17A bei wiederholter bakterieller Stimulation über 4 Wochen durch andere proinflammatorische Zytokine ausgeglichen werden kann, wohingegen die Immunantwort durch unser Modell der chronischen Rauchexposition eher gedämpft ist. Trotz der geringeren Zahl an neutrophilen Granulozyten bei den IL-17A-defizienten Mäusen nach Rauchexposition zeigten sich bei der Lungenfunktionsmessung in der totalen Lungenkapazität keine Unterschiede zwischen den Gruppen und auch kein Effekt des Rauchens. Die massiven Infiltrate in den Lungen führten jedoch dazu, dass die Lungenfunktion nur bedingt auswertbar war. Diese Daten legen nahe, dass IL-17A bei Exazerbationen der COPD, die durch NTHi ausgelöst werden, eine Rolle spielen könnte und in diesem Zusammenhang näher untersucht werden sollte. In einer kürzlich erschienen Studie von Roos *et al.* wird genau dies bestätigt. Die Autoren zeigen, dass es in rauchexponierten Mäusen nach Infektion mit lebendigen NTHi zu einer Induktion von IL-17A kam, die wahrscheinlich zur exazerbierten Neutrophilie bei diesen Mäusen beitrug (Roos et al., 2015b). Die Daten aus dem Mausmodell konnten außerdem durch klinische Daten gestützt werden. Im Sputum von COPD-Patienten mit akuter Exazerbation (AECOPD),

die durch NTHi ausgelöst wurde, wurden erhöhte Konzentrationen von IL-17A nachgewiesen. Bei AECOPD, die mit anderen Bakterien im Zusammenhang standen, war dies nicht der Fall (Roos et al., 2015b). Wie die Daten von Roos *et al.* deuten unsere Daten ebenfalls darauf hin, dass IL-17A-Expression ausschließlich durch NTHi induziert wird und Zigarettenrauch alleine nicht zu vermehrter Sekretion von IL-17A führt.

Zusammengefasst beweist unser Modell, dass IL-17A in einem sterilen Modell des rauchinduzierten Lungenschadens keine Rolle bei der Emphysementstehung spielt, jedoch zur basalen Homöostase beiträgt und sich ein Eingreifen in den IL-17-Signalweg auf die Lungenstruktur auswirkt. Die unterschiedlichen Ergebnisse aus Mausstudien unterstreichen die Wichtigkeit von klinischen Daten, um weitere Einblicke in die mögliche Rolle inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-17A, bei der Entwicklung der COPD zu erhalten.

5.4. Der Effekt der Rauchexposition auf Infektionen der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* und NTHi

Rauchen hat sowohl auf Immun- als auch auf Strukturzellen negative Effekte (Arcavi and Benowitz, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass es in den Atemwegen von Rauchern zu peribronchialer Entzündung und Fibrose, erhöhter mukosaler Permeabilität, verschlechterter mukoziliärer Klärung und Zerstörung von respiratorischen Epithelzellen kommt (Dye and Adler, 1994; Sethi and Murphy, 2008). Diese Veränderungen können dazu führen, dass eine Prädisposition für bakterielle Infektionen gegeben ist (Sethi and Murphy, 2008). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass durch Rauchen besonders bei COPD Patienten ein erhöhtes Pneumonie-Risiko, verursacht durch Pneumokokken, besteht (Arcavi and Benowitz, 2004; Huttunen et al., 2011; Nuorti et al., 2000). Die oberen Atemwege bieten Raum für bakterielle Kolonisation, die lokal begrenzt bleibt jedoch auch für Infektionen, die von dort aus die Lunge befallen oder sogar invasiv werden können (Charlson et al., 2010). *S. pneumoniae* und *H. influenzae* bilden zusammen mit anderen Bakterien die kommensale Flora des oberen respiratorischen Atemtrakts und besiedeln die nasopharyngeale Nische (Bogaert et al., 2004). Obwohl die Kolonisierung mit *S. pneumoniae* und *H. influenzae* meist symptomlos ist, kann daraus eine Atemwegsinfektion entstehen (Bogaert et al., 2004; King, 2012). Für die Lunge wurde von Taylor *et al.* in ihrer Studie an Monozyten-abstammenden

Makrophagen gezeigt, dass Makrophagen von COPD-Patienten sowohl *S. pneumoniae* als auch *H. influenzae* im Vergleich zu Makrophagen von Nichtrauchern und gesunden Rauchern schlechter phagozytieren können (Taylor et al., 2010). Für die oberen Atemwege gibt es Patienten-Daten, die zeigen, dass die effektive nasale mukosale Klärung von Bakterien durch Rauchen behindert ist (Stanley et al., 1986). Kumar *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass Rauchen eine frühe Kolonisierung sowohl mit parodontalen als auch mit respiratorischen Pathogenen, wie z.B. *Haemophilus*, in oralen Biofilmen begünstigt und dass es in Rauchern infolgedessen zu einer proinflammatorischen Antwort in oralen Biofilmen kommt (Kumar et al., 2011). Unser Infektionsmodell der Kolonisierung der oberen Atemwege von rauchexponierten Mäusen diente dazu zu untersuchen, ob Rauch die Akquirierung von potentiellen Lungenpathogenen in die oberen Atemwege begünstigt und zu Translokation von Bakterien aus den oberen Atemwegen in die Lunge führt.

5.4.1. Erhöhte bakterielle Kolonisierung und verstärkte Entzündung in den Atemwegen nach Kolonisierung der oberen Atemwege mit NTHi und *S. pneumoniae* in rauchexponierten Mäusen

In unserem Infektionsmodell nutzten wir NTHi, da sie häufig die Lungen von COPD Patienten kolonisieren und die Hauptauslöser für COPD-Exazerbationen sind (Sethi and Murphy, 2008) und *S. pneumoniae*, da Pneumokokken von den oberen Atemwegen ausgehend besonders bei Rauchern und COPD Patienten gelegentlich Pneumonien und invasive Erkrankungen verursachen (Almirall et al., 1999a;Almirall et al., 1999b;Nuorti et al., 2000). Nach Infektion der oberen Atemwege zeigte sich sowohl mit *S. pneumoniae* als auch mit NTHi eine erhöhte Kolonisierung der oberen Atemwege bei chronisch rauchexponierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Durch eine Studie an COPD-Patienten, bei der monatlich und während Exazerbationen Sputum-Proben auf die darin enthaltenen Bakterienspezies untersucht wurden, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Exazerbationen u.a. durch Bakterien ausgelöst werden, die aus der Umgebung aufgenommen werden und mit denen der Patient vorher nicht in Kontakt kam (Sethi, 2000;Sethi et al., 2002;Sethi and Murphy, 2008). Unser Modell zeigt, dass zumindest in der Maus Zigarettenrauchexposition eine Nische für typische COPD Pathogene öffnet und daher die Kolonisierung mit für den Organismus neuen Bakterien in den oberen Atemwegen begünstigt. Die Kolonisierung der

oberen Atemwege ist oft der erste Schritt zu Translokation von Bakterien in die Lunge und invasiver bakterieller Erkrankung (Beisswenger et al., 2009). Passend zu dieser Hypothese konnten wir eine verstärkte Translokation von *S. pneumoniae* von der Nase in die Lunge bei rauchexponierten Mäusen beobachten. Dies steht in Zusammenhang mit Daten von Patienten, die zeigen, dass Rauchen zu einem erhöhten Risiko von ambulant erworbener Pneumonie führt (Almirall et al., 1999a; Almirall et al., 1999b). Bei Kindern, die passivem Rauch ausgesetzt sind, besteht ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Infektionen der unteren Atemwege (Jones et al., 2011). Zudem legen unsere und die oben zitierten Studien nahe, dass ein verändertes Mikrobiom in den oberen Atemwegen von Rauchern, Passivrauchern und COPD Patienten eine Besiedelung der Lunge mit unterschiedlichen bakteriellen Spezies begünstigt. Während in der gesunden Lunge aspirierte Bakterien effizient eliminiert werden, könnte es in Lungen von Rauchern, Passivrauchern und COPD-Patienten aufgrund der beeinträchtigten pulmonalen Immunität vermehrt zu Infektionen kommen. In unserem Modell assoziierte die verstärkte Kolonisierung der oberen Atemwege nach Rauchexposition mit einer erhöhten Entzündung des gesamten Respirationstrakts. Die erhöhte Kolonisierung ging mit verstärkter Entzündung der oberen Atemwege in Form von höheren Konzentrationen von KC nach *S. pneumoniae* Infektion und verstärkter Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten und erhöhten Konzentrationen von KC, RANTES und IL-6 nach NTHi Infektion einher. Zudem waren nach Infektion mit NTHi die Zahlen an Makrophagen in der BALF und Konzentrationen von G-CSF im Lungengewebe von rauchexponierten Mäusen erhöht. Die Infektion der oberen Atemwege wirkte sich also direkt auf die Lunge aus, wobei die verstärkte Entzündung in den Atemwegen der rauchexponierten Mäuse eine Folge der verstärkten Kolonisierung zu sein scheint. Unser Modell legt nahe, dass Rauchexposition zu einer Besiedelung mit Pathogenen in den oberen Atemwegen führt, die zur Kolonisierung und Entzündung der Lunge werden kann.

5.4.2. Rauchexposition führt zu einer verminderten mukosalen Immunabwehr in den oberen Atemwegen

Einige Studien beschreiben, dass Rauchexposition zu einer verminderten Phagozytose von Bakterien durch Alveolarmakrophagen führt. Eine Studie von Berenson *et al.* zeigt, dass Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten, die rauchen oder nicht mehr rauchen, *ex vivo*

eine verschlechterte Phagozytose von NTHi im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Nichtrauchern ohne COPD zeigen, wohingegen dieser Effekt bei *S. pneumoniae* nicht beobachtet werden konnte (Berenson et al., 2013). Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie an Maus Alveolarmakrophagen, dass die *ex vivo* Komplement-vermittelte Phagozytose von *S. pneumoniae* bei gleichzeitiger Stimulation mit Zigarettenrauchextrakt vermindert ist (Phipps et al., 2010). Eine Studie von Hodge *et al.* beweist, dass nicht nur die Phagozytose von Bakterien, sondern auch die Efferozytose in Alveolarmakrophagen von rauchenden und nicht-rauchenden COPD-Patienten und gesunden Rauchern gestört ist, indem ein Phagozytose-Assay mit Alveolarmakrophagen und apoptotischen bronchialen Epithelzellen durchgeführt wurde (Hodge et al., 2007). Durch die Infektion kam es in unserem Modell sowohl bei rauchexponierten als auch bei Kontrollmäusen zu einem starken Einstrom von Immunzellen in die Atemwege, sodass ein Defekt in der Rekrutierung bei den rauchexponierten Mäusen nicht vorlag. In dieser Arbeit konnte jedoch mithilfe eines evaluierten Phagozytose-Tests gezeigt werden, dass die Phagozytoserate von Granulozyten und Monozyten aus dem Blut von rauchexponierten Mäusen bei Inkubation mit *E. coli* im Vergleich zu den Kontrollmäusen verringert ist. Da in den oberen Atemwegen im nativen Zustand nicht genügend Immunzellen vorhanden waren, wurde Vollblut verwendet. Da in den oberen Atemwegen normalerweise relativ wenige Entzündungszellen vorhanden sind und es zumindest im Mausmodell erst bei übermäßiger bakterieller Kolonisierung und Infektion der oberen Atemwege zu einem verstärkten Einstrom von Monozyten und neutrophilen Granulozyten kommt, die die Pathogene eliminieren (van Rossum et al., 2005), ist anzunehmen, dass die Entzündungszellen, die nach Infektion aus dem Blut in die oberen Atemwege einströmen, bei rauchexponierten Mäusen ebenfalls eine verringerte Phagozytoserate aufweisen. Eine verminderte Phagozytose der Bakterien könnte die erhöhte Kolonisierung der oberen Atemwege von rauchexponierten Mäusen erklären. Zudem zeigen die Versuche zur Phagozytose, dass sich Rauchexposition systemisch auf Entzündungszellen auswirkt. Eine Auswirkung von Zigarettenrauch auf Alveolarmakrophagen zeigte sich in Studien auch auf Ebene der Zytokinproduktion. Eine verminderte Sekretion von TNF- α durch Alveolarmakrophagen konnte sowohl nach *ex vivo* Stimulation von Alveolarmakrophagen aus rauchexponierten Mäusen mit NTHi (Gaschler et al., 2009) als auch an Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten, die mit NTHi-Komponenten stimuliert wurden, gezeigt werden (Berenson et al., 2006). In derselben Mausstudie zeigte sich

allerdings auch eine erhöhte Sekretion von MCP-1 durch Alveolarmakrophagen von rauchexponierten Mäusen nach NTHi-Stimulation (Gaschler et al., 2009). In einer früheren Studie von Gaschler *et al.* wurde gezeigt, dass LPS-Stimulation von Alveolarmakrophagen aus rauchexponierten Mäusen zu einer verminderten Sekretion von TNF- α , IL-6 und RANTES führt (Gaschler et al., 2008). In unserem Modell zeigte sich nach Stimulation der Alveolarmakrophagen mit NTHi und *S. pneumoniae* aus rauchexponierten Mäusen und Kontrollmäusen kein Unterschied in der Sekretion von KC. Die erhöhte bakterielle Last der Lungen der rauchexponierten Mäuse nach *S. pneumoniae* Infektion ist deshalb höchstwahrscheinlich nicht die Folge einer verminderten inflammatorischen Antwort der Alveolarmakrophagen, sondern eher die Folge der erhöhten bakteriellen Last in den oberen Atemwegen, wodurch vermehrt Bakterien in die Lunge translozieren können. Ein weiterer Grund für die erhöhte bakterielle Last in rauchexponierten Mäusen nach NTHi-Infektion könnte die verminderte epitheliale Expression des antimikrobiellen Peptids mBD-1 in den oberen Atemwegen sein. Eine erhöhte Anfälligkeit für *H. influenzae* Infektionen der Lunge konnte bereits bei mBD-1-defizienten Mäusen gezeigt werden (Moser et al., 2002). Eine durch Zigarettenrauchexposition verursachte verminderte Expression antimikrobieller Peptide ist auch bei Menschen bekannt. In einer Studie von Herr *et al.* konnten verringerte Konzentrationen von hBD-2 in der pharyngealen Waschflüssigkeit und im Sputum von Rauchern oder Ex-Rauchern mit akuter Pneumonie nachgewiesen werden (Herr et al., 2009). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die Rauchexposition von respiratorischen Epithelzellen in einer Unterdrückung von zellulären Signalkaskaden (z.B. AP-1 und NF- κ B-anhängige Signalkaskaden) resultiert, die eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von angeborenen Immunmechanismen im Falle einer mikrobiellen Infektion spielen (Kulkarni et al., 2010; Laan et al., 2004; Manzel et al., 2011). Dies bedeutet, dass Rauchexposition *in vitro* zu einer verminderten Expression und Sekretion inflammatorischer Mediatoren und antimikrobieller Peptide durch respiratorische Epithelzellen, die mit bakteriellen Pathogenen infiziert sind, kommt (Herr et al., 2009; Kulkarni et al., 2010; Laan et al., 2004; Manzel et al., 2011; Pfeifer et al., 2013). Zigarettenrauchexposition beeinflusst darüber hinaus auch die Adhäsion von Bakterien an epitheliale Oberflächen. Verschiedene Studien zeigen eine erhöhte Adhäsion von Bakterien an bukkale Epithelzellen und an Epithelzellen der unteren Atemwege von Rauchern (El Ahmer et al., 1999; Grigg et al., 2012; Raman et al., 1983). Ein ähnliches Bild ist auch für die Epithelzellen der oberen Atemwege der rauchexponierten Mäuse denkbar.

Zusammen mit der verringerten Expression von mBD-1 nach NTHi-Infektion und der verminderten Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten könnte dies ein potentieller Mechanismus für eine erhöhte bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege durch Zigarettenrauch sein.

5.5. Schlussbemerkung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Deletion des NF- κ B-Proteins p65 in myeloiden Zellen, des NF- κ B-Inhibitors I κ B α in myeloiden Zellen oder des proinflammatorischen Zytokins IL-17A systemisch im Mausmodell im Grundzustand und nach Rauchexposition zur Störung der Lungenhomöostase auf Ebene der Entzündungszellen, der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und der Lungenfunktion und -struktur führt. Eine schützende Funktion der Deletion von IL-17A bei Rauchexposition von Mäusen konnte durch unsere Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr konnten wir zeigen, dass IL-17A erst nach zusätzlicher bakterieller Stimulation vermehrt sekretiert wird und hier zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beiträgt. IL-17A bietet sich daher möglicherweise als therapeutisches Ziel bei akuten Exazerbationen der COPD an.

Eine deregulierte Aktivierung von NF- κ B in myeloiden Zellen, sei es Suppression durch Deletion von p65 oder Überaktivierung durch Deletion von I κ B α , führte in unserem Modell zum Verlust an Lungenfunktion und -struktur und verstärkter Entzündung sowohl im Grundzustand als auch nach Rauchexposition. Der myeloide NF- κ B-Signalweg bietet sich daher nicht als therapeutisches Ziel bei Rauchern und COPD-Patienten an.

Desweiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Rauchexposition im Mausmodell die bakterielle Kolonisierung der oberen Atemwege begünstigt und zu einer verstärkten Entzündung der oberen Atemwege und der Lunge durch Translokation der Bakterien in die unteren Atemwege führt.

6. Literaturverzeichnis

- Alam, R., D. Kumar, D. Anderson-Walters, and P. A. Forsythe, 1994, Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo: *J.Immunol.*, v. 152, no. 3, p. 1298-1303.
- Albertsson, P., M. H. Kim, L. E. Jonges, R. P. Kitson, P. J. Kuppen, B. R. Johansson, U. Nannmark, and R. H. Goldfarb, 2000, Matrix metalloproteinases of human NK cells: *In Vivo*, v. 14, no. 1, p. 269-276.
- Algul, H., M. Treiber, M. Lesina, H. Nakhai, D. Saur, F. Geisler, A. Pfeifer, S. Paxian, and R. M. Schmid, 2007a, Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis: *J.Clin.Invest*, v. 117, no. 6, p. 1490-1501.
- Algul, H., M. Treiber, M. Lesina, H. Nakhai, D. Saur, F. Geisler, A. Pfeifer, S. Paxian, and R. M. Schmid, 2007b, Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis: *J.Clin.Invest*, v. 117, no. 6, p. 1490-1501.
- Almirall, J., I. Bolibar, X. Balanzo, and C. A. Gonzalez, 1999a, Risk factors for community-acquired pneumonia in adults: a population-based case-control study: *Eur.Respir.J.*, v. 13, no. 2, p. 349-355.
- Almirall, J., C. A. Gonzalez, X. Balanzo, and I. Bolibar, 1999b, Proportion of community-acquired pneumonia cases attributable to tobacco smoking: *Chest*, v. 116, no. 2, p. 375-379.
- Arcavi, L., and N. L. Benowitz, 2004, Cigarette smoking and infection: *Arch.Intern.Med.*, v. 164, no. 20, p. 2206-2216.
- Atkinson, J. J. et al., 2011, The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 183, no. 7, p. 876-884.
- Atkinson, J. J., and R. M. Senior, 2003, Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 28, no. 1, p. 12-24.
- Babusyte, A., K. Stravinskaite, J. Jeroch, J. Lotvall, R. Sakalauskas, and B. Sitkauskiene, 2007, Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD: *Respir.Res.*, v. 8, p. 81.
- Barnes, P. J., 2004a, Alveolar macrophages as orchestrators of COPD: *COPD*, v. 1, no. 1, p. 59-70.
- Barnes, P. J., 2004b, Mediators of chronic obstructive pulmonary disease: *Pharmacol.Rev.*, v. 56, no. 4, p. 515-548.

Barnes, P. J., 2008, The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: *J.Clin.Invest*, v. 118, no. 11, p. 3546-3556.

Barnes, P. J., I. M. Adcock, and K. Ito, 2005, Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases: *Eur.Respir.J.*, v. 25, no. 3, p. 552-563.

Barnes, P. J., and M. G. Cosio, 2004, Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease: *PLoS.Med.*, v. 1, no. 1, p. e20.

Bartholome, E. J., A. Van, I, E. Koyen, R. Kiss, F. Willems, M. Goldman, and G. Opdenakker, 2001, Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta: *J.Interferon Cytokine Res.*, v. 21, no. 7, p. 495-501.

Bates, J. H., and C. G. Irvin, 2003, Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle: *J.Appl.Physiol* (1985.), v. 94, no. 4, p. 1297-1306.

Beisswenger, C., E. S. Lysenko, and J. N. Weiser, 2009, Early bacterial colonization induces toll-like receptor-dependent transforming growth factor beta signaling in the epithelium: *Infect.Immun.*, v. 77, no. 5, p. 2212-2220.

Berenson, C. S., R. L. Kruzel, E. Eberhardt, and S. Sethi, 2013, Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease: *J.Infect.Dis.*, v. 208, no. 12, p. 2036-2045.

Berenson, C. S., C. T. Wrona, L. J. Grove, J. Maloney, M. A. Garlipp, P. K. Wallace, C. C. Stewart, and S. Sethi, 2006, Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 174, no. 1, p. 31-40.

Bogaert, D., G. R. de, and P. W. Hermans, 2004, *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease: *Lancet Infect.Dis.*, v. 4, no. 3, p. 144-154.

Borregaard, N., and J. B. Cowland, 1997, Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte: *Blood*, v. 89, no. 10, p. 3503-3521.

Boschetto, P. et al., 2006, Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease: *Thorax*, v. 61, no. 12, p. 1037-1042.

Botelho, F. M. et al., 2011, IL-1alpha/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice: *PLoS.One.*, v. 6, no. 12, p. e28457.

Broide, D. H., T. Lawrence, T. Doherty, J. Y. Cho, M. Miller, K. McElwain, S. McElwain, and M. Karin, 2005, Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by I κ B kinase beta-dependent genes in airway epithelium: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 102, no. 49, p. 17723-17728.

Brook, I., and A. E. Gober, 2005, Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of otitis media-prone children and their smoking and nonsmoking parents: *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.*, v. 131, no. 6, p. 509-512.

Brown, K. D., S. M. Zurawski, T. R. Mosmann, and G. Zurawski, 1989, A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes: *J.Immunol.*, v. 142, no. 2, p. 679-687.

Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards, and D. M. Mosser, 2006, NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages: *J.Biol.Chem.*, v. 281, no. 36, p. 26041-26050.

Cao, Y., W. Gong, H. Zhang, B. Liu, B. Li, X. Wu, X. Duan, and J. Dong, 2012, A comparison of serum and sputum inflammatory mediator profiles in patients with asthma and COPD: *J.Int.Med.Res.*, v. 40, no. 6, p. 2231-2242.

Caramori, G. et al., 2003, Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations: *Thorax*, v. 58, no. 4, p. 348-351.

Cepinskas, G., M. Sandig, and P. R. Kvietys, 1999, PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front: *J.Cell Sci.*, v. 112 (Pt 12), p. 1937-1945.

Chang, Y., J. Nadigel, N. Boulais, J. Bourbeau, F. Maltais, D. H. Eidelman, and Q. Hamid, 2011, CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease: *Respir.Res.*, v. 12, p. 43.

Charlson, E. S., J. Chen, R. Custers-Allen, K. Bittinger, H. Li, R. Sinha, J. Hwang, F. D. Bushman, and R. G. Collman, 2010, Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers: *PLoS.One.*, v. 5, no. 12, p. e15216.

Chaudhuri, R. et al., 2012, Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 129, no. 3, p. 655-663.

Chen, K. et al., 2011, IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke: *PLoS.One.*, v. 6, no. 5, p. e20333.

Chrysofakis, G., N. Tzanakis, D. Kyriakoy, M. Tsoumakidou, I. Tsiligianni, M. Klimathianaki, and N. M. Siafakas, 2004, Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD: *Chest*, v. 125, no. 1, p. 71-76.

Chung, K. F., 2001, Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease: *Eur.Respir.J.Suppl*, v. 34, p. 50s-59s.

Churg, A., M. Cosio, and J. L. Wright, 2008, Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 294, no. 4, p. L612-L631.

Churg, A., D. D. Sin, and J. L. Wright, 2011, Everything prevents emphysema: are animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease any use?: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 45, no. 6, p. 1111-1115.

Churg, A., S. Zhou, X. Wang, R. Wang, and J. L. Wright, 2009, The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 40, no. 4, p. 482-490.

Churg, A., S. Zhou, and J. L. Wright, 2012, Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD: *Eur.Respir.J.*, v. 39, no. 1, p. 197-209.

Clausen, B. E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Forster, 1999, Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice: *Transgenic Res.*, v. 8, no. 4, p. 265-277.

Cosio, M. G., M. Saetta, and A. Agusti, 2009, Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease: *N.Engl.J.Med.*, v. 360, no. 23, p. 2445-2454.

Datta, S., M. Novotny, P. G. Pavicic, Jr., C. Zhao, T. Herjan, J. Hartupee, and T. Hamilton, 2010, IL-17 regulates CXCL1 mRNA stability via an AUUUA/tristetraprolin-independent sequence: *J.Immunol.*, v. 184, no. 3, p. 1484-1491.

Davey, A., D. F. McAuley, and C. M. O'Kane, 2011, Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair: *Eur.Respir.J.*, v. 38, no. 4, p. 959-970.

de Boer, W. I., J. K. Sont, S. A. van, J. Stolk, J. H. van Krieken, and P. S. Hiemstra, 2000, Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD: *J.Pathol.*, v. 190, no. 5, p. 619-626.

De, F. K., R. B. Henderson, M. Laschinger, and N. Hogg, 2008, Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways: *J.Immunol.*, v. 180, no. 6, p. 4308-4315.

De, H. M., J. M. Kerst, C. E. van der Schoot, J. Calafat, C. E. Hack, J. H. Nuijens, D. Roos, R. H. van Oers, and A. E. von dem Borne, 1994, Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils: *Blood*, v. 84, no. 11, p. 3885-3894.

Decramer, M., W. Janssens, and M. Miravittles, 2012, Chronic obstructive pulmonary disease: *Lancet*, v. 379, no. 9823, p. 1341-1351.

Del, P. G., C. M. de, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, and S. Romagnani, 1993, Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production: *J.Immunol.*, v. 150, no. 2, p. 353-360.

Demedts, I. K., G. G. Brusselle, K. R. Bracke, K. Y. Vermaelen, and R. A. Pauwels, 2005, Matrix metalloproteinases in asthma and COPD: *Curr.Opin.Pharmacol.*, v. 5, no. 3, p. 257-263.

Demedts, I. K., A. Morel-Montero, S. Lebecque, Y. Pacheco, D. Cataldo, G. F. Joos, R. A. Pauwels, and G. G. Brusselle, 2006, Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD: *Thorax*, v. 61, no. 3, p. 196-201.

Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya, 2009, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview: *J.Interferon Cytokine Res.*, v. 29, no. 6, p. 313-326.

Di, S. A. et al., 1998, Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 158, no. 4, p. 1277-1285.

Di, S. A. et al., 2004, STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease: *Eur.Respir.J.*, v. 24, no. 1, p. 78-85.

Di, S. A. et al., 2009, T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 157, no. 2, p. 316-324.

Di, S. A. et al., 2002, Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD: *Eur.Respir.J.*, v. 20, no. 3, p. 556-563.

Di, Y. P., J. Zhao, and R. Harper, 2012, Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1: *J.Biol.Chem.*, v. 287, no. 33, p. 27948-27958.

Doe, C. et al., 2010, Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD: *Chest*, v. 138, no. 5, p. 1140-1147.

Donaldson, G. C., T. A. Seemungal, A. Bhowmik, and J. A. Wedzicha, 2002, Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease: *Thorax*, v. 57, no. 10, p. 847-852.

Driscoll, K. E., 1994, Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation: *Exp.Lung Res.*, v. 20, no. 6, p. 473-490.

Dye, J. A., and K. B. Adler, 1994, Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract: *Thorax*, v. 49, no. 8, p. 825-834.

El Ahmer, O. R., S. D. Essery, A. T. Saadi, M. W. Raza, M. M. Ogilvie, D. M. Weir, and C. C. Blackwell, 1999, The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells: *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, v. 23, no. 1, p. 27-36.

Elias, J. A., M. J. Kang, K. Crothers, R. Homer, and C. G. Lee, 2006, State of the art. Mechanistic heterogeneity in chronic obstructive pulmonary disease: insights from transgenic mice: *Proc.Am.Thorac.Soc.*, v. 3, no. 6, p. 494-498.

Elkington, P. T., and J. S. Friedland, 2006, Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology: *Thorax*, v. 61, no. 3, p. 259-266.

Engsig, M. T. et al., 2000, Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones: *J.Cell Biol.*, v. 151, no. 4, p. 879-889.

Fahey, T. J., III, K. J. Tracey, P. Tekamp-Olson, L. S. Cousens, W. G. Jones, G. T. Shires, A. Cerami, and B. Sherry, 1992, Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function: *J.Immunol.*, v. 148, no. 9, p. 2764-2769.

- Fehrenbach, H., 2006, Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective: *Eur Respir Rev* 2006; 15: 101, 136–147
- Finkelstein, R., R. S. Fraser, H. Ghezzi, and M. G. Cosio, 1995, Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 152, no. 5 Pt 1, p. 1666-1672.
- Finlay, G. A., L. R. O'Driscoll, K. J. Russell, E. M. D'Arcy, J. B. Masterson, M. X. Fitzgerald, and C. M. O'Connor, 1997, Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 156, no. 1, p. 240-247.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann, 1989, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones: *J.Exp.Med.*, v. 170, no. 6, p. 2081-2095.
- Floreani, A. A., T. A. Wyatt, J. Stoner, S. D. Sanderson, E. G. Thompson, D. Allen-Gipson, and A. J. Heires, 2003, Smoke and C5a induce airway epithelial intercellular adhesion molecule-1 and cell adhesion: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 29, no. 4, p. 472-482.
- Fuke, S., T. Betsuyaku, Y. Nasuhara, T. Morikawa, H. Katoh, and M. Nishimura, 2004, Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 31, no. 4, p. 405-412.
- Gaffen, S. L., 2009, Structure and signalling in the IL-17 receptor family: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 9, no. 8, p. 556-567.
- Garmendia, J., P. Morey, and J. A. Bengoechea, 2012, Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions: *Eur.Respir.J.*, v. 39, no. 2, p. 467-477.
- Gaschler, G. J., M. Skrtic, C. C. Zavitz, M. Lindahl, P. O. Onnervik, T. F. Murphy, S. Sethi, and M. R. Stampfli, 2009, Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 179, no. 8, p. 666-675.
- Gaschler, G. J., C. C. Zavitz, C. M. Bauer, M. Skrtic, M. Lindahl, C. S. Robbins, B. Chen, and M. R. Stampfli, 2008, Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 38, no. 2, p. 218-226.
- Ginhoux, F., and S. Jung, 2014, Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 14, no. 6, p. 392-404.
- Goossens, P. et al., 2011, Myeloid I κ B α deficiency promotes atherogenesis by enhancing leukocyte recruitment to the plaques: *PLoS.One.*, v. 6, no. 7, p. e22327.
- Greenberg, D., N. Givon-Lavi, A. Broides, I. Blancovich, N. Peled, and R. Dagan, 2006, The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers: *Clin.Infect.Dis.*, v. 42, no. 7, p. 897-903.

- Grigg, J. et al., 2012, Cigarette smoke and platelet-activating factor receptor dependent adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to lower airway cells: *Thorax*, v. 67, no. 10, p. 908-913.
- Gueders, M. M., J. M. Foidart, A. Noel, and D. D. Cataldo, 2006, Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 533, no. 1-3, p. 133-144.
- Guerrassimov, A. et al., 2004, The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 170, no. 9, p. 974-980.
- Guilliams, M. et al., 2013, Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF: *J.Exp.Med.*, v. 210, no. 10, p. 1977-1992.
- Gwyer, F. E., and T. Hussell, 2012, Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung: *Mediators.Inflamm.*, v. 2012, p. 140937.
- Halbert, R. J., J. L. Natoli, A. Gano, E. Badamgarav, A. S. Buist, and D. M. Mannino, 2006, Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis: *Eur.Respir.J.*, v. 28, no. 3, p. 523-532.
- Han, W., M. Joo, M. B. Everhart, J. W. Christman, F. E. Yull, and T. S. Blackwell, 2009, Myeloid cells control termination of lung inflammation through the NF-kappaB pathway: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 296, no. 3, p. L320-L327.
- Happel, K. I. et al., 2003, Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection: *J.Immunol.*, v. 170, no. 9, p. 4432-4436.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver, 2005, Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages: *Nat.Immunol.*, v. 6, no. 11, p. 1123-1132.
- Hartupée, J., C. Liu, M. Novotny, X. Li, and T. Hamilton, 2007, IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization: *J.Immunol.*, v. 179, no. 6, p. 4135-4141.
- Hautamaki, R. D., D. K. Kobayashi, R. M. Senior, and S. D. Shapiro, 1997, Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice: *Science*, v. 277, no. 5334, p. 2002-2004.
- Hawrylowicz, C. M., 2005, Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation: *J.Exp.Med.*, v. 202, no. 11, p. 1459-1463.
- Hellermann, G. R., S. B. Nagy, X. Kong, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra, 2002, Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells: *Respir.Res.*, v. 3, p. 22.

Hens, G., B. M. Vanaudenaerde, D. M. Bullens, M. Piessens, M. Decramer, L. J. Dupont, J. L. Ceuppens, and P. W. Hellings, 2008, Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: 'united airway disease' beyond the scope of allergy: *Allergy*, v. 63, no. 3, p. 261-267.

Hermant, B., S. Bibert, E. Concord, B. Dublet, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac, 2003, Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 16, p. 14002-14012.

Herold, S., K. Mayer, and J. Lohmeyer, 2011, Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair: *Front Immunol.*, v. 2, p. 65.

Herr, C., C. Beisswenger, C. Hess, K. Kandler, N. Suttorp, T. Welte, J. M. Schroeder, and C. Vogelmeier, 2009, Suppression of pulmonary innate host defence in smokers: *Thorax*, v. 64, no. 2, p. 144-149.

Hess, C., C. Herr, C. Beisswenger, T. Zakharkina, R. M. Schmid, and R. Bals, 2010, Myeloid RelA regulates pulmonary host defense networks: *Eur.Respir.J.*, v. 35, no. 2, p. 343-352.

Hirano, T., 1998, Interleukin 6 and its receptor: ten years later: *Int.Rev.Immunol.*, v. 16, no. 3-4, p. 249-284.

Hirota, K. et al., 2011, Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses: *Nat.Immunol.*, v. 12, no. 3, p. 255-263.

Hodge, S., G. Hodge, J. Ahern, H. Jersmann, M. Holmes, and P. N. Reynolds, 2007, Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 37, no. 6, p. 748-755.

Hoenderdos, K., and A. Condliffe, 2013, The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 48, no. 5, p. 531-539.

Hoffmann, R. F. et al., 2013, Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells: *Respir.Res.*, v. 14, p. 97.

Hogg, J. C. et al., 2004, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease: *N.Engl.J.Med.*, v. 350, no. 26, p. 2645-2653.

Houghton, A. M., P. A. Quintero, D. L. Perkins, D. K. Kobayashi, D. G. Kelley, L. A. Marconcini, R. P. Mecham, R. M. Senior, and S. D. Shapiro, 2006, Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema: *J.Clin.Invest*, v. 116, no. 3, p. 753-759.

Hoymann, H. G., 2006, New developments in lung function measurements in rodents: *Exp.Toxicol.Pathol.*, v. 57 Suppl 2, p. 5-11.

Hsia, C. C., D. M. Hyde, M. Ochs, and E. R. Weibel, 2010, An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 181, no. 4, p. 394-418.

- Hunninghake, G. W., J. M. Davidson, S. Rennard, S. Szapiel, J. E. Gadek, and R. G. Crystal, 1981, Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema: *Science*, v. 212, no. 4497, p. 925-927.
- Hussell, T., and T. J. Bell, 2014, Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 14, no. 2, p. 81-93.
- Huttunen, R., T. Heikkinen, and J. Syrjanen, 2011, Smoking and the outcome of infection: *J.Intern.Med.*, v. 269, no. 3, p. 258-269.
- Illumets, H., P. Ryttila, I. Demedts, G. G. Brusselle, A. Sovijarvi, M. Myllarniemi, T. Sorsa, and V. L. Kinnula, 2007, Matrix metalloproteinases -8, -9 and -12 in smokers and patients with stage 0 COPD: *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis.*, v. 2, no. 3, p. 369-379.
- Imai, K., S. S. Dalal, E. S. Chen, R. Downey, L. L. Schulman, M. Ginsburg, and J. D'Armiento, 2001, Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 163, no. 3 Pt 1, p. 786-791.
- Irvin, C. G., and J. H. Bates, 2003, Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size: *Respir.Res.*, v. 4, p. 4.
- Jha, P., and R. Peto, 2014, Global effects of smoking, of quitting, and of taxing tobacco: *N.Engl.J.Med.*, v. 370, no. 1, p. 60-68.
- John, G., K. Kohse, J. Orasche, A. Reda, J. Schnelle-Kreis, R. Zimmermann, O. Schmid, O. Eickelberg, and A. O. Yildirim, 2014, The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models: *Clin.Sci.(Lond)*, v. 126, no. 3, p. 207-221.
- John-Schuster, G., K. Hager, T. M. Conlon, M. Irmeler, J. Beckers, O. Eickelberg, and A. O. Yildirim, 2014, Cigarette smoke-induced iBALT mediates macrophage activation in a B cell-dependent manner in COPD: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 307, no. 9, p. L692-L706.
- Jones, J. G., B. D. Minty, P. Lawler, G. Hulands, J. C. Crawley, and N. Veall, 1980, Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers: *Lancet*, v. 1, no. 8159, p. 66-68.
- Jones, L. L., A. Hashim, T. McKeever, D. G. Cook, J. Britton, and J. Leonardi-Bee, 2011, Parental and household smoking and the increased risk of bronchitis, bronchiolitis and other lower respiratory infections in infancy: systematic review and meta-analysis: *Respir.Res.*, v. 12, p. 5.
- Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schroder, 1992, Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils: *J.Exp.Med.*, v. 176, no. 2, p. 587-592.
- Kanbe, N., A. Tanaka, M. Kanbe, A. Itakura, M. Kurosawa, and H. Matsuda, 1999, Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9: *Eur.J.Immunol.*, v. 29, no. 8, p. 2645-2649.

Kao, C. Y., Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, F. Huang, C. Kim, R. W. Harper, and R. Wu, 2004, IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways: *J.Immunol.*, v. 173, no. 5, p. 3482-3491.

Karimi, R., G. Tornling, J. Grunewald, A. Eklund, and C. M. Skold, 2012, Cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid in smokers is dependent on cumulative smoking history: *PLoS.One.*, v. 7, no. 3, p. e34232.

Keatings, V. M., P. D. Collins, D. M. Scott, and P. J. Barnes, 1996, Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 153, no. 2, p. 530-534.

Kenagy, R. D., and A. W. Clowes, 1994, A possible role for MMP-2 and MMP-9 in the migration of primate arterial smooth muscle cells through native matrix: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 732, p. 462-465.

Khwaja, A., J. E. Carver, and D. C. Linch, 1992, Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst: *Blood*, v. 79, no. 3, p. 745-753.

King, P., 2012, *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung): *Clin.Transl.Med.*, v. 1, no. 1, p. 10.

Kirby, A. C., D. J. Newton, S. R. Carding, and P. M. Kaye, 2007, Pulmonary dendritic cells and alveolar macrophages are regulated by gammadelta T cells during the resolution of *S. pneumoniae*-induced inflammation: *J.Pathol.*, v. 212, no. 1, p. 29-37.

Klement, J. F., N. R. Rice, B. D. Car, S. J. Abbondanzo, G. D. Powers, P. H. Bhatt, C. H. Chen, C. A. Rosen, and C. L. Stewart, 1996, IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice: *Mol.Cell Biol.*, v. 16, no. 5, p. 2341-2349.

Korkmaz, B., M. S. Horwitz, D. E. Jenne, and F. Gauthier, 2010, Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases: *Pharmacol.Rev.*, v. 62, no. 4, p. 726-759.

Kuang, P. P., J. L. Berk, D. C. Rishikof, J. A. Foster, D. E. Humphries, D. A. Ricupero, and R. H. Goldstein, 2002, NF-kappaB induced by IL-1beta inhibits elastin transcription and myofibroblast phenotype: *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 283, no. 1, p. C58-C65.

Kuang, P. P., and R. H. Goldstein, 2003, Regulation of elastin gene transcription by interleukin-1 beta-induced C/EBP beta isoforms: *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 285, no. 6, p. C1349-C1355.

Kuipers, I., K. R. Bracke, G. G. Brusselle, S. W. Aesif, R. Krijgsman, I. C. Arts, E. F. Wouters, and N. L. Reynaert, 2012, Altered cigarette smoke-induced lung inflammation due to ablation of *Grx1*: *PLoS.One.*, v. 7, no. 6, p. e38984.

Kulkarni, R., R. Rampersaud, J. L. Aguilar, T. M. Randis, J. L. Kreindler, and A. J. Ratner, 2010, Cigarette smoke inhibits airway epithelial cell innate immune responses to bacteria: *Infect.Immun.*, v. 78, no. 5, p. 2146-2152.

- Kumar, P. S., C. R. Matthews, V. Joshi, J. M. de, and M. Aspiras, 2011, Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms: *Infect.Immun.*, v. 79, no. 11, p. 4730-4738.
- Kuschner, W. G., A. D'Alessandro, H. Wong, and P. D. Blanc, 1996, Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults: *Eur.Respir.J.*, v. 9, no. 10, p. 1989-1994.
- Kwon, O. J., P. J. Jose, R. A. Robbins, T. J. Schall, T. J. Williams, and P. J. Barnes, 1995, Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 12, no. 5, p. 488-496.
- Laan, M., S. Bozinovski, and G. P. Anderson, 2004, Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells: *J.Immunol.*, v. 173, no. 6, p. 4164-4170.
- Laan, M., J. Lotvall, K. F. Chung, and A. Linden, 2001, IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases: *Br.J.Pharmacol.*, v. 133, no. 1, p. 200-206.
- Lacoste, J. Y. et al., 1993, Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 92, no. 4, p. 537-548.
- LaPan, P., J. Brady, C. Grierson, M. Fleming, D. Miller, J. Sypek, and B. Fu, 2010, Optimization of total protein and activity assays for the detection of MMP-12 in induced human sputum: *BMC.Pulm.Med.*, v. 10, p. 40.
- Lavigne, M. C. et al., 2004, Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 324, no. 2, p. 534-546.
- Lee, J., G. Cacalano, T. Camerato, K. Toy, M. W. Moore, and W. I. Wood, 1995, Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor: *J.Immunol.*, v. 155, no. 4, p. 2158-2164.
- Legrand, C., C. Gilles, J. M. Zahm, M. Polette, A. C. Buisson, H. Kaplan, P. Birembaut, and J. M. Tournier, 1999, Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling: *J.Cell Biol.*, v. 146, no. 2, p. 517-529.
- Li, D. et al., 2014a, Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/beta-catenin signaling in murine and human tumor cells: *Oncogene*, v. 33, no. 10, p. 1239-1248.
- Li, J. R., W. X. Zhou, K. W. Huang, Y. Jin, and J. M. Gao, 2014b, Interleukin-22 exacerbates airway inflammation induced by short-term exposure to cigarette smoke in mice: *Acta Pharmacol.Sin.*, v. 35, no. 11, p. 1393-1401.
- Li, Q., and I. M. Verma, 2002, NF-kappaB regulation in the immune system: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, no. 10, p. 725-734.

- Lim, S., N. Roche, B. G. Oliver, W. Mattos, P. J. Barnes, and K. F. Chung, 2000, Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 162, no. 4 Pt 1, p. 1355-1360.
- Liou, H. C., 2002, Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB: *J.Biochem.Mol.Biol.*, v. 35, no. 6, p. 537-546.
- Liu, Z., X. Zhou, S. D. Shapiro, J. M. Shipley, S. S. Twining, L. A. Diaz, R. M. Senior, and Z. Werb, 2000, The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo: *Cell*, v. 102, no. 5, p. 647-655.
- Loffek, S., O. Schilling, and C. W. Franzke, 2011, Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance: *Eur.Respir.J.*, v. 38, no. 1, p. 191-208.
- Lord, B. I., M. H. Bronchud, S. Owens, J. Chang, A. Howell, L. Souza, and T. M. Dexter, 1989, The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 86, no. 23, p. 9499-9503.
- Lowrey, G. E., N. Henderson, J. D. Blakey, J. M. Corne, and S. R. Johnson, 2008, MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD: *Respir.Med.*, v. 102, no. 6, p. 845-851.
- Lu, Y. J. et al., 2008, Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization: *PLoS.Pathog.*, v. 4, no. 9, p. e1000159.
- Lukacs, N. W., T. J. Standiford, S. W. Chensue, R. G. Kunkel, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel, 1996, C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation: *J.Leukoc.Biol.*, v. 60, no. 5, p. 573-578.
- Lukacs, N. W., R. M. Strieter, K. Warmington, P. Lincoln, S. W. Chensue, and S. L. Kunkel, 1997, Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation: *J.Immunol.*, v. 158, no. 9, p. 4398-4404.
- Maghazachi, A. A., A. al-Aoukaty, and T. J. Schall, 1994, C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins: *J.Immunol.*, v. 153, no. 11, p. 4969-4977.
- Majo, J., H. Ghezzi, and M. G. Cosio, 2001, Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema: *Eur.Respir.J.*, v. 17, no. 5, p. 946-953.
- Manzel, L. J., L. Shi, P. T. O'Shaughnessy, P. S. Thorne, and D. C. Look, 2011, Inhibition by cigarette smoke of nuclear factor-kappaB-dependent response to bacteria in the airway: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 44, no. 2, p. 155-165.
- Marfaing-Koka, A., O. Devergne, G. Gorgone, A. Portier, T. J. Schall, P. Galanaud, and D. Emilie, 1995, Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells.

Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13: *J.Immunol.*, v. 154, no. 4, p. 1870-1878.

Masubuchi, T., S. Koyama, E. Sato, A. Takamizawa, K. Kubo, M. Sekiguchi, S. Nagai, and T. Izumi, 1998, Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity: *Am.J.Pathol.*, v. 153, no. 6, p. 1903-1912.

Maus, U. A., S. Janzen, G. Wall, M. Srivastava, T. S. Blackwell, J. W. Christman, W. Seeger, T. Welte, and J. Lohmeyer, 2006, Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 35, no. 2, p. 227-235.

Mauviel, A., Y. Q. Chen, V. M. Kahari, I. Ledo, M. Wu, L. Rudnicka, and J. Uitto, 1993, Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo: *J.Biol.Chem.*, v. 268, no. 9, p. 6520-6524.

Mehrad, B., R. M. Strieter, T. A. Moore, W. C. Tsai, S. A. Lira, and T. J. Standiford, 1999, CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis: *J.Immunol.*, v. 163, no. 11, p. 6086-6094.

Mehta, H., K. Nazzal, and R. T. Sadikot, 2008, Cigarette smoking and innate immunity: *Inflamm.Res.*, v. 57, no. 11, p. 497-503.

Mercer, P. F., J. K. Shute, A. Bhowmik, G. C. Donaldson, J. A. Wedzicha, and J. A. Warner, 2005, MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation: *Respir.Res.*, v. 6, p. 151.

Meurer, R., R. G. Van, W. Feeney, P. Cunningham, D. Hora, Jr., M. S. Springer, D. E. MacIntyre, and H. Rosen, 1993, Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8: *J.Exp.Med.*, v. 178, no. 6, p. 1913-1921.

Mills, K. H., 2008, Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells: *Eur.J.Immunol.*, v. 38, no. 10, p. 2636-2649.

Mio, T., D. J. Romberger, A. B. Thompson, R. A. Robbins, A. Heires, and S. I. Rennard, 1997, Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 155, no. 5, p. 1770-1776.

Moghaddam, S. J., C. E. Ochoa, S. Sethi, and B. F. Dickey, 2011, Nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis.*, v. 6, p. 113-123.

Morrison, H. M., D. Burnett, and R. A. Stockley, 1986a, The effect of catalase and methionine-S-oxide reductase on oxidised alpha 1-proteinase inhibitor: *Biol.Chem.Hoppe Seyler*, v. 367, no. 5, p. 371-378.

Morrison, H. M., J. A. Kramps, S. C. Afford, D. Burnett, J. H. Dijkman, and R. A. Stockley, 1987, Elastase inhibitors in sputum from bronchitic patients with and without alpha 1-proteinase inhibitor deficiency: partial characterization of a hitherto unquantified inhibitor of neutrophil elastase: *Clin.Sci.(Lond)*, v. 73, no. 1, p. 19-28.

Morrison, H. M., J. A. Kramps, J. H. Dijkman, and R. A. Stockley, 1986b, Comparison of concentrations of two proteinase inhibitors, porcine pancreatic elastase inhibitory capacity, and cell profiles in sequential bronchoalveolar lavage samples: *Thorax*, v. 41, no. 6, p. 435-441.

Moser, C., D. J. Weiner, E. Lysenko, R. Bals, J. N. Weiser, and J. M. Wilson, 2002, beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice: *Infect.Immun.*, v. 70, no. 6, p. 3068-3072.

Motz, G. T., B. L. Eppert, G. Sun, S. C. Wesselkamper, M. J. Linke, R. Deka, and M. T. Borchers, 2008, Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema: *J.Immunol.*, v. 181, no. 11, p. 8036-8043.

Motz, G. T., B. L. Eppert, S. C. Wesselkamper, J. L. Flury, and M. T. Borchers, 2010, Chronic cigarette smoke exposure generates pathogenic T cells capable of driving COPD-like disease in Rag2^{-/-} mice: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 181, no. 11, p. 1223-1233.

Murphy, J., R. Summer, A. A. Wilson, D. N. Kotton, and A. Fine, 2008, The prolonged life-span of alveolar macrophages: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 38, no. 4, p. 380-385.

Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura, 2002, Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses: *Immunity.*, v. 17, no. 3, p. 375-387.

Nelson, A. L., A. M. Roche, J. M. Gould, K. Chim, A. J. Ratner, and J. N. Weiser, 2007, Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance: *Infect.Immun.*, v. 75, no. 1, p. 83-90.

Nelson, P. J., H. T. Kim, W. C. Manning, T. J. Goralski, and A. M. Krensky, 1993, Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene: *J.Immunol.*, v. 151, no. 5, p. 2601-2612.

Nembrini, C., B. J. Marsland, and M. Kopf, 2009, IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation: *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 123, no. 5, p. 986-994.

Nenan, S., J. M. Planquois, P. Berna, M. De, I, S. Hitier, S. D. Shapiro, E. Boichot, V. Lagente, and C. P. Bertrand, 2005, Analysis of the inflammatory response induced by rhMMP-12 catalytic domain instilled in mouse airways: *Int.Immunopharmacol.*, v. 5, no. 3, p. 511-524.

Nenci, A. et al., 2007, Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation: *Nature*, v. 446, no. 7135, p. 557-561.

Neuhofe, P. et al., 2013, Deletion of IkappaBalpha activates RelA to reduce acute pancreatitis in mice through up-regulation of Spi2A: *Gastroenterology*, v. 144, no. 1, p. 192-201.

Niewoehner, D. E., J. Kleinerman, and D. B. Rice, 1974, Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers: *N.Engl.J.Med.*, v. 291, no. 15, p. 755-758.

Nuorti, J. P., J. C. Butler, M. M. Farley, L. H. Harrison, A. McGeer, M. S. Kolczak, and R. F. Breiman, 2000, Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. Active Bacterial Core Surveillance Team: *N.Engl.J.Med.*, v. 342, no. 10, p. 681-689.

O'Shaughnessy, T. C., T. W. Ansari, N. C. Barnes, and P. K. Jeffery, 1997, Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 155, no. 3, p. 852-857.

Ohno, I. et al., 1997, Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 16, no. 3, p. 212-219.

Olivera, D., C. Knall, S. Boggs, and J. Seagrave, 2010, Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium: *Exp.Toxicol.Pathol.*, v. 62, no. 2, p. 133-143.

Ortiz, M. L., L. Lu, I. Ramachandran, and D. I. Gabrilovich, 2014, Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer: *Cancer Immunol.Res.*, v. 2, no. 1, p. 50-58.

Pahl, H. L., 1999, Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors: *Oncogene*, v. 18, no. 49, p. 6853-6866.

Pardo, A., R. Barrios, V. Maldonado, J. Melendez, J. Perez, V. Ruiz, L. Segura-Valdez, J. I. Sznajder, and M. Selmán, 1998, Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications: *Am.J.Pathol.*, v. 153, no. 3, p. 833-844.

Parks, W. C., 1997, Posttranscriptional regulation of lung elastin production: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 17, no. 1, p. 1-2.

Parks, W. C., 2008, Matrix metalloproteinases: Introduction: *Semin.Cell Dev.Biol.*, v. 19, no. 1, p. 1.

Pasparakis, M., 2009, Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 9, no. 11, p. 778-788.

Pasparakis, M. et al., 2002, TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2: *Nature*, v. 417, no. 6891, p. 861-866.

Pauwels, N. S. et al., 2011, Role of IL-1alpha and the Nlrp3/caspase-1/IL-1beta axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD: *Eur.Respir.J.*, v. 38, no. 5, p. 1019-1028.

Perez-Rial, S., L. Del Puerto-Nevado, R. Terron-Exposito, A. Giron-Martinez, N. Gonzalez-Mangado, and G. Peces-Barba, 2013, Role of recently migrated monocytes in cigarette

smoke-induced lung inflammation in different strain of mice: *PLoS.One.*, v. 8, no. 9, p. e72975.

Perez-Rial, S., A. Giron-Martinez, and G. Peces-Barba, 2014, Animal Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: *Arch.Bronconeumol.*

Perkins, N. D., 2007, Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 8, no. 1, p. 49-62.

Pfeifer, P. et al., 2013, IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 48, no. 4, p. 415-421.

Phipps, J. C., D. M. Aronoff, J. L. Curtis, D. Goel, E. O'Brien, and P. Mancuso, 2010, Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*: *Infect.Immun.*, v. 78, no. 3, p. 1214-1220.

Pinart, M., M. Zhang, F. Li, F. Hussain, J. Zhu, C. Wiegman, B. Ryffel, and K. F. Chung, 2013, IL-17A modulates oxidant stress-induced airway hyperresponsiveness but not emphysema: *PLoS.One.*, v. 8, no. 3, p. e58452.

Prause, O., S. Bozinovski, G. P. Anderson, and A. Linden, 2004, Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways: *Thorax*, v. 59, no. 4, p. 313-317.

Pretolani, M., and M. Goldman, 1997, IL-10: a potential therapy for allergic inflammation?: *Immunol.Today*, v. 18, no. 6, p. 277-280.

Puchelle, E., J. M. Zahm, J. M. Tournier, and C. Coraux, 2006, Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease: *Proc.Am.Thorac.Soc.*, v. 3, no. 8, p. 726-733.

Punturieri, A., S. Filippov, E. Allen, I. Caras, R. Murray, V. Reddy, and S. J. Weiss, 2000, Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages: *J.Exp.Med.*, v. 192, no. 6, p. 789-799.

Rabe, K. F. et al., 2007, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 176, no. 6, p. 532-555.

Rahman, I., 2005, The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy: *Treat.Respir.Med.*, v. 4, no. 3, p. 175-200.

Rajendrasozhan, S., S. Chung, I. K. Sundar, H. Yao, and I. Rahman, 2010a, Targeted disruption of NF- κ B1 (p50) augments cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice: a critical role of p50 in chromatin remodeling: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 298, no. 2, p. L197-L209.

- Rajendrasozhan, S., J. W. Hwang, H. Yao, N. Kishore, and I. Rahman, 2010b, Anti-inflammatory effect of a selective I κ B kinase-beta inhibitor in rat lung in response to LPS and cigarette smoke: *Pulm.Pharmacol.Ther.*, v. 23, no. 3, p. 172-181.
- Raman, A. S., A. J. Swinburne, and A. J. Fedullo, 1983, Pneumococcal adherence to the buccal epithelial cells of cigarette smokers: *Chest*, v. 83, no. 1, p. 23-27.
- Rastrick, J. M. et al., 2013, Cigarette smoke induced airway inflammation is independent of NF-kappaB signalling: *PLoS.One.*, v. 8, no. 1, p. e54128.
- Raza, S. L., L. C. Nehring, S. D. Shapiro, and L. A. Cornelius, 2000, Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 52, p. 41243-41250.
- Retamales, I., W. M. Elliott, B. Meshi, H. O. Coxson, P. D. Pare, F. C. Sciruba, R. M. Rogers, S. Hayashi, and J. C. Hogg, 2001, Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 164, no. 3, p. 469-473.
- Rincon, M., and C. G. Irvin, 2012, Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases: *Int.J.Biol.Sci.*, v. 8, no. 9, p. 1281-1290.
- Roos, A. B., C. Sanden, M. Mori, L. Bjermer, M. R. Stampfli, and J. S. Erjefalt, 2015a, IL-17A is Elevated in End-stage COPD and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*
- Roos, A. B. et al., 2015b, Interleukin-17A Promotes Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*
- Rot, A., M. Krieger, T. Brunner, S. C. Bischoff, T. J. Schall, and C. A. Dahinden, 1992, RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes: *J.Exp.Med.*, v. 176, no. 6, p. 1489-1495.
- Rupec, R. A. et al., 2005, Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha: *Immunity.*, v. 22, no. 4, p. 479-491.
- Russell, R. E., A. Thorley, S. V. Culpitt, S. Dodd, L. E. Donnelly, C. Demattos, M. Fitzgerald, and P. J. Barnes, 2002, Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.*, v. 283, no. 4, p. L867-L873.
- Ruwanpura, S. M. et al., 2011, Interleukin-6 promotes pulmonary emphysema associated with apoptosis in mice: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 45, no. 4, p. 720-730.
- Saetta, M., S. A. Di, P. Maestrelli, G. Turato, C. E. Mapp, M. Pieno, G. Zanguochi, P. G. Del, and L. M. Fabbri, 1996, Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis: *Clin.Exp.Allergy*, v. 26, no. 7, p. 766-774.

- Saetta, M., S. A. Di, G. Turato, F. M. Facchini, L. Corbino, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri, 1998, CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 157, no. 3 Pt 1, p. 822-826.
- Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, and D. V. Goeddel, 1990, Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES: *Nature*, v. 347, no. 6294, p. 669-671.
- Schamberger, A. C., N. Mise, J. Jia, E. Genoyer, A. O. Yildirim, S. Meiners, and O. Eickelberg, 2014, Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor-beta: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 50, no. 6, p. 1040-1052.
- Schnaper, H. W. et al., 1993, Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro: *J.Cell Physiol*, v. 156, no. 2, p. 235-246.
- Seimetz, M. et al., 2011, Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice: *Cell*, v. 147, no. 2, p. 293-305.
- Senior, R. M., G. L. Griffin, and R. P. Mecham, 1980, Chemotactic activity of elastin-derived peptides: *J.Clin.Invest*, v. 66, no. 4, p. 859-862.
- Sethi, J. M., and C. L. Rochester, 2000, Smoking and chronic obstructive pulmonary disease: *Clin.Chest Med.*, v. 21, no. 1, p. 67-86, viii.
- Sethi, S., 2000, Bacterial infection and the pathogenesis of COPD: *Chest*, v. 117, no. 5 Suppl 1, p. 286S-291S.
- Sethi, S., 2010, Infection as a comorbidity of COPD: *Eur.Respir.J.*, v. 35, no. 6, p. 1209-1215.
- Sethi, S., N. Evans, B. J. Grant, and T. F. Murphy, 2002, New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: *N.Engl.J.Med.*, v. 347, no. 7, p. 465-471.
- Sethi, S., and T. F. Murphy, 2001, Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review: *Clin.Microbiol.Rev.*, v. 14, no. 2, p. 336-363.
- Sethi, S., and T. F. Murphy, 2008, Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease: *N.Engl.J.Med.*, v. 359, no. 22, p. 2355-2365.
- Shan, M. et al., 2012, Cigarette smoke induction of osteopontin (SPP1) mediates T(H)17 inflammation in human and experimental emphysema: *Sci.Transl.Med.*, v. 4, no. 117, p. 117ra9.
- Shapiro, S. D., 1999, The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 160, no. 5 Pt 2, p. S29-S32.
- Shapiro, S. D., N. M. Goldstein, A. M. Houghton, D. K. Kobayashi, D. Kelley, and A. Belaaouaj, 2003, Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice: *Am.J.Pathol.*, v. 163, no. 6, p. 2329-2335.

Shapiro, S. D., and E. P. Ingenito, 2005, The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 32, no. 5, p. 367-372.

Shen, F., N. Li, P. Gade, D. V. Kalvakolanu, T. Weibley, B. Doble, J. R. Woodgett, T. D. Wood, and S. L. Gaffen, 2009, IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain: *Sci.Signal.*, v. 2, no. 59, p. ra8.

Shifren, A., A. G. Durmowicz, R. H. Knutsen, E. Hirano, and R. P. Mecham, 2007, Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 292, no. 3, p. L778-L787.

Shuto, T., H. Xu, B. Wang, J. Han, H. Kai, X. X. Gu, T. F. Murphy, D. J. Lim, and J. D. Li, 2001, Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, no. 15, p. 8774-8779.

Song, C. et al., 2008, IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma: *J.Immunol.*, v. 181, no. 9, p. 6117-6124.

Spira, A., J. Beane, V. Shah, G. Liu, F. Schembri, X. Yang, J. Palma, and J. S. Brody, 2004, Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, no. 27, p. 10143-10148.

Sproul, E. P., and W. S. Argraves, 2013, A cytokine axis regulates elastin formation and degradation: *Matrix Biol.*, v. 32, no. 2, p. 86-94.

Stanescu, D., A. Sanna, C. Veriter, S. Kostianev, P. G. Calcagni, L. M. Fabbri, and P. Maestrelli, 1996, Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils: *Thorax*, v. 51, no. 3, p. 267-271.

Stanley, P. J., R. Wilson, M. A. Greenstone, L. MacWilliam, and P. J. Cole, 1986, Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency: *Thorax*, v. 41, no. 7, p. 519-523.

Stevenson, C. S., and M. A. Birrell, 2011, Moving towards a new generation of animal models for asthma and COPD with improved clinical relevance: *Pharmacol.Ther.*, v. 130, no. 2, p. 93-105.

Sullivan, A. K., P. L. Simonian, M. T. Falta, J. D. Mitchell, G. P. Cosgrove, K. K. Brown, B. L. Kotzin, N. F. Voelkel, and A. P. Fontenot, 2005, Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 172, no. 5, p. 590-596.

Sundar, I. K., S. Chung, J. W. Hwang, J. D. Lapek, Jr., M. Bulger, A. E. Friedman, H. Yao, J. R. Davie, and I. Rahman, 2012, Mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1) regulates cigarette smoke-induced histone modifications on NF-kappaB-dependent genes: *PLoS.One.*, v. 7, no. 2, p. e31378.

Szulakowski, P., A. J. Crowther, L. A. Jimenez, K. Donaldson, R. Mayer, T. B. Leonard, W. MacNee, and E. M. Drost, 2006, The effect of smoking on the transcriptional regulation of

lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 174, no. 1, p. 41-50.

Takanashi, S., Y. Hasegawa, Y. Kanehira, K. Yamamoto, K. Fujimoto, K. Satoh, and K. Okamura, 1999, Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers: *Eur.Respir.J.*, v. 14, no. 2, p. 309-314.

Tan, H. L., and M. Rosenthal, 2013, IL-17 in lung disease: friend or foe?: *Thorax*, v. 68, no. 8, p. 788-790.

Taylor, A. E., T. K. Finney-Hayward, J. K. Quint, C. M. Thomas, S. J. Tudhope, J. A. Wedzicha, P. J. Barnes, and L. E. Donnelly, 2010, Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD: *Eur.Respir.J.*, v. 35, no. 5, p. 1039-1047.

Tetley, T. D., 2002, Macrophages and the pathogenesis of COPD: *Chest*, v. 121, no. 5 Suppl, p. 156S-159S.

Thatcher, T. H. et al., 2005, Role of CXCR2 in cigarette smoke-induced lung inflammation: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 289, no. 2, p. L322-L328.

Tomita, K. et al., 2002, Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 166, no. 5, p. 724-731.

Tsai, H. C., S. Velichko, L. Y. Hung, and R. Wu, 2013, IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection: *Clin.Dev.Immunol.*, v. 2013, p. 267971.

Vaddi, K., and R. C. Newton, 1994, Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines: *J.Immunol.*, v. 153, no. 10, p. 4721-4732.

van der Toorn, M., D. J. Slebos, H. G. de Bruin, R. Gras, D. Rezayat, L. Jorge, K. Sandra, and A. J. van Oosterhout, 2013, Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation: *Respir.Res.*, v. 14, p. 45.

van Rossum, A. M., E. S. Lysenko, and J. N. Weiser, 2005, Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model: *Infect.Immun.*, v. 73, no. 11, p. 7718-7726.

Van Winkelhoff, A. J., C. J. Bosch-Tijhof, E. G. Winkel, and W. A. van der Reijden, 2001, Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis: *J.Periodontol.*, v. 72, no. 5, p. 666-671.

Vanoirbeek, J. A. et al., 2010, Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 42, no. 1, p. 96-104.

VanOtteren, G. M., R. M. Strieter, S. L. Kunkel, R. Paine, III, M. J. Greenberger, J. M. Danforth, M. D. Burdick, and T. J. Standiford, 1995, Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia: *J.Immunol.*, v. 154, no. 4, p. 1900-1908.

- Veeramachaneni, S. B., and S. Sethi, 2006, Pathogenesis of bacterial exacerbations of COPD: COPD., v. 3, no. 2, p. 109-115.
- Wallace, A. M. et al., 2008, Matrix metalloproteinase expression by human alveolar macrophages in relation to emphysema: COPD., v. 5, no. 1, p. 13-23.
- Wands, J. M. et al., 2005, Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung: J.Leukoc.Biol., v. 78, no. 5, p. 1086-1096.
- Weathington, N. M., A. H. van Houwelingen, B. D. Noerager, P. L. Jackson, A. D. Kraneveld, F. S. Galin, G. Folkerts, F. P. Nijkamp, and J. E. Blalock, 2006, A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation: Nat.Med., v. 12, no. 3, p. 317-323.
- Wedzicha, J. A., and G. C. Donaldson, 2003, Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: Respir.Care, v. 48, no. 12, p. 1204-1213.
- Wedzicha, J. A., T. A. Seemungal, P. K. MacCallum, E. A. Paul, G. C. Donaldson, A. Bhowmik, D. J. Jeffries, and T. W. Meade, 2000, Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels: Thromb.Haemost., v. 84, no. 2, p. 210-215.
- Weeks, B. S., H. W. Schnaper, M. Handy, E. Holloway, and H. K. Kleinman, 1993, Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B): J.Cell Physiol, v. 157, no. 3, p. 644-649.
- Welgus, H. G., E. J. Campbell, J. D. Cury, A. Z. Eisen, R. M. Senior, S. M. Wilhelm, and G. I. Goldberg, 1990, Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development: J.Clin.Invest, v. 86, no. 5, p. 1496-1502.
- Wendel, D. P., D. G. Taylor, K. H. Albertine, M. T. Keating, and D. Y. Li, 2000, Impaired distal airway development in mice lacking elastin: Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., v. 23, no. 3, p. 320-326.
- Wilhelm, S. M., I. E. Collier, B. L. Marmer, A. Z. Eisen, G. A. Grant, and G. I. Goldberg, 1989, SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages: J.Biol.Chem., v. 264, no. 29, p. 17213-17221.
- Witowski, J., K. Ksiazek, and A. Jorres, 2004, Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses: Cell Mol.Life Sci., v. 61, no. 5, p. 567-579.
- Woodruff, P. G., L. L. Koth, Y. H. Yang, M. W. Rodriguez, S. Favoreto, G. M. Dolganov, A. C. Paquet, and D. J. Erle, 2005, A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking: Am.J.Respir.Crit Care Med., v. 172, no. 11, p. 1383-1392.
- Wright, J. L., and A. Churg, 2010, Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease: Expert.Rev.Respir.Med., v. 4, no. 6, p. 723-734.

- Yagi, O., K. Aoshiba, and A. Nagai, 2006, Activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease: *Respiration*, v. 73, no. 5, p. 610-616.
- Yang, S. R., A. S. Chida, M. R. Bauter, N. Shafiq, K. Seweryniak, S. B. Maggirwar, I. Kilty, and I. Rahman, 2006, Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 291, no. 1, p. L46-L57.
- Yang, S. R. et al., 2008, IKK alpha causes chromatin modification on pro-inflammatory genes by cigarette smoke in mouse lung: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 38, no. 6, p. 689-698.
- Yang, S. R., J. Wright, M. Bauter, K. Seweryniak, A. Kode, and I. Rahman, 2007, Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 292, no. 2, p. L567-L576.
- Yao, H. et al., 2012, SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice: *J.Clin.Invest*, v. 122, no. 6, p. 2032-2045.
- Yao, P. M., H. Lemjabbar, M. P. D'Ortho, B. Maitre, P. Gossett, B. Wallaert, and C. Lafuma, 1999, Balance between MMP-9 and TIMP-1 expressed by human bronchial epithelial cells: relevance to asthma: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 878, p. 512-514.
- Yao, Z., S. L. Painter, W. C. Fanslow, D. Ulrich, B. M. Macduff, M. K. Spriggs, and R. J. Armitage, 1995, Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells: *J.Immunol.*, v. 155, no. 12, p. 5483-5486.
- Ye, P., P. B. Garvey, P. Zhang, S. Nelson, G. Bagby, W. R. Summer, P. Schwarzenberger, J. E. Shellito, and J. K. Kolls, 2001a, Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 25, no. 3, p. 335-340.
- Ye, P. et al., 2001b, Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense: *J.Exp.Med.*, v. 194, no. 4, p. 519-527.
- Yoshimura, T., E. A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella, and E. J. Leonard, 1989a, Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes: *J.Immunol.*, v. 142, no. 6, p. 1956-1962.
- Yoshimura, T., N. Yuhki, S. K. Moore, E. Appella, M. I. Lerman, and E. J. Leonard, 1989b, Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE: *FEBS Lett.*, v. 244, no. 2, p. 487-493.
- Yssel, H., M. R. De Waal, M. G. Roncarolo, J. S. Abrams, R. Lahesmaa, H. Spits, and J. E. de Vries, 1992, IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells: *J.Immunol.*, v. 149, no. 7, p. 2378-2384.

Zambon, J. J., S. G. Grossi, E. E. Machtei, A. W. Ho, R. Dunford, and R. J. Genco, 1996, Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens: *J.Periodontol.*, v. 67, no. 10 Suppl, p. 1050-1054.

Zhang, L., Z. Cheng, W. Liu, and K. Wu, 2013, Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients: *COPD.*, v. 10, no. 4, p. 459-465.

Zhang, Z., T. B. Clarke, and J. N. Weiser, 2009, Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice: *J.Clin.Invest.*, v. 119, no. 7, p. 1899-1909.

Zhu, J. et al., 2001, Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 164, no. 1, p. 109-116.

Zuo, F. et al., 2002, Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 99, no. 9, p. 6292-6297.

Anhang

7. Publikationen und Kongressbeiträge

7.1. Publikationen

Voss M, Wolf L, Kamyschnikow A, Wonnenberg B, Honecker A, Herr C, Lepper PM, Wegmann M, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2015): IL-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 309(2):L188-95

Voss M, Wonnenberg B, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bischoff M, Tschernig T, Bals R, Beisswenger C (2015): Cigarette smoke-promoted acquisition of bacterial pathogens in the upper respiratory tract leads to enhanced inflammation in mice. *Respiratory Research* 16:41

Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Wolf A, Voss M, Wolf L, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bals R, Beisswenger C (2015): Cigarette smoke induced disruption of pulmonary barrier and bacterial translocation drive tumor associated inflammation and growth. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* ajplung.00116.2015

Hartmann T, Baronian G, Nippe N, Voss M, Schulthess B, Wolz C, Eisenbeis J, Schmidt-Hohagen K, Gaupp R, Sunderkötter C, Beisswenger C, Bals R, Somerville GA, Herrmann M, Molle V, Bischoff M (2014): The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry* 289(43):29701-11

Wonnenberg B, Tschernig T, Voss M, Bischoff M, Meier C, Schirmer SH, Langer F, Bals R, Beisswenger C (2014): Probenecid reduces infection and inflammation in acute

Pseudomonas aeruginosa pneumonia. International Journal of Medical Microbiology 304(5-6):725-9

Pfeifer P, Voss M, Wonneberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, Bischoff M, Langer F, Schäfers HJ, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2013): IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 48: 415-21

7.2. Kongressbeiträge

Symposium „Chronic inflammatory disorders of the lung“ 2012 Freiburg, Posterpräsentation "A mouse model of cigarette smoke exposure: increased susceptibility to pulmonary colonization due to suppression of innate immune responses"

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Münster, Vortrag "A mouse model of cigarette smoke exposure: increased susceptibility to pulmonary colonization due to suppression of innate immune responses"

Kongress "Lung Science Conference" 2013 Estoril, Portugal, Posterpräsentation "A mouse model of cigarette smoke exposure: increased susceptibility to pulmonary colonization due to suppression of innate immune responses"

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Marburg, Vortrag "Differential function of IL-17A in cigarette smoke induced lung damage "

Kongress "Lung Science Conference" 2014 Estoril, Portugal, Posterpräsentation "Differential function of IL-17A in cigarette smoke induced lung damage"

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Supervision meiner Arbeit und die stets freundliche und konstruktive Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christoph Beisswenger für die Überlassung des anspruchsvollen und interessanten Themas, die Betreuung meiner Arbeit, für seine kompetente Hilfe bei allen praktischen und theoretischen Fragen und die stets kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Bei der gesamten AG Bals möchte ich mich herzlich für die tolle Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen, die Hilfe bei meinen Projekten und die entspannten Mittags- und Nachmittagspausen bedanken.

Ich danke herzlich meiner ganzen Familie, die mich während der 3 Jahre Doktorarbeit seelisch und tatkräftig unterstützt und mir das Schreiben dieser Arbeit ermöglicht hat. Besonders danke ich meiner kleinen Familie, Paulina und Andy, für ihre Geduld. Ich freue mich auf unsere Zukunft!

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

1. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Supervision der Arbeit
2. Christoph Beisswenger: Bereitstellung des Themas, Betreuung der Arbeit
3. Anja Honecker: technische Assistenz, FACS-Analyse
4. Andreas Kamyschnikow: technische Assistenz, Stereologie und Immunhistochemie
5. Lisa Wolf: Präparation, MMP- und Elastase-Assay
6. Bodo Wonneberg: Präparation
7. Christopher Jungnickel: Präparation
8. Christian Herr: Präparation
9. Jan Hellberg: Lungenfunktionsmessungen
10. Phillip Lepper: Hilfe bei klinischen Fragen
11. Michael Wegmann: Hilfe bei der Analyse der Lungenfunktionsdaten

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.