

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie,
Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin
der Universität des Saarlandes
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Robert Bals)

**Untersuchung über den Einfluss der Hypoxie
und des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1
auf die angeborene Immunantwort
von Atemwegsepithelzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von: Markus Polke
geboren am: 28. April 1988 in Hamburg

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
Summary	7
2. Einleitung.....	9
2.1. Das Atemwegsepithel und Erkrankungen der Atemwege	9
2.1.1. Aufbau des Epithels der Atemwege	9
2.1.2. Kolonisierung des Atemwegsepithels mit bakteriellen Pathogenen	10
2.1.3. Atemwegserkrankungen.....	10
2.2. Das angeborene Immunsystem der Lunge	12
2.2.1. Mustererkennungsrezeptoren	13
2.2.2. Zytokine	14
2.2.3. Antimikrobielle Peptide.....	15
2.2.4. Entzündungszellen	15
2.3. Hypoxie	17
2.3.1. Hypoxie und Inflammation.....	17
2.3.2. Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1	18
2.4. Fragestellung	20
3. Material und Methoden.....	21
3.1. Zelllinien, Zellkulturmedien und Bakterien.....	21
3.1.1. Primäre humane Atemwegsepithelzellen, Calu-3-Zellen und Zellkulturmedien	21
3.1.2. Bakterien	22
3.2. Stimulanzen.....	22
3.3. Stimulationsexperimente unter Normoxie und Hypoxie	23
3.4. Imitation der Hypoxie mit Cobalt(II)-Chlorid.....	24
3.5. Transwell-Versuch	25
3.6. siRNA-Experimente	25
3.7. Enzyme-linked immuno assay (ELISA).....	26
3.8. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, rtPCR.....	26
3.9. LDH-Zytotoxizitäts-Assay	27
3.10. Mausexperiment.....	27
3.11. Statistische Analyse	28

4. Ergebnisse.....	29
4.1. Aktivierung angeborener Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen unter Normoxie und Hypoxie	29
4.1.1. Hypoxie unterdrückt die Abgabe von Interleukinen.....	29
4.1.2. Hypoxie unterdrückt die Expression von IL-6 und hBD-2.....	31
4.2. Der Hypoxie-imitierende Agent CoCl₂ vermindert die Abgabe von Entzündungsmediatoren	33
4.3. Hypoxie hemmt die antimikrobielle Aktivität von Atemwegsepithelzellen	34
4.4. Die Rolle von HIF-1 bei der Aktivierung angeborener Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen	35
4.2.1. Die Behandlung mit siRNA gegen HIF-1 α führt zu einer erhöhten Abgabe von Interleukinen in Atemwegsepithelzellen	35
4.2.2. Die Behandlung mit siRNA gegen HIF-1 α führt zu einer erhöhten Abgabe von Interleukinen in Calu-3-Zellen.....	40
4.5. Der Einfluss von Hypoxie auf die Inflammation in Mäuselungen	43
4.3.1. Entzündungszellen in der Lunge	43
4.3.2. KC, MIP-2 und IL-6 Abgabe unter Normoxie und Hypoxie in BAL und Lungenhomogenisat.....	44
5. Diskussion.....	46
5.1. Die Auswirkung der Hypoxie auf die Entzündungsantwort von Atemwegsepithelzellen	46
5.2. Die Auswirkung der Hypoxie auf die Elimination von Pathogenen im Atemwegsepithel	49
5.3. Die Rolle von HIF-1 bei der Entzündungsantwort in Atemwegsepithelzellen	51
5.4. Schlussbemerkung.....	53
6. Literaturverzeichnis.....	55
7. Publikationen/Dank.....	66
7.1. Vorträge, Publikationen, Preise und Reisestipendien.....	66
7.2. Danksagung	69

1. Zusammenfassung

Unter akuten und chronischen Lungenerkrankungen wie der Pneumonie, der Mukoviszidose (CF) und auch der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) leiden Millionen von Menschen weltweit. Diese Erkrankungen können mit einer mukosalen und systemischen Hypoxie einhergehen. Durch Pathogene kommt es zu Infektionen, die den Verlauf der Erkrankungen maßgeblich beeinflussen können. Besonders Patienten mit Asthma bronchiale, CF oder COPD leiden unter Exazerbationen. Angeborene Immunfunktionen von Atemwegsepithelzellen sollen die Kolonisation und die Infektion der Lunge mit Pathogenen verhindern. Dabei ist die Auswirkung einer bestehenden Hypoxie auf die Immunabwehr der Atemwegsepithelzellen noch nicht vollständig geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Hypoxie auf die Regulierung angeborener Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen und die Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 (HIF-1), der unter hypoxischen Bedingungen in der Zelle stabilisiert wird, bei Infektionen zu untersuchen.

Es wurden primäre Atemwegsepithelzellen und die bronchiale epitheliale Zelllinie Calu-3 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (2% Sauerstoff) kultiviert und mit Bakterien und bakteriellen Faktoren stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass Hypoxie die Aktivierung angeborener Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen hemmt. Die Atemwegsepithelzellen bildeten nach der Inkubation mit *Pseudomonas aeruginosa* und den spezifischen Liganden für die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) 3 (PolyI:C) und 5 (Flagellin) unter Hypoxie signifikant weniger Entzündungsmediatoren (IL-6, IL-8, IP-10) und antimikrobielles Peptid (AMP) hBD-2 (humane β -Defensin 2). Infektionsversuche mit polarisierten Atemwegsepithelzellen zeigten, dass unter Hypoxie *P. aeruginosa* auf der Zelloberfläche besser überleben.

Ebenso wurde die Rolle von HIF-1 bei der Regulation der angeborenen Immunantwort von Atemwegsepithelzellen mit siRNA-Experimenten und dem HIF-1 α -Stabilisator Cobalt(II)chlorid untersucht. Eine verminderte Expression von HIF-1 α in Atemwegsepithelzellen führte zu einer erhöhten Expression und Abgabe von Entzündungsmediatoren unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Stabilisierung von HIF-1 α mittels Cobalt(II)chlorid führte hingegen zu einer

verminderten Bildung von Entzündungsmediatoren nach der Stimulation mit *P. aeruginosa* und PolyI:C.

Um zu untersuchen, wie sich die Hypoxie auf die pulmonale Entzündung im Mausmodell auswirkt, wurden Mäuse für vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie (10% Sauerstoff) gehalten und die Lungen mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* infiziert. Anschließend wurde die Mäuse für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie gehalten. Es zeigte sich, dass in den Lungen von Mäusen, die der Hypoxie ausgesetzt waren, weniger Entzündungsmediatoren gebildet wurden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Hypoxie die angeborenen Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen über HIF-1 supprimiert und legt nahe, dass Hypoxie mikrobielle Infektionen an der mukosalen Oberfläche der Lunge begünstigt. Für die Therapie und den Verlauf von Erkrankungen, die mit Hypoxie und Infektionen einhergehen, könnten diese Erkenntnisse von Bedeutung sein.

Summary

An examination of the impact of hypoxia and the hypoxia-inducible factor 1 on the innate immune response of respiratory epithelial cells

Millions of people worldwide suffer from acute and chronic diseases of the lung such as pneumonia, cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). These diseases are associated with mucosal and systemic hypoxia. Infections can have a huge impact on the course of the disease. Especially patients with asthma, CF or COPD suffer under exacerbations. Innate immune functions of respiratory epithelial cells are required to prevent colonisation and infection of the lung with pathogens. However, the impact of hypoxia on the innate immune defence of respiratory epithelial cells still remains unclear.

The aim of this thesis was to examine the role of hypoxia and of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) which is stabilized under hypoxic conditions in the regulation of innate immune mechanisms of respiratory epithelial cells.

Primary respiratory epithelial cells and the bronchial epithelial cell line Calu-3 were cultured under normoxic and hypoxic (2% oxygen) conditions and stimulated with bacteria and bacterial factors. The results showed that hypoxia inhibits the activation of innate immune mechanisms of respiratory epithelial cells. Respiratory epithelial cells produce significantly less inflammatory mediators (IL-6, IL-8, IP-10) and antimicrobial peptide (AMP) hBD-2 (human β -defensin 2) under hypoxia after incubation with *Pseudomonas aeruginosa* and specific Toll-like receptor ligands (TLR) 3 (polyI:C) and 5 (flagellin). Infection experiments with polarised respiratory epithelial cells showed a better survival of *P. aeruginosa* on the cell surface under hypoxia.

In addition the role of HIF-1 in the regulation of the innate immune response of respiratory epithelial cells was investigated with siRNA experiments and the HIF-1 α stabilizer cobalt(II) chloride. A reduced expression of HIF-1 α in respiratory epithelial cells led to an increased expression and release of inflammatory mediators under normoxic and hypoxic conditions. The stabilisation of HIF-1 α with cobalt(II) chloride led to a reduced production of inflammatory mediators after stimulation with *P. aeruginosa* and polyI:C.

To examine the impact of hypoxia on the inflammatory response of the lung, mice were incubated under normoxia or hypoxia (10% oxygen) for twenty-four hours followed by the infection of the lungs with heat-inactivated *P. aeruginosa*. Afterwards, mice were incubated for another twenty-four hours under normoxia or hypoxia. Less inflammatory mediators were produced in lungs of mice that were exposed to hypoxia.

The presented thesis shows that hypoxia suppresses innate immune mechanisms of respiratory epithelial cells via HIF-1 and suggests that hypoxia promotes microbial infections on the mucosal surface of the lung. These findings could be of importance for the therapy and course of diseases that are associated with hypoxia and infections.

2. Einleitung

2.1. Das Atemwegsepithel und Erkrankungen der Atemwege

2.1.1. Aufbau des Epithels der Atemwege

Von den oberen Atemwegen bis zu den respiratorischen Bronchiolen erstreckt sich das humane Atemwegsepithel. Es besteht aus einem pseudomehrschichtigen, zylindrischen Flimmerepithel, dessen Dicke immer weiter abnimmt, je tiefer man in die Atemwege gelangt. Die Mehrheit der Zellen sind Flimmerzellen, die mit koordinierten Bewegungen ihrer Zilien den die Bronchien auskleidenden Schleim zur Trachea transportieren, sodass Schmutzpartikel aus der Lunge abtransportiert werden können (Murray 1978, Welsch 2010). Neben den Flimmerzellen finden sich im Atemwegsepithel noch mukusezernierende Becherzellen, Clara-Zellen und Basalzellen, aus denen sich die verschiedenen Zelltypen differenzieren. Der die Atemwege auskleidende Flüssigkeitsfilm setzt sich letztendlich aus dem in den Alveolen gebildeten Surfactant, den Produkten aus den subepithelial gelegenen seromukösen Schleimdrüsen und dem Sekret der sich im Epithel befindenden Clarazellen und Becherzellen zusammen (Morgenroth K. 1990).

Die Atemwegsepithelzellen sind über sogenannte tight junctions, die aus integralen und peripheren Membranproteinen bestehen, eng miteinander verbunden. Hierdurch wird die epitheliale Integrität gewährleistet und Pathogene werden an einer Translokation durch das Epithel gehindert (Clarke, Francella et al. 2011). Allerdings fungiert das Epithel nicht nur als mechanischer Schutzwall. Zusammen mit den verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems wie den Dendritischen Zellen und Alveolarmakrophagen sowie denen des spezifischen Immunsystems, zu welchen Immunzellen des bronchusassoziierten lymphatischen Gewebes wie Plasmazellen, T-Lymphozyten und M-Zellen gehören, trägt es entscheidend zur Immunität der Lunge bei (Martin, Frevert 2005, Welsch 2010). Um das Wachstum von Mikroben auf der Mukosa zu inhibieren sezernieren Atemwegsepithelzellen verschiedene Faktoren wie AMP, Lysozyme, Lactoferrine, Muzine und Siderocaline (Parker, Prince 2011, Seiler, Lepper et al. 2014).

2.1.2. Kolonisierung des Atemwegsepithels mit bakteriellen Pathogenen

Bis zu einem gewissen Grad erlaubt die Mukosa der oberen Atemwege eine bakterielle Kolonisierung, während die Lunge weitestgehend steril ist (Whitsett, Alenghat 2015). Voraussetzung für eine Infektion mit extrazellulären bakteriellen Pathogenen wie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *P. aeruginosa* ist die Kolonisierung der Atemwege (Sadikot, Blackwell et al. 2005, Siegel, Weiser 2015). Gerade für humane Pathogene wie *S. pneumoniae* und *H. influenzae* sind die oberen Atemwege die hauptsächliche biologische Nische, die sie meist entlang der epithelialen Oberflächen des Nasopharynx symptomlos kolonisieren (Beisswenger, Lysenko et al. 2009). Zu Erkrankungen kann es kommen, wenn solche Pathogene in die Lunge, in das Mittelohr oder in den Blutkreislauf gelangen (Weiser 2010). Eine Infektion setzt die Adhäsion des Erregers auf der Oberfläche des Epithels, ein Überwinden des Immunsystems und unter Umständen eine transepitheliale Migration voraus. Virulenzfaktoren, die von Bakterien produziert werden, unterstützen diese Vorgänge (Beisswenger, Lysenko et al. 2009, Weiser 2010). Viele chronische Lungenerkrankungen, wie die COPD und die CF, sind mit einer Schwächung der mukosalen Immunantwort verbunden, was zu einer übermäßigen Kolonisierung der Atemwege beiträgt. Auch exogene Faktoren wie Zigarettenrauch und Umweltgifte begünstigen bakterielle Infektionen der Atemwege (Almirall, Gonzalez et al. 1999, Herr, Beisswenger et al. 2009).

2.1.3. Atemwegserkrankungen

Weltweit leiden Millionen von Menschen an Atemwegserkrankungen. Eine führende Todesursache in Entwicklungsländern sind akute Atemwegsinfekte, die jährlich etwa vier Millionen Todesopfer fordern, darunter vor allem Kinder (Ferkol, Schraufnagel 2014). Auch in den Industrieländern gehört die Pneumonie zu den häufigsten Todesursachen. Trotz Antibiotika haben schwere Pneumonien in Europa eine Mortalität von bis zu 48% (Welte, Torres et al. 2012).

Bei den Pneumonien werden die ambulant erworbene Pneumonie (CAP, community acquired pneumonia) und die nosokomial erworbene Pneumonie unterschieden. Nicht immer kann ein bestimmter Erreger als Ursache für die Infektion identifiziert werden, ist dies aber der Fall, so handelt es sich bei der CAP in den meisten Fällen um *S. pneumoniae* (Woodhead 2002). Bei einer Pneumonie kommt es auf Grund des direkten Einwirkens des Pathogens und der hiermit einhergehenden

Entzündungsantwort in der Lunge zu einer Schädigung der epithelialen und endothelialen Integrität mit Lungenschäden, woraus auch eine Verschlechterung des Gasaustausches resultiert (Hippenstiel, Witzenrath et al. 2007). Wie stark die Zerstörung des Gewebes dabei ausfällt, hängt einerseits von der körpereigenen Immunabwehr, andererseits von dem vorliegenden Erreger ab. So trägt z.B. der Virulenzfaktor Pneumolysin von *S. pneumoniae* über eine Steigerung der Gefäßpermeabilität entscheidend zu der Bildung von Ödemen bei (Witzenrath, Gutbier et al. 2006). Eine Pneumonie kann zu einer Sepsis und dem Versagen eines oder mehrerer Organe mit letalem Ausgang führen (Dremsizov, Clermont et al. 2006).

Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen wie die COPD, die eine führende Todesursache in der industrialisierten Welt darstellt und deren Prävalenz bei 200 Millionen liegt, sowie das Asthma bronchiale mit einer Prävalenz von 235 Millionen (Ferkol, Schraufnagel 2014), können v.a. durch Infektionen exazerbieren (Sethi 2010, Roca, Verduri et al. 2013). Zu den häufigsten Auslösern einer viralen Exazerbation bei Asthma bronchiale gehören humane Rhino-, respiratorische Synzytial-, Adeno-, Metapneumo-, Corona-, Influenza-, und Parainfluenzaviren (Costa, Costa et al. 2014). Bakterielle Erreger für eine Exazerbation sollen *Mykoplasma pneumoniae* und *Clamidia pneumoniae* sein (Singh, Busse 2006). Bei der COPD sind die häufigsten zu einer Exazerbation führenden Viren Adeno-, Corona-, humane respiratorische Synzytial-, Influenza- und Parainfluenzaviren. Handelt es sich um eine bakterielle Genese, so liegen vor allem die Erreger *H. influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* (Wedzicha, Seemungal 2007) vor. Bei einer Exazerbation steigt die bakterielle Belastung deutlich an, die Entzündungsantwort wird durch eine kombinierte Infektion mit Bakterien und Viren verstärkt (Wilkinson, Hurst et al. 2006). Auf Grund der starken Einschränkungen der Lebensqualität von Patienten (Miravittles, Anzueto et al. 2007), der erhöhten Mortalität (Suissa, Dell'Aniello et al. 2012) und der gesundheitsökonomisch bedeutsamen hohen Behandlungskosten stellen Exazerbationen bei der COPD ein besonderes Problem dar (Bauer, Welte et al. 2005, Dalal, Christensen et al. 2010).

Auch bei Patienten mit restriktive Lungenerkrankungen spielen Exazerbationen eine zentrale Rolle und der Krankheitsverlauf wird maßgeblich durch diese beeinflusst (Han, Zhou et al. 2014). Bei der CF führt eine Mutation im Cystic Fibrosis

Transmembrane Regulator (CFTR)-Gen zu einem Defekt im Cl-Kanal. Viele Organe sind hiervon betroffen, wobei die pulmonale Symptomatik zumeist im Vordergrund steht. Der Defekt führt zu der Bildung eines zähen Schleims, der die Atemwege verstopft (Kreda, Davis et al. 2012). Die Dehydrierung in den Atemwegen begünstigt das Auftreten von Infektion, was ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf durch Rehydrierung zeigen konnte (Boucher 2007). Versuche mit CF-Mäusen und -Schweinen zeigten bereits kurz nach der Geburt eine generelle Schwäche der Immunabwehr (Stoltz, Meyerholz et al. 2010, Ng, Zhou et al. 2014). Die Kolonisierung der Atemwege wird begünstigt und es kommt zu Exazerbationen, bei denen eine höhere Konzentration von Erregern, in der Regel *P. aeruginosa*, nachgewiesen werden kann. Bei den *Pseudomonaden* handelt es sich dabei in den meisten Fällen nicht um einen neuen Bakterienstamm, sondern um einen durch Voruntersuchungen bereits bekannten Stamm (Aaron, Ramotar et al. 2004). Je älter die Patienten sind, desto häufiger treten Exazerbationen auf. Neuere Daten zeigen, dass nur 52% aller Patienten mit schwerer Exazerbation der CF nach einer intensivmedizinischen Versorgung ein Jahr überleben (Goss, Burns 2007).

2.2. Das angeborene Immunsystem der Lunge

Über die eingeatmete Luft gelangen ständig Pathogene und Fremdstoffen in die Atemwege. Um die Lunge vor Infektionen zu schützen, ist deshalb ein komplexes Abwehrsystem notwendig. Das Immunsystem hat die Aufgabe, die Lunge möglichst steril zu halten. Dabei ist noch nicht sicher geklärt, ob es eine permanente Kolonisierung der unteren Atemwege mit Erregern gibt. Inwiefern bei der Lunge von einem Mikrobiom gesprochen werden kann, ist unklar. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Lunge bei gesunden Individuen nahezu einem sterilen Raum gleicht (Whitsett, Alenghat 2015), während bei Patienten mit Lungenerkrankungen wie COPD und CF die Atemwege fortwährend mit Mikroben belastet sind (Harris, De Groote et al. 2007, Erb-Downward, Thompson et al. 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass Atemwegsepithelzellen einen unverzichtbaren Anteil an der angeborenen Immunabwehr der Lunge haben (Skerrett, Liggitt et al. 2004, Whitsett, Alenghat 2015).

2.2.1. Mustererkennungsrezeptoren

Um die Infektion mit Pathogenen zu verhindern bzw. eine adäquate Immunantwort hervorrufen zu können, verfügen Zellen des angeborenen Immunsystems über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, Pattern-recognition receptors). Hiermit können Erreger intra- und extrazellulär über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns) wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle Lipoproteine oder doppelsträngige RNA erkannt werden. Die Erkennung von PAMPs über PRRs erlaubt eine schnelle Aktivierung angeborener Immunmechanismen, was die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und AMP beinhaltet. PRRs, die von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, sind aber auch für die Einleitung einer adaptiven Immunantwort entscheidend. TLR gehören zu den am Besten untersuchten PRRs. Bei Menschen konnten bereits zehn verschiedene TLR identifiziert werden, die jeweils verschiedene PAMPs erkennen. TLR 1, 2, 5 und 6 werden an der Zelloberfläche exprimiert. TLR-2 erkennt zusammen mit TLR-1 oder TLR-6 Lipoproteine und TLR-5 erkennt bakterielles Flagellin. TLR-4 ist der Rezeptor für LPS und wird nach seiner Aktivierung von der Zelloberfläche in das endosomale Kompartiment transportiert. TLR 3, 7, 8 und 9 kommen hingegen ausschließlich endosomal vor und erkennen Nukleinsäuren von Bakterien und Viren (Kumar, Kawai et al. 2011).

Wie die Zellen des angeborenen Immunsystems kann auch die Atemwegsepithelzelle PAMPs von Erregern über PRRs detektieren (Beisswenger, Lysenko et al. 2009, Parker, Prince 2011). Diese Erkennung führt zu einer Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen und zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) (Martin, Frevert 2005, Beisswenger, Lysenko et al. 2009, Parker, Prince 2011). So erkennt die Atemwegsepithelzelle z.B. *P. aeruginosa* über das bakterielle Flagellin mit TLR-5 und kann somit eine Immunantwort initiieren (Zhang, Louboutin et al. 2005). Flagellin induziert über TLR-5 in Atemwegsepithelzellen die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und AMPs (z.B. hBD-2) und Muzinen (Parker, Prince 2011). Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören auch die in dieser Arbeit verwendeten IL-6 und IL-8 (Martin, Frevert 2005). Eine Vielzahl an Viren wird über TLR-3, die doppelsträngige RNA erkennen, detektiert. Auch Atemwegsepithelzellen exprimieren TLR-3. PolyI:C, ein synthetischer Ligand für TLR-3, führt in Atemwegsepithelzellen zu einer starken Entzündungsantwort, die

die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IP-10, IL-8) und AMP beinhaltet (Parker, Prince 2011). Bei einer Infektion verstärken die von Makrophagen abgegebenen Zytokine die Entzündungsantwort von Atemwegsepithelzellen. Makrophagen aktivieren über IL-1 β und TNF- α Atemwegsepithelzellen, sodass es zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und AMP kommt. Die Aktivierung der Atemwegsepithelzellen mit IL-1 β und TNF- α induziert auch eine gesteigerte Expression von TLR auf der Zelloberfläche, was zu einer verstärkten Detektion von PAMPs durch die Atemwegsepithelzelle führt (Kao, Chen et al. 2004, Huang, Kao et al. 2007, Parker, Prince 2011).

2.2.2. Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Familie von Polypeptiden, die u.a. als Antwort auf das Erkennen eines Pathogens bevorzugt sezerniert werden, aber auch in membrangebundener Form vorkommen. Sie dienen zur Kommunikation der Zellen untereinander und unterstützen den Ablauf für eine koordinierte Immunabwehr. Auch Zellen, die nicht dem angeborenen oder adaptiven Immunsystem angehören, sind in der Lage Zytokine zu produzieren (Holländer 2006). Kommt es zu einer Form von Stress, wie einer Infektion oder Ischämie, so werden Zytokine von den betroffenen Zellen ausgeschüttet. Chemotaktische Zytokine sind in der Lage Entzündungszellen in das betroffene Gewebe zu rekrutieren. Ein solches Zytokin ist IL-8, das ein Lockmittel und Aktivator von neutrophilen Granulozyten darstellt. Das murine Homolog von IL-8 ist KC (keratinocyte-derived chemokine). IL-1 β und TNF z.B. induzieren auch die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, damit Leukozyten in das betroffene Gewebe austreten können. Zusätzlich initiieren sie Entzündungskaskaden, die in der Expression weiterer Zytokine, Chemokine und AMPs münden (Dinarello 2000). Antientzündliche Zytokine, zu denen u.a. IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF- β gehören, wirken hemmend auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Sie verhindern eine zu starke Immunantwort (Dinarello 2000). Auch im Atemwegsepithel kommt es über die Aktivierung von PRRs zu der Abgabe von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen wie IL-6, IL-8, TNF- α und IL-1 β . Daher sind auch Atemwegsepithelzellen bei Infektionen aktiv an der Bildung, Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen in die Lunge beteiligt (Parker, Prince 2011).

2.2.3. Antimikrobielle Peptide

Über 1200 AMP sind bereits beschrieben worden, von denen die meisten aus 12-50 Aminosäuren bestehen. AMP fungieren als endogene Antibiotika, indem sie das Wachstum von Bakterien auf der Zelloberfläche direkt hemmen. In der Lunge sind besonders Cathelizidine und Defensine zu finden (Seiler, Lepper et al. 2014). Defensine werden in α - und β -Defensine eingeteilt. α -Defensine werden von neutrophilen Granulozyten gebildet, während β -Defensine in erster Linie von Epithelzellen sezerniert werden (Holländer 2006). Cathelizidine und Defensine sind positiv geladen und ambiphatisch (Lai, Gallo 2009). Sie destabilisieren die Zellmembranen von Bakterien und bilden ionendurchlässige Kanäle. Dies führt zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und somit einem Verlust von Zellbestandteilen (Lai, Gallo 2009). Sie können daher das Wachstum von Mikroben inhibieren und diese abtöten. AMP wirken aber auch auf die Entzündungsvorgänge im Organismus. So ist für zahlreiche AMP eine chemotaktische Wirkung auf Entzündungs- und Immunzellen beschrieben. Sie regulieren auch die Aktivierung von Immunzellen und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Damit stellen sie ein Bindeglied zwischen angeborenem und spezifischem Immunsystem dar (Lai, Gallo 2009, Seiler, Lepper et al. 2014).

Während α -Defensine bei Infektionen über rekrutierte neutrophile Granulozyten in die Lunge gelangen, wird die Expression von β -Defensinen in Epithelzellen auf zellulärer Ebene reguliert. So wird die Expression des humanen β -Defensins 2 (hBD-2) in Atemwegsepithelzellen über mikrobielle Stimuli und Zytokine reguliert (Singh, Jia et al. 1998, Seiler, Lepper et al. 2014). Bei mikrobiellem Kontakt vermitteln verschiedene TLR, wie zum Beispiel TLR3 und TLR5, eine gesteigerte Expression von hBD-2 in Epithelzellen (Proud, Sanders et al. 2004, Froy 2005). Aber auch von Makrophagen abgegebene Zytokine wie IL-1 β induzieren die hBD-2 Expression (Singh, Jia et al. 1998, Tsutsumi-Ishii, Nagaoka 2003).

2.2.4. Entzündungszellen

Residente Alveolarmakrophagen sind in der Lage, Partikel und Mikroorganismen zu phagozytieren (Morgenroth K. 1990). Kommt es zu einer akuten Infektion der Lunge, wandern vermehrt Monozyten in die Alveolarräume ein und differenzieren sich zu Makrophagen. Liegt keine Entzündung vor, werden gewebständige Makrophagen nur sehr langsam durch neu einwandernde Monozyten ersetzt (Maus, Janzen et al.

2006). Makrophagen phagozytieren aspirierte Mikroben und töten diese mit Hilfe von antimikrobiellen Peptiden, Lysozymen, Proteasen und Sauerstoffradikalen ab (Sibille, Reynolds 1990). Makrophagen produzieren auch Zytokine, Chemokine und Arachidonsäure-Metabolite, wodurch Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, rekrutiert werden (Rubins 2003). Außerdem sind sie an der Auflösung der Entzündung und Gewebshomöostase beteiligt. So bilden sie auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, um eine Zerstörung des Lungengewebes durch übermäßige Inflammation zu verhindern, phagozytieren apoptotische Zellen und unterstützen Gewebereparatur (Kooguchi, Hashimoto et al. 1998, Rubins 2003). Neutrophile Granulozyten phagozytieren komplementvermittelt oder antikörperabhängig Pathogene. Zur Elimination der Pathogene stehen ihnen hierfür Granula zur Verfügung, die verschiedene Enzyme, wie z.B. Myeloperoxidase und Lysozyme sowie antimikrobielle Enzyme beinhalten. Solange keine Infektion vorliegt, befinden sich die neutrophilen Granulozyten im Blutkreislauf in Kontakt mit dem Gefäßendothel. Im Falle einer Infektion wandern die Zellen an den Ort der Entzündung (Chemotaxis) und es kommt zu einer Migration (Diapedese) in das Gewebe, wo die Phagozytose sowie Sekretion von Granula und toxischen Stoffen erfolgt (Holländer 2006). Der Einstrom von Neutrophilen in der Lunge wird u.a. durch IL-8 (bei der Maus KC) vermittelt (Strieter, Kunkel 1994). Andere Zytokine fördern die Neubildung von Neutrophilen im Knochenmark. So kann der Kolonie-stimulierende Faktor für Granulozyten (G-CSF) die Produktion der Neutrophilen im Falle einer akuten Infektion um das zehnfache steigern (Holländer 2006).

2.3. Hypoxie

Ein verminderter Sauerstoffgehalt im Gewebe wird als Hypoxie (*griech.*: ‚hypo‘- ‚unter‘, ‚oxys‘- ‚sauer‘) bezeichnet. Viele Pathologien des menschlichen Körpers lassen sich in ihrer Ursache auf eine Hypoxie zurückführen oder ihr Verlauf wird wesentlich von dieser beeinflusst (Semenza 2011).

2.3.1. Hypoxie und Inflammation

Auch Entzündungsvorgänge können durch Hypoxie beeinflusst werden und auch selber eine Hypoxie im Gewebe bedingen (Eltzschig, Carmeliet 2011). Gerade Atemwegserkrankungen sind in ihren akuten und chronischen Formen mit einer mukosalen und systemischen Hypoxie assoziiert (Rosenfeld, Emerson et al. 2001, Schaible, Schaffer et al. 2010). So werden Lungenabschnitte bei der Exazerbation einer COPD schlechter ventiliert und es kommt zu einem inhomogenem Ventilations-Perfusions-Verhältnis im Vergleich zu gesunden Individuen (Barbera, Roca et al. 1997). Eine mukosale Hypoxie konnte auch an den epithelialen Oberflächen der Lunge von CF-Patienten festgestellt werden (Worlitzsch, Tarran et al. 2002).

Welche Rolle die Hypoxie bei der Entwicklung von Atemwegserkrankungen spielt und welchen Effekt sie auf die Immunabwehr hat, ist noch nicht ausreichend geklärt. Aktuell liegen widersprüchlichen Daten vor. Viele Veröffentlichungen zeigen, dass Hypoxie Entzündungsvorgänge fördert (Madjdpour, Jewell et al. 2003). Andere Daten legen jedoch nahe, dass die Hypoxie einen hemmenden Einfluss auf die Inflammation haben kann. So produzieren primäre humane Adipozyten unter Hypoxie sowohl unstimuliert als auch nach Simulation mit TNF- α weniger Chemokine wie IL-8 im Vergleich zu unter Normoxie inkubierte Zellen (Famulla 2010). Humane Nabelschnur-Endothelzellen zeigen eine verminderte Expression von TLR-4 nach achtundvierzigstündiger Hypoxie und da dieser Mustererkennungsrezeptor essentiell für die Detektion insbesondere von gram-negativen Bakterien ist, könnte dieser Umstand eine adäquate Immunantwort gegen bestimmte Erreger verhindern (Ishida, Kubo et al. 2002).

2.3.2. Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1

Erfährt die Zelle eine verminderte Sauerstoffversorgung, so kommt es zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Abb 1). Über HIF-1 erfolgt die Adaptation an einen verminderten Sauerstoffspiegel (Papandreou, Cairns et al. 2006). Im menschlichen Körper kommt HIF als Heterodimer vor, der sich aus einer α -Untereinheit, von der es drei Isoformen gibt (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), sowie einer β -Untereinheit (HIF-1 β) zusammensetzt (Wiesener, Jurgensen et al. 2003, Schofield, Ratcliffe 2004). HIF-1 α wird wahrscheinlich in allen humanen Zellen exprimiert, während HIF-2 α und HIF-3 α ein nur limitiertes Expressionsmuster aufzeigen (Semenza 2000).

Unter Normoxie wird HIF-1 α durch die Prolyl-Hydroxylase sauerstoffabhängig hydroxyliert (Abb. 1). Die Prolyl-Hydroxylase nutzt Sauerstoff als einen Kofaktor. Dieser Vorgang ist notwendig, damit nun das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein mit HIF-1 α interagieren und seine Degradation im Proteasom einleiten kann (Semenza 2001). Liegt jedoch nicht genug Sauerstoff in der Zelle vor, so fehlt der Prolyl-Hydroxylase ihr Cofaktor Sauerstoff und die Degradation von HIF-1 α bleibt aus. Die α - und β -Untereinheit können dann einen Dimer und somit aktiven Transkriptionsfaktor bilden, der nun im Zellkern die Genexpression reguliert (Epstein, Gleadle et al. 2001, Semenza 2001, Eltzschig, Carmeliet 2011). Es kommt zu einer gesteigerten Expression der Enzyme der Glykolyse, während die Enzyme des Krebszyklus gehemmt werden. Zusätzlich wird die Expression von Erythropoetin und VEGF hochreguliert (Semenza 2001). Mit diesen Vorgängen adaptiert sich die Zelle bzw. der gesamte Organismus an den Sauerstoffmangel.

Auch mikrobielle Stimuli führen zu einer Stabilisation bzw. Aktivierung von HIF in verschiedenen Zelltypen wie Epithelzellen, Tumorzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Blouin, Page et al. 2004, Koury, Deitch et al. 2004, Peyssonnaud, Datta et al. 2005, Haerberle, Durrstein et al. 2008, Hartmann, Eltzschig et al. 2008, Paone, Galli et al. 2010, Spirig, Djafarzadeh et al. 2010, Werth, Beerlage et al. 2010, Legendre, Mooij et al. 2011). Dies ist ein Hinweis darauf, dass HIF ebenfalls eine Rolle im angeborenen und adaptiven Immunsystem zu haben scheint. So sind z. B. myeloide Zellen für eine adäquate Entzündungsantwort auf HIF-1 α angewiesen (Cramer, Yamanishi et al. 2003). Ihre bakterielle Kapazität bei Phagozytose wird über HIF-1 α gesteigert (Peyssonnaud, Datta et al. 2005). In HIF-

1 α -defizienten Mäuse soll eine LPS-induzierte Sepsis weniger schwer verlaufen (Peyssonnaud, Cejudo-Martin et al. 2007). Auch in Keratinozyten zeigte sich, dass HIF-1 α über die Regulation der Cathelicidin Expression und deren antibakteriellen Aktivität eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielt (Peyssonnaud, Boutin et al. 2008). Im Epithel des Darms steuert HIF-1 α die basale Defensin-Expression (Kelly, Glover et al. 2013). Experimentelle Mausversuche haben eine protektive Wirkung von HIF-1 α bei Colitis gezeigt (Karhausen, Furuta et al. 2004).

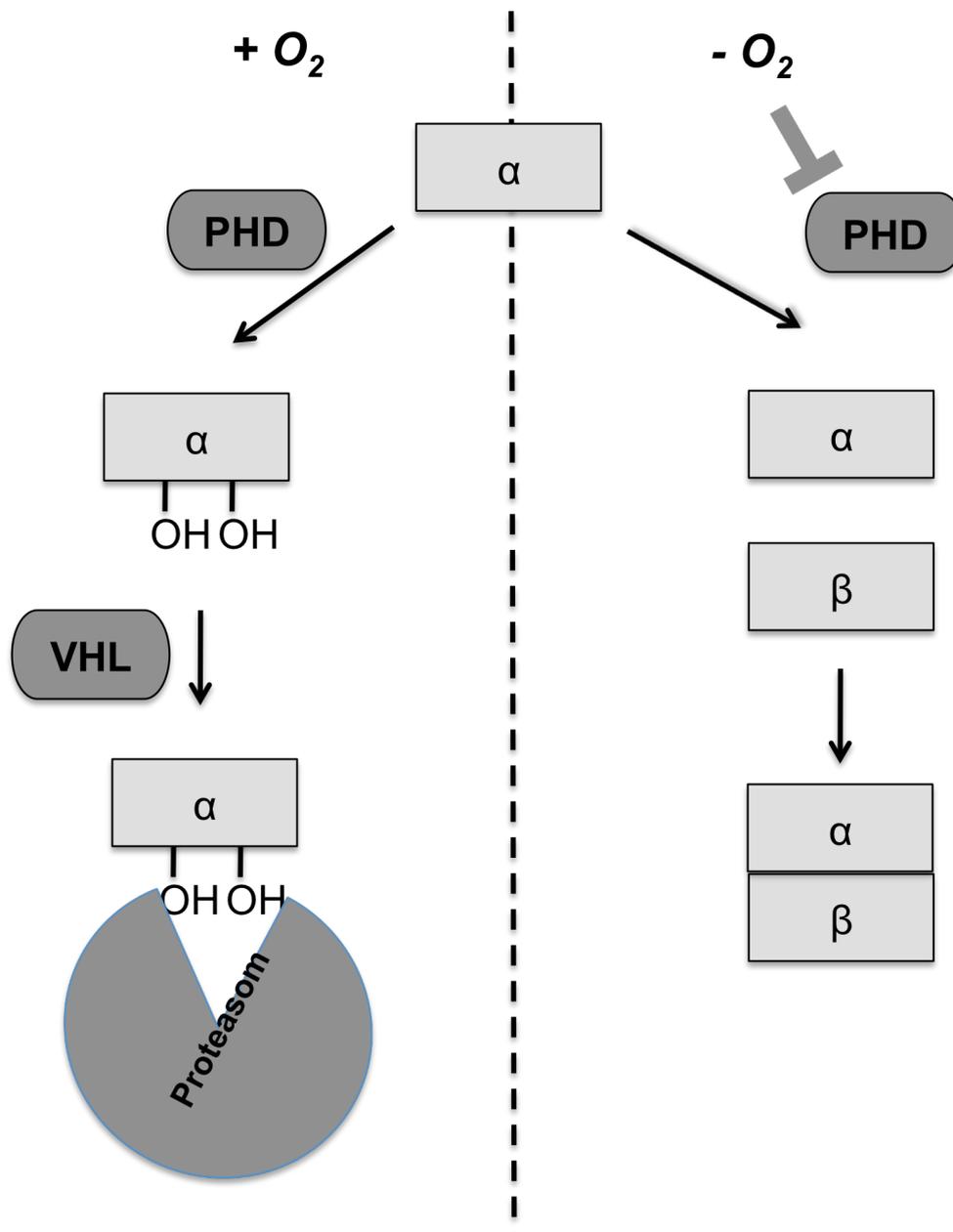


Abb. 1: Regulation von HIF. Liegt genug Sauerstoff in der Zelle vor, so kommt es zu einer Hydroxylierung von HIF-1 α durch die Prolyl-Hydroxylase (PHD). Anschließend kann das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein mit HIF-1 α interagieren, wodurch es zum Abbau von HIF-1 α im Proteasom kommt. Liegt hingegen nicht genug Sauerstoff in der Zelle vor, kommt es zu keiner Hydroxylierung von HIF-1 α . Die α -Untereinheit wird nicht abgebaut und kann mit der β -Einheit einen Dimer und aktiven Transkriptionsfaktor bilden.

2.4. Fragestellung

Die Assoziation von Atemwegserkrankungen mit einer Hypoxie ist bekannt. Allerdings ist ihr Einfluss auf die Immunabwehr von Atemwegsepithelzellen noch nicht ausreichend geklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht, wie sich die Hypoxie auf die Entzündungsvorgänge in Atemwegsepithelzellen auswirkt und welche Rolle der Transkriptionsfaktor HIF-1 dabei spielt. Ein besseres Verständnis über diese Zusammenhänge soll dazu beitragen, Erkrankungen der Atemwege in Ätiologie, Pathogenese und Verlauf besser zu verstehen und somit deren Prävention, einschließlich der Vermeidung von Exazerbationen, und Therapie zu optimieren.

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien, Zellkulturmedien und Bakterien

3.1.1. Primäre humane Atemwegsepithelzellen, Calu-3-Zellen und Zellkulturmedien

Primäre humane Atemwegsepithelzellen wurden intraoperativ bei Patienten aus der Trachea und den Bronchien gewonnen. Zuvor erfolgte die Aufklärung und Einwilligung der Patienten. Diesem Vorgehen stimmte die Ethikkommission der Universität des Saarlandes zu. Versuche wurden mit Zellen unterschiedlicher Spender wiederholt, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Die Atemwegsepithelzellen wurden für die weitere Verwendung in der Zellkultur aufbereitet (Bals, Beisswenger et al. 2004). Hierfür wurden die Atemwegsepithelzellen in Flüssigkultur bis zu einer Konfluenz von 70-80 % mit airway epithelial cell growth Medium mit Supplement (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Air liquid interface Kulturen wurden wie beschrieben angelegt (Bals, Beisswenger et al. 2004). Transwell-Platten mit einer Porengröße von 0,4µm, einem Durchmesser von 12mm und einer Polyesterbeschichtung (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurden zunächst kollagenisiert. Hierzu wurde die Kollagenlösung (Collagen, Typ I solution from rat tail; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) im Verhältnis von 1:10 mit H₂O verdünnt und hiervon je 100µl apikal in jedes Well gegeben. Es folgte die Inkubation der Transwell-Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurde die Kollagen-Lösung aus den Wells abgesaugt und die Platten wurden für 10 min einem UV-C-Licht ausgesetzt. Primäre Atemwegsepithelzellen konnten anschließend auf die Kollagenschicht im apikalen Kompartiment ausgesät werden, bis die Zellen adherent waren. Das apikale Kompartiment wurde mit PBS gespült und in das basale Kompartiment das Differenzierungsmedium gegeben. Das Differenzierungsmedium für die Primärzellen wurde aus DMEM und F-12 (Life technologies, Carlsbad, USA) mit 1% Penicillin-Streptomycin (Life technologies, Carlsbad, USA) sowie 2% Ultrosor G Serumersatz (PALL Life Science, Port Washington, NY) hergestellt. Die Zellen wurden für weitere zwei bis drei Wochen kultiviert.

Die humane Atemwegsepithelzelllinie Calu-3, die einem Adenokarzinom der Lunge entstammt, wurde von der Firma ATCC (USA) bezogen. Die Calu-3-Zellen wurden in einer 1:1 Mischung aus DMEM und F-12 (Life technologies, Carlsbad, USA) mit FBS

(10%, Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) ebenfalls bis zu einer etwa 70-80%igen Konfluenz kultiviert. Vierundzwanzig Stunden vor Vorinkubation bzw. Stimulation erfolgte bei den Calu-3-Zellen ein sog. Starving, also die Inkubation mit Medium (DMEM mit F-12) ohne FBS.

Alle Zellmedien wurden mit 1%-igem Penicillin-Streptomycin (Life technologies, Carlsbad, USA) versetzt. Bei der jeweils vierundzwanzigstündigen Transfektion mit siRNA (s.u.) wurde auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet, um eine bestmögliche Wirkung der siRNA erzielen zu können.

Für die verschiedenen Experimente wurden die primären Atemwegsepithelzellen und Calu-3 Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis eine Konfluenz von ca. 80% unter dem Mikroskop festgestellt werden konnte.

3.1.2. Bakterien

Für die Zellkultur- und Mausexperimente wurden *P. aeruginosa* des Stammes PAO₁ verwendet. Die *P. aeruginosa* wurden über Nacht bei 37°C auf LB Agar-Platten inkubiert. Am folgenden Tag wurde LB-Medium mit *P. aeruginosa* inokuliert und für etwa 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die *P. aeruginosa* wurden mit PBS (Life Technologies, Germany) gewaschen und in PBS resuspendiert, sodass eine OD₆₄₀ von 1 erreicht wurde. Für die Zellkulturexperimente wurden die *P. aeruginosa* für 5 Minuten bei 94°C inaktiviert und mit einer CFU (colony forming units) von 10⁷/ml verwendet. Bei den Transwell-Versuchen wurden die Zellen apikal mit 10⁵ CFU *P. aeruginosa* infiziert. Für das in vivo-Experiment mit Mäusen wurden ebenfalls hitzeinaktivierte PAO₁ (2 x 10⁷) verwendet.

3.2. Stimulanzen

Das Interleukin-1 β (R&D Systems, Minneapolis, USA), rekombinant human aus *E. coli*, wurde mit einer Arbeitskonzentration von 1ng/ml verwendet. Der TLR-3 Ligand Poly(I:C) (InvivoGen, Toulouse, Frankreich) und der TLR-5 Ligand Flagellin (InvivoGen, San Diego, USA) aus dem Erreger *Bacillus subtilis* wurden beide mit einer Konzentration von 1 μ g/ml genutzt.

3.3. Stimulationsexperimente unter Normoxie und Hypoxie

Mit der Hypoxiekammer „Hypoxic glove box“ (Firma Coy Laboratory Products, Michigan, USA) konnte ein O₂-Level von 2% und eine CO₂-Level von 5% erzeugt und gehalten werden. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war die Etablierung der Hypoxiekammer für die Grundlagenforschung in der Klinik, aus der diese Arbeit stammt.

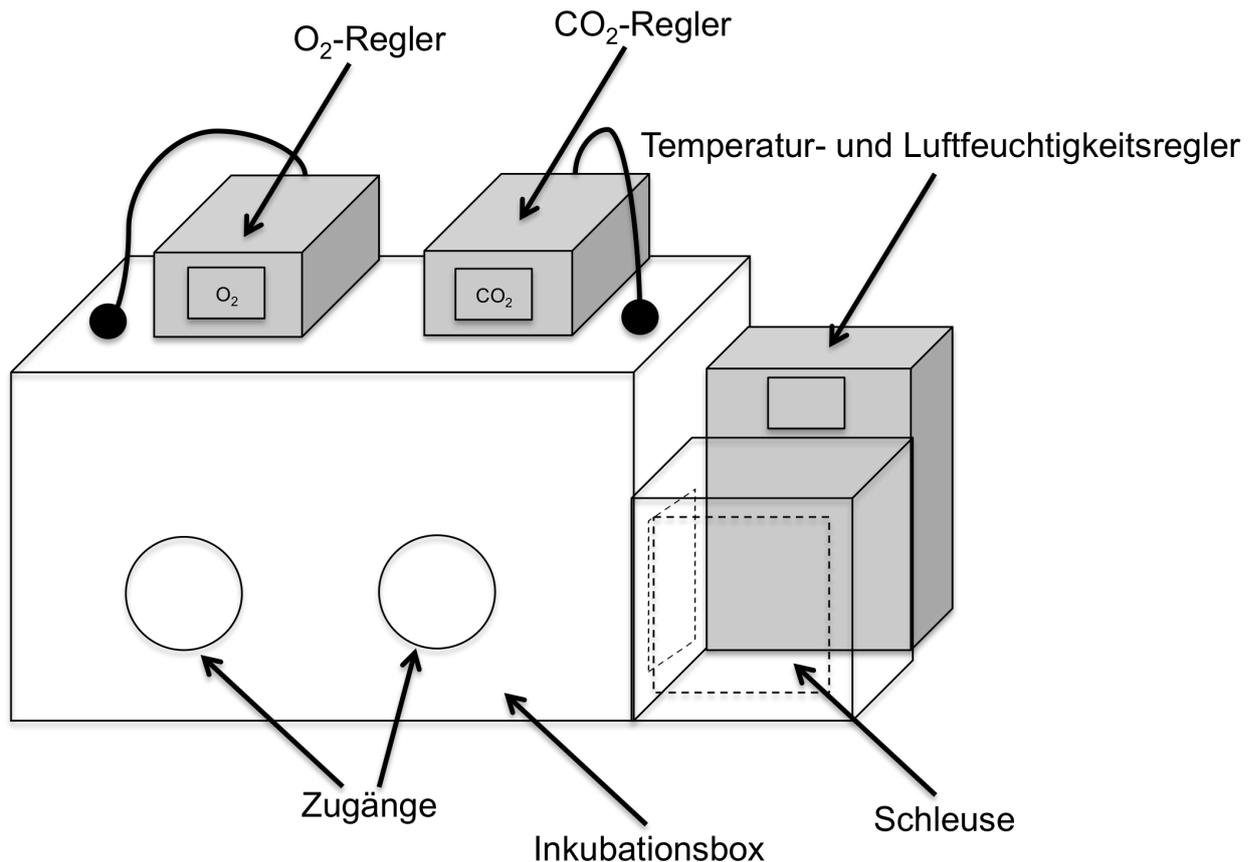


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hypoxiekammer. Mit der Hypoxiekammer konnten Atemwegsepithelzellen unter hypoxischen Bedingungen (2% Sauerstoff) bei 37°C und feuchter Luft inkubiert werden. Eine konstante Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration wurde mittels Einfuhr von Stickstoff und Kohlenstoffdioxid erreicht. Durch das Einführen von Zellen und Versuchsmaterialien über die Schleuse sowie der vorhanden Handschuhzugänge wurden die Versuchsbedingungen konstant gehalten.

Die primären Atemwegs- und Calu-3-Zellen wurden vor der Stimulation für zwei Stunden unter Hypoxie vorinkubiert, während Kontrollen unter Normoxie belassen wurden. Kontroll- und Stimulationsmedien mit PAO₁, Poly(I:C), Flagellin und IL-1 β wurden zur Äquilibration ebenfalls in der Hypoxiekammer vorinkubiert. Nun wurden die Zellen erst in der Hypoxiekammer stimuliert, dann - nach Ausschleusen der Medien aus der Hypoxiekammer - auch die Zellen unter Normoxie. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen ausgeschleust und zügig unter dem Mikroskop auf

gleichmäßige Konfluenz überprüft. Die Zellen wurden auf Eis gelegt und Überstände abgenommen. Zur Gewinnung der RNA wurden die Zellen mit einem Lysepuffer (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) lysiert. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Messung der Zytokine und der Isolation der RNA bei -80°C aufbewahrt.

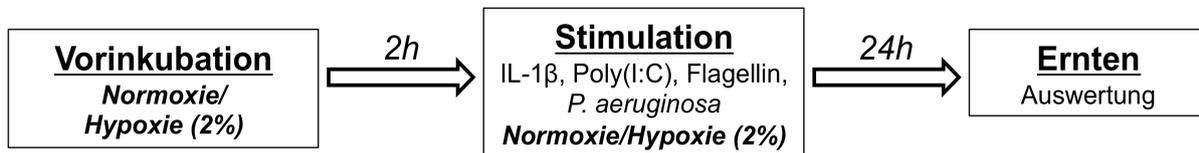


Abbildung 3: Versuchsaufbau der Stimulationsexperimente unter Normoxie und Hypoxie.

3.4. Imitation der Hypoxie mit Cobalt(II)-Chlorid

Zur Unterstützung der Ergebnisse, die mit der Hypoxiekammer erhoben werden konnten, wurden Zellen mit CoCl_2 (1 mM) behandelt. CoCl_2 wird auch als Hypoxie-imitierender Faktor bezeichnet, da es den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 α stabilisiert und zur Aktivierung von HIF führt (Wang, Jiang et al. 1995, Spirig, Djafarzadeh et al. 2010, Dai, Gao et al. 2012). Daher lässt sich mit seiner Verwendung auch der Effekt von HIF auf die Inflammation untersuchen.

Neben Kontrollproben wurden humane Atemwegsepithelzellen mit Medium, das 1mM CoCl_2 enthielt, und Kontrollmedium ohne CoCl_2 versehen und für drei Stunden inkubiert. Nach drei Stunden erfolgte die Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (10^7 CFU/ml) nach Abpipettieren des CoCl_2 -haltigen Mediums. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen ausgeschleust und zügig unter dem Mikroskop auf gleichmäßige Konfluenz überprüft. Die Zellen wurden auf Eis gelegt und Überstände abgenommen. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Messung der Zytokine bei -80°C aufbewahrt.

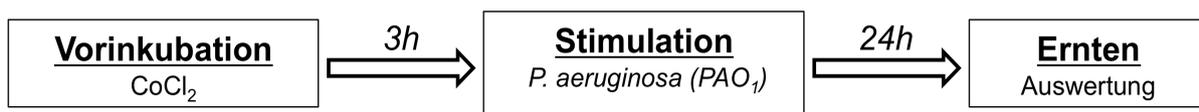


Abbildung 4: Versuchsaufbau der Experimente mit CoCl_2 .

3.5. Transwell-Versuch

Die Transwells wurden drei Stunden unter Normoxie und Hypoxie vorinkubiert. Daraufhin wurden 10^5 CFU *P. aeruginosa* in 40µl PBS apikal auf die Zellen gegeben. Nach sechs Stunden wurden die Zellen apikal mit 100µl PBS gespült. Die Proben wurden verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert, um verbliebene Bakterien auf den Zellen nachweisen zu können. Überstände aus den basolateralen Kompartimenten wurden gewonnen und bis zur Messung der Zytokine bei -80°C aufbewahrt.

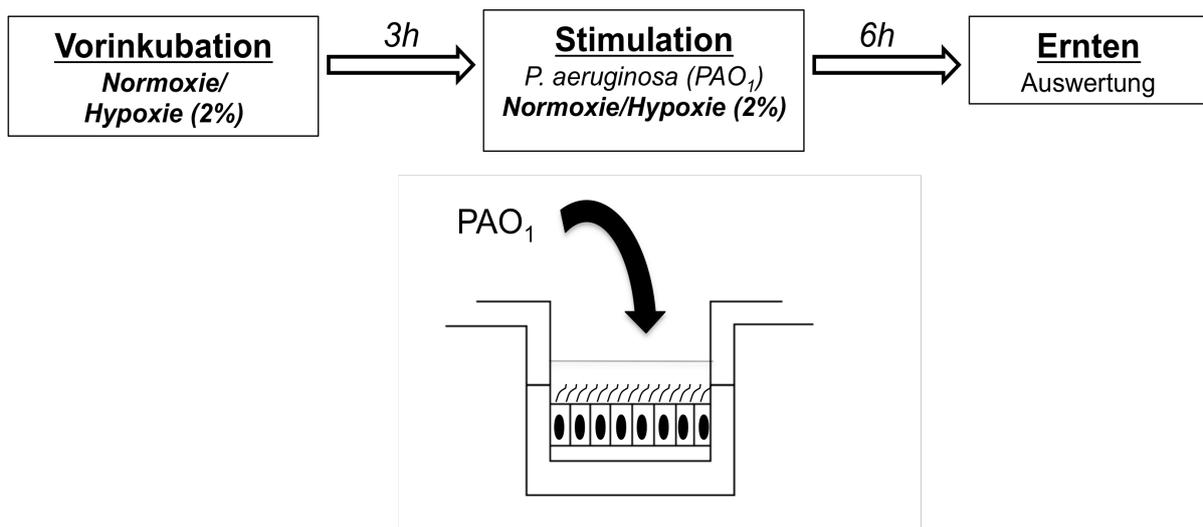


Abbildung 5: Versuchsaufbau des Transwell-Versuchs.

3.6. siRNA-Experimente

Für die Transfektion der Zellen wurde Kontroll-siRNA oder HIF-1 α -siRNA (Life technologies, Carlsbad, USA) mittels Liposomen und OptiMEM-Medium (Life technologies, Carlsbad, USA) in primäre Atemwegszellen und Calu-3-Zellen eingebracht. Nach vierundzwanzig Stunden wurde das Medium gewechselt und es erfolgte die Inkubation der Zellen für zwei Stunden unter Normoxie bzw. Hypoxie. Darauf folgend wurden die Zellen mit verschiedenen Agenzien stimuliert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen ausgeschleust und zügig unter dem Mikroskop auf gleichmäßige Konfluenz überprüft. Die Zellen wurden auf Eis gelegt und Überstände abgenommen. Zur Gewinnung der RNA wurden die Zellen mit einem Lysepuffer lysiert. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Messung der Zytokinkonzentration und der Isolation der RNA bei -80°C aufbewahrt.

Die Calu-3-Zellen wurden wie in den einfachen Stimulationsexperimenten einem zusätzlichen vierundzwanzigstündigen Starving vor Inkubation und Stimulation unterzogen.

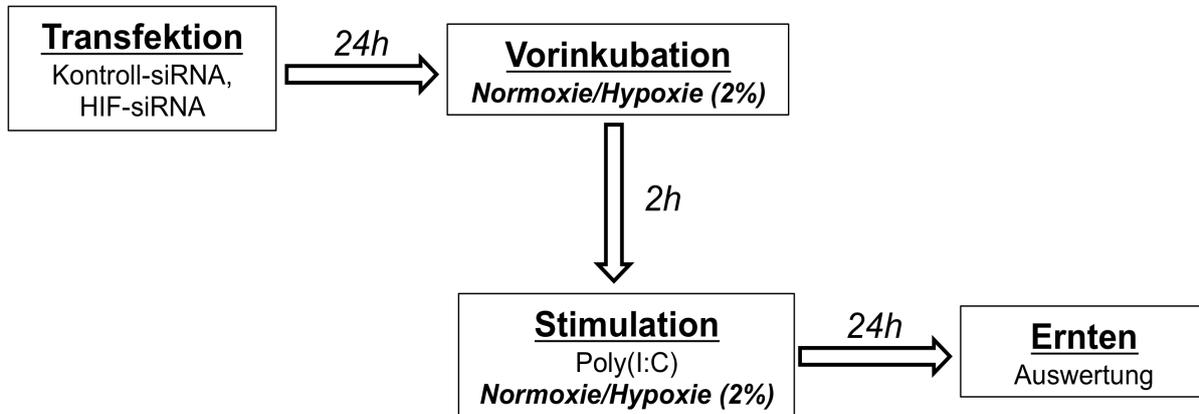


Abbildung 6: Versuchsaufbau der siRNA-Experimente.

3.7. Enzyme-linked immuno assay (ELISA)

Diese Methode wurde mit dem „Duo Set ELISA Development-Kits“ (Firma R&D Systems, Minneapolis, USA) nach dem mitgeliefertem Protokoll durchgeführt. So konnten für die Zellversuche die Konzentrationen der abgegebenen Interleukine IL-6, IL-8 und IP-10, für die Mausversuche IL-6, KC und MIP2 nachgewiesen werden.

3.8. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, rtPCR

RNA wurde mit dem „NucleoSpin RNA Kit“ der Firma Macherey Nagel (Düren, Deutschland) nach dem mitgelieferten Protokoll inklusive der Zusetzung von RNase-freier DNase isoliert und ihre Menge mittels der Computersoftware „Nanodrop“ und Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) ermittelt.

Die cDNA-Synthese aus RNA wurde mit dem „RevertAid First Strand cDNA Sythesis Kit (#K1622)“ der Firma Thermo Scientific synthetisiert. Auch hier wurde das beiliegende Protokoll zu Herstellung verwendet.

Die cDNA wurde anschließend mit ddH₂O im Verhältnis von 1:5 verdünnt. Hiervon wurde für jede PCR-Reaktion 5µl verwendet. Eine PCR-Reaktion bestand jeweils aus zwei Primern (Metabion, Martinsried, Deutschland; siehe Tabelle) à 0,2µl, 12,5µl Cybergreen (SensiMix™ SYBR & Fluorescein Kit, London, UK) und 7,1µl ddH₂O. Somit wurde eine Gesamtmenge von 25µl verwendet. Die PCR wurde mit dem

„iCycler“ von Bio-Rad, München, Deutschland durchgeführt. Das PCR-Protokoll lautete wie folgt: 95°C, 10min → 40x(95°C, 15s → 60°C, 30s) → 65°C, 5s → 95°C, 5s → 5°C. Als Negativkontrollen wurde statt RNA Wasser verwendet. Zur Ermittlung der relativen Expression wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet.

Name	Primer	Oligo Sequenz
Actin	Actin FW	5'-AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC-3'
	Actin RV	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
HIF-1 α	hHIF-1alpha F1	5'-CAA GAA CCT ACT GCT AAT GC-3'
	hHIF-1alpha R1	5'-TTA TGT ATG TGG GTA GGA GAT G-3'
hBD-2	hBD-2 FW	5'-TCA GCT CCT GGT GAA GCT C-3'
	hBD2 RV	5'-GGG CAA ACT GGA TGA CA-3'
IL-6	IL-6 FW	5'-CAC ACA GAC AGC CAC TCA CC-3'
	IL-6 RV	5'-TTT TCT GCC AGT GCC TCT TT-3'
IP-10	IP-10 F	5'TGA AAT TAT TCC TGC AAG CCA A-3'
	IP-10 R	5'-CAG ACA TCT CTT CTC ACC CTT CTT T-3'

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer.

3.9. LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Zum Ausschluss eines zytotoxischen Effekts der Hypoxie auf die Zellen bzw. bei der die Verwendung der siRNA wurde zusätzlich ein LDH-Zytotoxizitäts-Assay (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) nach mitgeliefertem Protokoll durchgeführt.

3.10. Mausexperiment

Für das Mausexperiment wurden vierzehn Mäuse (C57BL6/N) verwendet. Sieben Mäuse wurden als Kontrolltiere für vierundzwanzig Stunden unter Normoxie belassen und sieben Mäuse in einer Hypoxiekammer mit Regulationsgerät (Biospherix, Ltd., New York, USA) bei 10% O₂ für vierundzwanzig Stunden gehalten, sodass für die unter Hypoxie inkubierten Mäuse eine Gewöhnung an die hypoxischen Verhältnisse erfolgen konnte. Daraufhin wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion von 2,6mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest; Pfizer, Deutschland) und 0,18mg Xylazinhydrochlorid (Rompun; Bayer, Deutschland) pro Maus narkotisiert. Anschließend wurden die Mäuse mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* in PBS

transnasal infiziert. Nach der Infektion wurden die Versuchstiere wieder für vierundzwanzig Stunden in ihren jeweiligen Inkubationsort, also unter Normoxie oder Hypoxie, überführt. Darauf erfolgte die Applikation einer erneuten Narkose. Nach Wirkungseintritt wurde der Thorax der Mäuse eröffnet, 1ml Blut in einer EDTA-haltigen Spritze aus dem Herzen jeder Maus entnommen und das nach der Zentrifugation erhaltene Plasma zur weiteren Analyse genutzt.

Für die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde über eine kleine Inzision der Trachea ein Venenverweilkatheter vorgeschoben, über den die Atemwege mit 1ml PBS und Protease-Inhibitorcocktail (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) dreimalig gespült wurden. Die gewonnenen Spülproben wurden anschließend sofort für die Bestimmung der Zellzahlen verwendet. Es wurde der relative Anteil an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BAL bestimmt. Hierfür wurden 200µl der Zellsuspension in einer Zytocentrifuge (Cellspin II, Tharmac, Waldsolms, Deutschland) auf Objektträger gebracht und für sieben Minuten in Methanol bei -20°C fixiert. Die Zellen wurden mit dem „Diff Quik Staining Set“ (Medion Diagnostics, Gräfelfing, Deutschland) gefärbt.

Nach Präparierung und Entnahme der Lunge, wurde ein Lungenflügel zur Gewinnung von Lungenhomogenisat mit 1 ml PBS eingefroren.

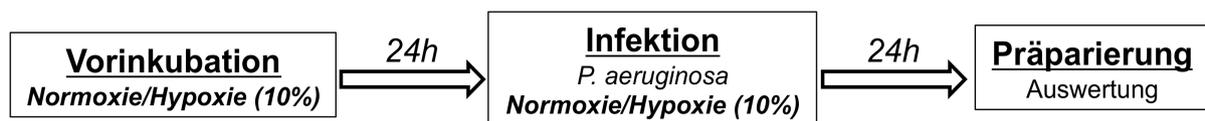


Abbildung 7: Versuchsaufbau des Mausexperiments.

3.11. Statistische Analyse

In der folgenden Arbeit wurde die Computersoftware GraphPad Prism genutzt und Graphen mit Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt. Die Auswertung wurde bei Versuchen, die mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen beinhalteten, mit ANOVA (Bonferroni-Methode) vollzogen. Bei Versuchen mit lediglich zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der t-Test angewendet.

4. Ergebnisse

4.1. Aktivierung angeborener Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen unter Normoxie und Hypoxie

4.1.1. Hypoxie unterdrückt die Abgabe von Interleukinen

Um zu klären, wie sich die Entzündungsantwort primärer Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit mikrobiellen Stimuli und inflammatorischen Mediatoren unter Hypoxie von der unter Normoxie unterscheidet, wurden primäre Atemwegsepithelzellen für zwei Stunden Normoxie oder Hypoxie (2% O₂) ausgesetzt, mit *P. aeruginosa*, Flagellin, PolyI:C und IL-1β stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert.

Es zeigte sich, dass Hypoxie die basale Abgabe von Interleukinen nicht beeinflusste. Es war kein signifikanter Unterschied in der basalen Abgabe der Interleukine IL-6 und IP-10 zwischen Atemwegsepithelzellen, die unter Normoxie oder Hypoxie für vierundzwanzig Stunden inkubiert wurden, messbar (Abb. 8). Die Stimulation mit *P. aeruginosa* (Abb. 8 A), Flagellin (Abb. 8 B), PolyI:C (Abb. 8 C) und IL-1β (Abb. 8 D) führte zu einer gesteigerten Abgabe von IL-6 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die durch diese mikrobiellen Stimuli induzierte Abgabe von IL-6 war unter Hypoxie jedoch signifikant geringer. Eine gesteigerte Abgabe von IP-10 konnte bei Atemwegsepithelzellen, die unter Normoxie inkubiert wurden, nur nach Stimulation mit *P. aeruginosa* (Abb. 8 A) und PolyI:C (Abb. 8 C) gemessen werden, während die Stimulation mit Flagellin und IL-1β zu keiner gesteigerten Abgabe von IP-10 führte (Daten nicht abgebildet). Unter Hypoxie gaben die mit *P. aeruginosa* und PolyI:C stimulierten Zellen signifikant weniger IP-10 ab.

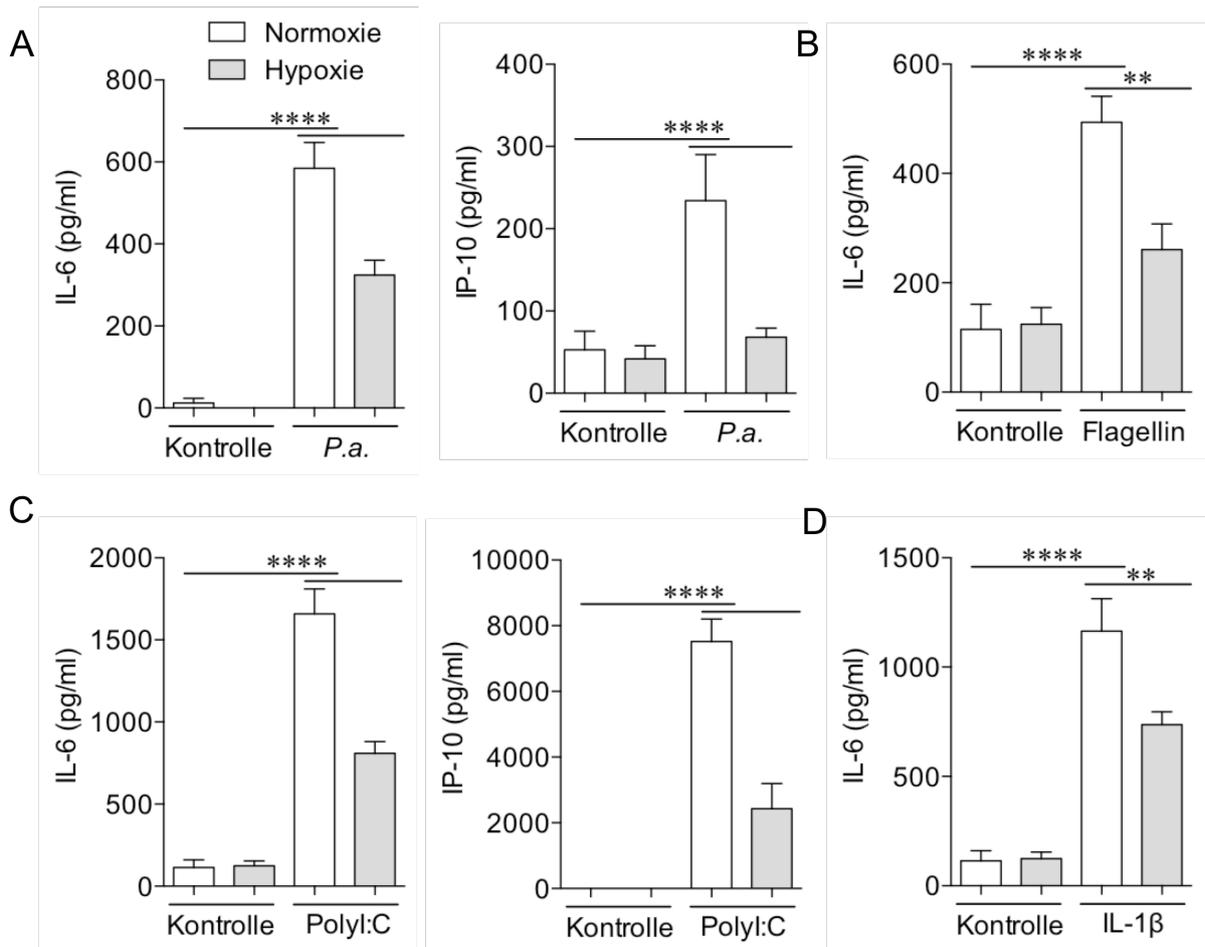


Abb. 8: Hypoxie vermindert die Abgabe von Entzündungsmediatoren von Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden für zwei Stunden der Normoxie oder Hypoxie (2% O₂) ausgesetzt und mit *P. aeruginosa* (*Pa*, 10⁷ CFU/ml) (A), Flagellin (1 µg/ml) (B), PolyI:C (1 µg/ml) (C) und IL-1β (1 ng/ml) (D) unter Normoxie oder Hypoxie für weitere vierundzwanzig Stunden stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6 und IP-10 in den Überständen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 3/Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von **p < 0.01 und ****p < 0.0001 an.

Zudem wurden primäre Atemwegsepithelzellen für vier Stunden mit PolyI:C (Abb. 9 A) und *P. aeruginosa* (Abb. 9 B) stimuliert. Ein signifikanter Unterschied der basalen Abgabe von IL-6 und IL-8 zwischen den Atemwegsepithelzellen, die unter Normoxie oder Hypoxie für vier Stunden inkubiert wurden, war nicht messbar. Bereits eine vierstündigen Stimulation der primären Atemwegsepithelzellen mit PolyI:C und *P. aeruginosa* unter Normoxie führte zu einer signifikant gesteigerten Abgabe von IL-6 und IL-8. Die PolyI:C und *P. aeruginosa* induzierte Abgabe von IL-6 und IL-8 war unter Hypoxie signifikant vermindert. Eine Abgabe von IP-10 konnte zu diesem frühen Zeitpunkt in keinem der Zellüberstände nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet).

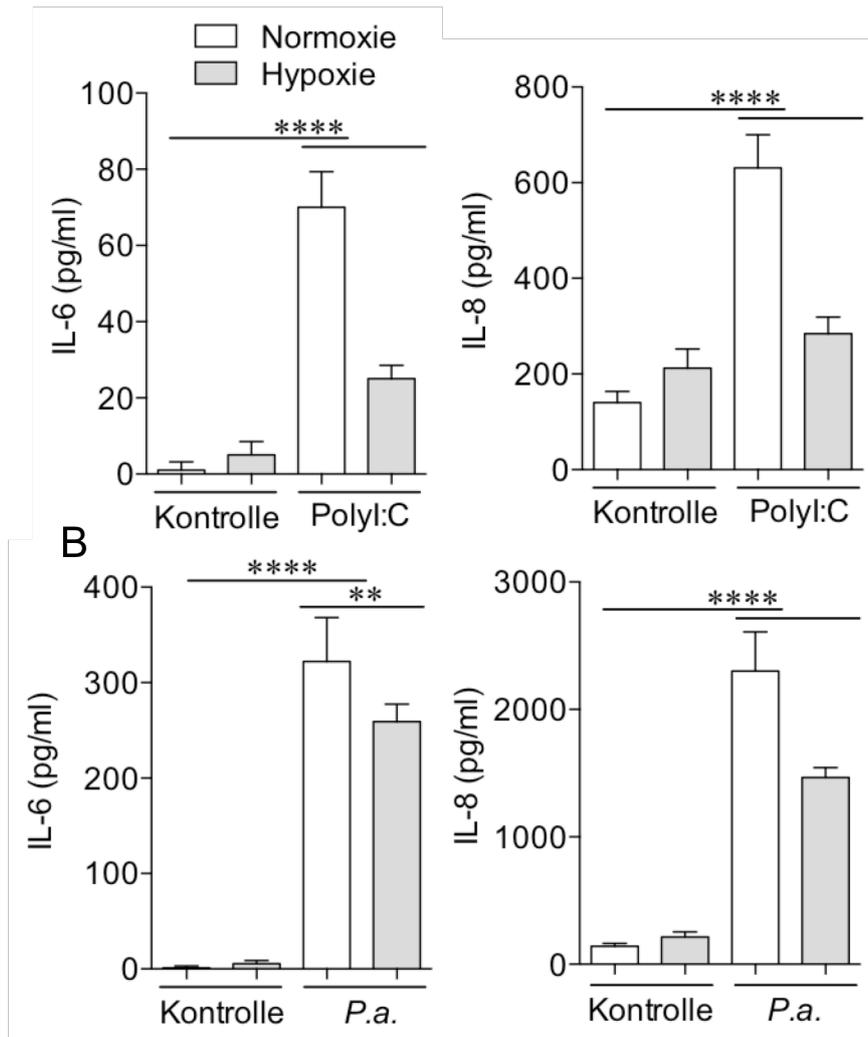


Abb. 9: Hypoxie vermindert die Abgabe von Entzündungsmediatoren von Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden für zwei Stunden der Normoxie oder Hypoxie (2% O₂) ausgesetzt und mit PolyI:C (1 µg/ml) (A) und *P. aeruginosa* (*Pa*, 10⁷ CFU/ml) (B) unter Normoxie oder Hypoxie für weitere vier Stunden stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in den Überständen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 3/Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von **p < 0.01 und ****p < 0.0001 an.

4.1.2. Hypoxie unterdrückt die Expression von IL-6 und hBD-2

Zusätzlich zu den im ELISA gemessenen Interleukinkonzentrationen wurde mittels qRT-PCR die relative Expression von IL-6 und dem AMP hBD-2 gemessen (Abb. 10). Auch hier zeigte sich, dass Hypoxie die basale Expression von IL-6 und hBD-2 nicht beeinflusst: Es war kein signifikanter Unterschied in der basalen Expression von IL-6 und hBD-2 zwischen Atemwegsepithelzellen, die unter Normoxie oder Hypoxie für vierundzwanzig Stunden inkubiert wurden, messbar. Die Stimulation mit Flagellin, PolyI:C und IL-1β führte zu einer signifikant gesteigerten Expression von IL-6 (Abb. 10 A) und hBD-2 (Abb. 10 B) unter normoxischen Bedingungen. Die durch diese Stimuli induzierte Expression von IL-6 und hBD-2 war unter Hypoxie signifikant geringer.

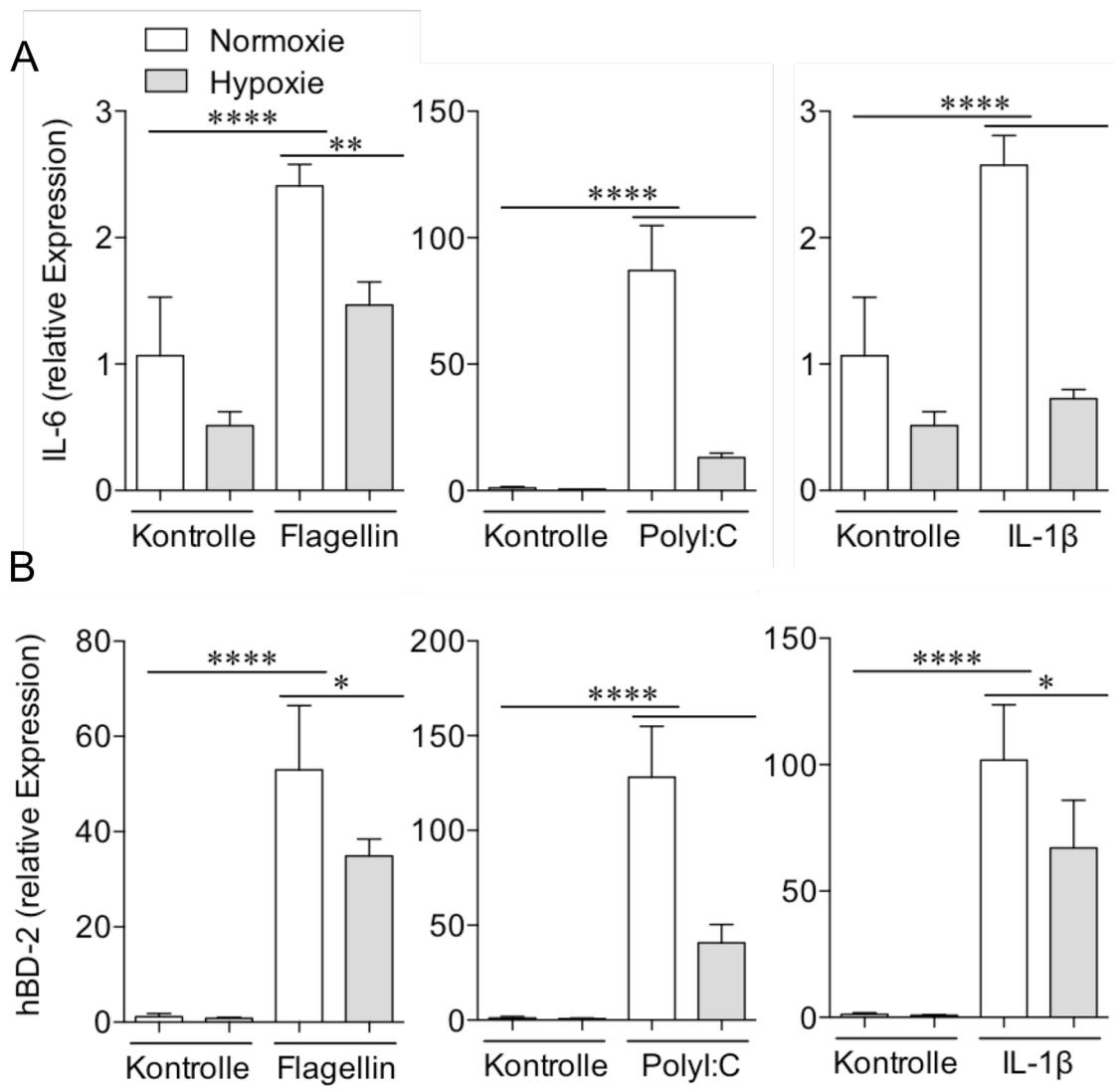


Abb. 10: Hypoxie vermindert die Expression von Entzündungsmediatoren von Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden unter Normoxie oder Hypoxie (2% O₂) für zwei Stunden inkubiert und anschließend mit Flagellin (1 μ g/ml), PolyI:C (1 μ g/ml) und IL-1 β (1 ng/ml) unter Normoxie und Hypoxie für weitere vierundzwanzig Stunden stimuliert. Epitheliale RNA wurde isoliert und mittels qRT-PCR die Expression von IL-6 (A) und hBD-2 (B) bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n \geq 3$ /Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und **** $p < 0.0001$ an.

Die erhobenen Daten zeigen, dass Hypoxie die Abgabe und die Expression von Entzündungsmediatoren sowie des AMP hBD-2 nach Kontakt mit mikrobiellen Stimuli hemmt.

4.2. Der Hypoxie-imitierende Agent CoCl_2 vermindert die Abgabe von Entzündungsmediatoren

Um den Effekt der Hypoxie zu untermauern und die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 in diesem Bezug zu klären, wurden primäre Atemwegsepithelzellen mit CoCl_2 vorinkubiert, gefolgt von der Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (Abb. 11 A) und PolyI:C (Abb. 11 B) in CoCl_2 -freiem Medium. CoCl_2 stabilisiert HIF-1 α und wird daher auch als Hypoxie-imitierendes Agens angesehen (Wang, Jiang et al. 1995). Die Zellen, die mit *P. aeruginosa* und PolyI:C behandelt wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Abgabe von IL-6 und IP-10. Die nur mit CoCl_2 behandelten Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Interleukinabgabe im Vergleich zu den Kontrollen. Jedoch unterdrückte CoCl_2 die Abgabe von IL-6 und IP-10 in den mit *P. aeruginosa* und PolyI:C stimulierten Zellen signifikant (Abb. 11 A und B).

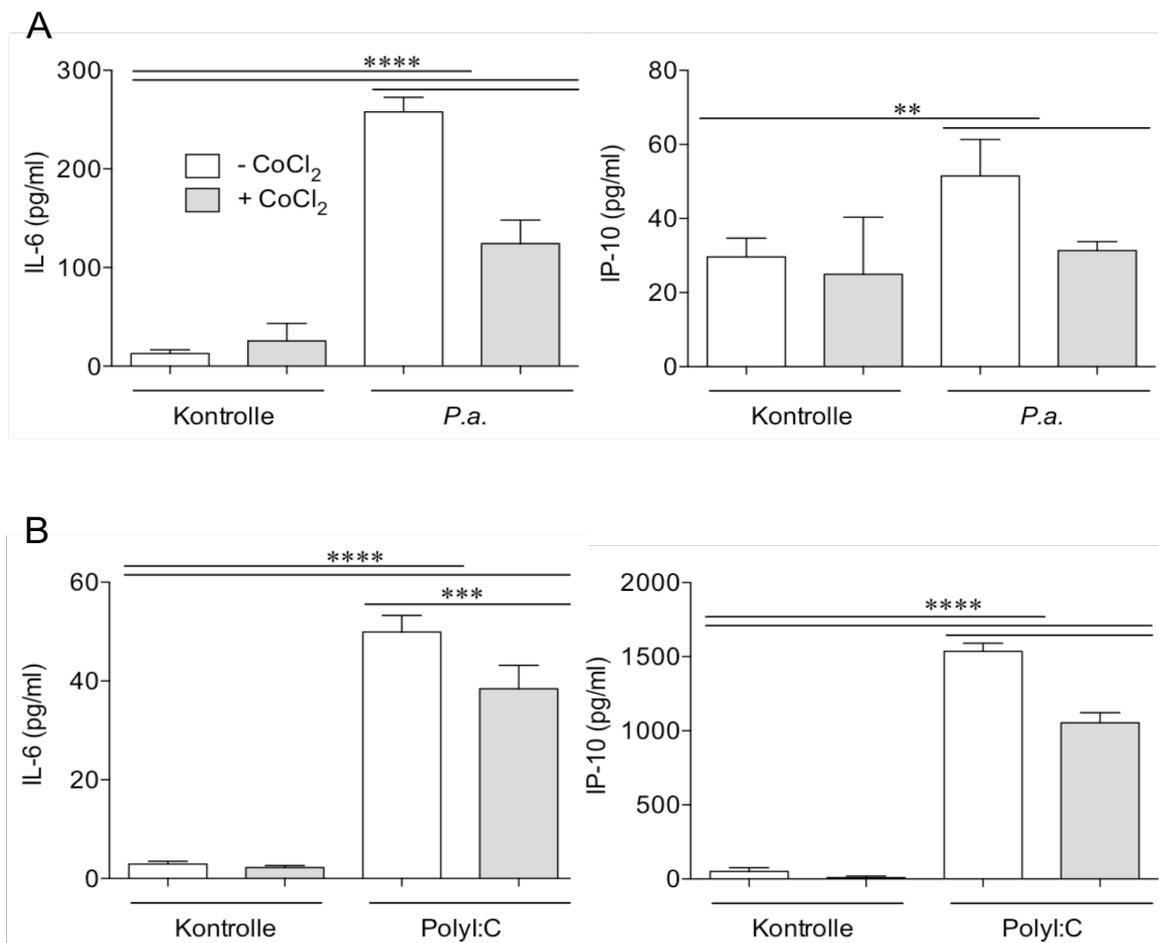


Abbildung 11: CoCl_2 vermindert die Abgabe von Entzündungsmediatoren von Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden für drei Stunden mit CoCl_2 (200 μM) vorbehandelt und danach mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (*Pa*, 10^7 CFU/ml) (A) oder PolyI:C (1 $\mu\text{g/ml}$) (B) in CoCl_2 -freiem Medium für 24 Inkubiert. Die Konzentrationen von IL-6 und IP-10 aus den Überständen wurden mittels ELISA analysiert. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n \geq 3$ /Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$ an.

Bei Stabilisierung von HIF-1 α und somit der Imitation von hypoxischen Bedingungen zeigt sich eine geringere Produktion von Interleukinen nach mikrobieller Stimulation. Dies deutet darauf hin, dass HIF-1 die Wirkung der Hypoxie in Atemwegsepithelzellen vermittelt.

4.3. Hypoxie hemmt die antimikrobielle Aktivität von Atemwegsepithelzellen

Da die Entzündungsantwort in Atemwegsepithelzellen unter Hypoxie geringer ausfällt, stellte sich die Frage, inwiefern die antimikrobielle Aktivität hiervon betroffen sein könnte. Hierzu wurden polarisierte primäre Atemwegsepithelzellen unter Normoxie oder Hypoxie für drei Stunden inkubiert, apikal mit lebendigen *P. aeruginosa* stimuliert und für weitere sechs Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Es wurde untersucht, ob das Wachstum von den Bakterien an der epithelialen Oberfläche von Hypoxie beeinflusst wird.

Auf der Oberfläche von polarisierten Atemwegsepithelzellen ließen sich sechs Stunden nach apikaler Infektion unter Normoxie keine *Pseudomonaden* mehr nachweisen, während auf den Zellen, die unter Hypoxie inkubiert wurden, lebendige Bakterien vorhanden waren (Abb. 12).

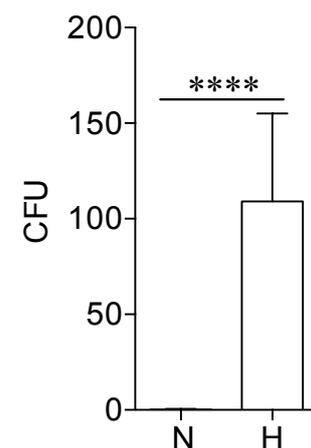


Abb. 12: Hypoxie beeinträchtigt die antimikrobielle Aktivität von Atemwegsepithelzellen. Polarisierte humane Atemwegsepithelzellen wurden unter normoxischen (N) oder hypoxischen (2% O₂) (H) Bedingungen für drei Stunden kultiviert und danach apikal mit 40 μ l lebendigen *P. aeruginosa* (*Pa*, 10⁵ CFU/ml) infiziert und für weitere sechs Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Die Anzahl lebendiger Bakterien wurde aus den apikalen Spülungen (100 μ l PBS) sechs Stunden nach der Infektion ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n \geq 3/Gruppe). Der Balken gibt einen signifikanten Unterschied von ****p < 0,0001 an.

Die Konzentration von IL-6 (Abb. 13 A) und IP-10 (Abb. 13 B) in den basolateralen Kompartimenten der Transwells fiel unter Hypoxie nach Stimulation mit den lebendigen *P. aeruginosa* signifikant geringer aus, obwohl eine Persistenz der Erreger apikal noch vorlag (Abb 12). In Zusammenschau mit dem höheren Interleukinspiegel unter Normoxie und der deutlich erhöhten Anzahl der *Pseudomonaden* unter Hypoxie, legen die Ergebnisse nahe, dass die antimikrobielle Aktivität der Atemwegsepithelzellen durch Hypoxie gehemmt wird.

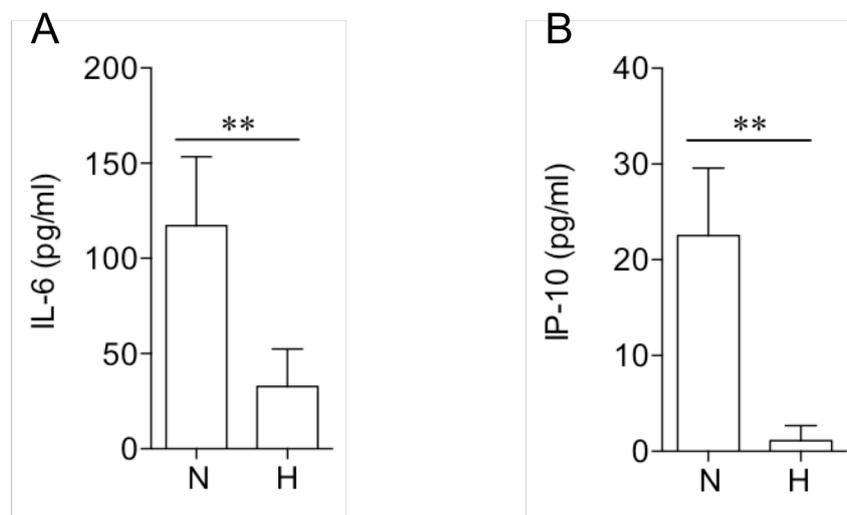


Abb. 13: Hypoxie vermindert die Abgabe von Entzündungsmediatoren von polarisierten Atemwegsepithelzellen. Polarisierte humane Atemwegsepithelzellen wurden unter normoxischen (N) oder hypoxischen (2% O₂) (H) Bedingungen für drei Stunden kultiviert, danach apikal mit 40µl lebendigen *P. aeruginosa* (*Pa*, 10⁵ CFU/ml) infiziert und für weitere sechs Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Die basolaterale Abgabe von IL-6 (A) und IP-10 (B) wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 3/Gruppe). Die Balken geben signifikante Unterschiede von **p < 0,01) an.

4.4. Die Rolle von HIF-1 bei der Aktivierung angeborener Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen

4.2.1. Die Behandlung mit siRNA gegen HIF-1α führt zu einer erhöhten Abgabe von Interleukinen in Atemwegsepithelzellen

Da Hypoxie und CoCl₂ die Abgabe und Expression von Entzündungsmediatoren auf mikrobielle Stimuli in Atemwegsepithelzellen vermindern, sollte als nächstes geklärt werden, ob HIF-1, welcher durch Hypoxie und CoCl₂ stabilisiert wird, für diese Effekte verantwortlich ist. Hierzu wurde siRNA gegen HIF-1α und unspezifische Kontroll-siRNA in primären Atemwegsepithelzellen eingesetzt. Der Knockdown von HIF-1α

konnte mit qRT-PCR für Zellen, die sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie inkubiert wurden, bestätigt werden (Abb. 14).

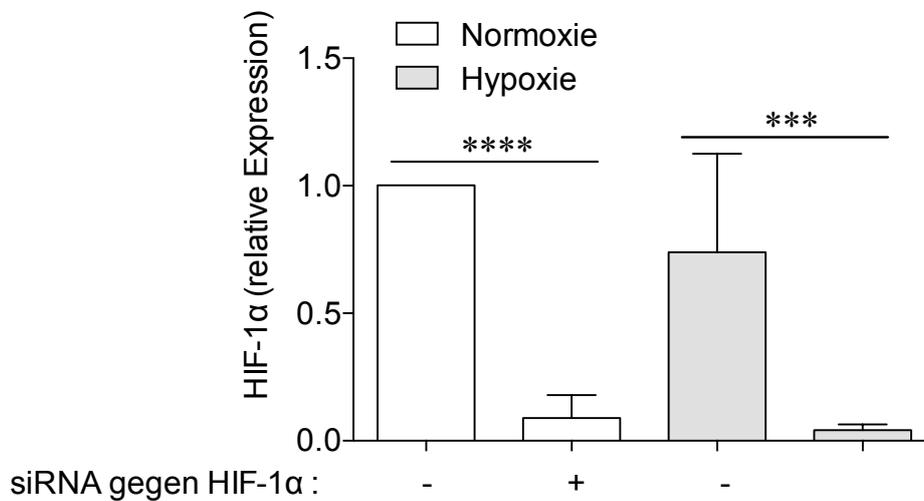


Abbildung 14: Der Einsatz von siRNA gegen HIF-1α führt zu einer signifikant verminderten relativen Expression von HIF-1α. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch gegen HIF-1α (+) behandelt und unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Mittels qRT-PCR wurde der Knockdown nachgewiesen. Die Balken geben signifikante Unterschiede von *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ an.

Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden unter normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) Bedingungen kultiviert, danach mit PolyI:C stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert (Abb. 15). Bei si-RNA-vermittelter verminderter Expression von HIF-1α zeigte sich eine erhöhte basale Abgabe von IL-6 (Abb. 15 A), IL-8 (Abb. 15 B) und IP-10 (Abb. 15 C). Nach der Stimulation mit PolyI:C konnte in den Atemwegsepithelzellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, unter Normoxie ein deutlicher Anstieg der Interleukinproduktion nachgewiesen werden. Die durch PolyI:C induzierte Abgabe von IL-6, IL-8 und IP-10 fiel unter Hypoxie in mit Kontroll-siRNA behandelten Atemwegsepithelzellen etwas geringer aus. Atemwegsepithelzellen, die mit siRNA gegen HIF-1α behandelt worden waren, zeigten nach Stimulation mit PolyI:C eine gesteigerte Abgabe von IL-6, IL-8 und IP-10 im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten und mit PolyI:C-stimulierten Zellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Entzündungsantwort von Atemwegsepithelzellen über HIF-1 gehemmt wird.

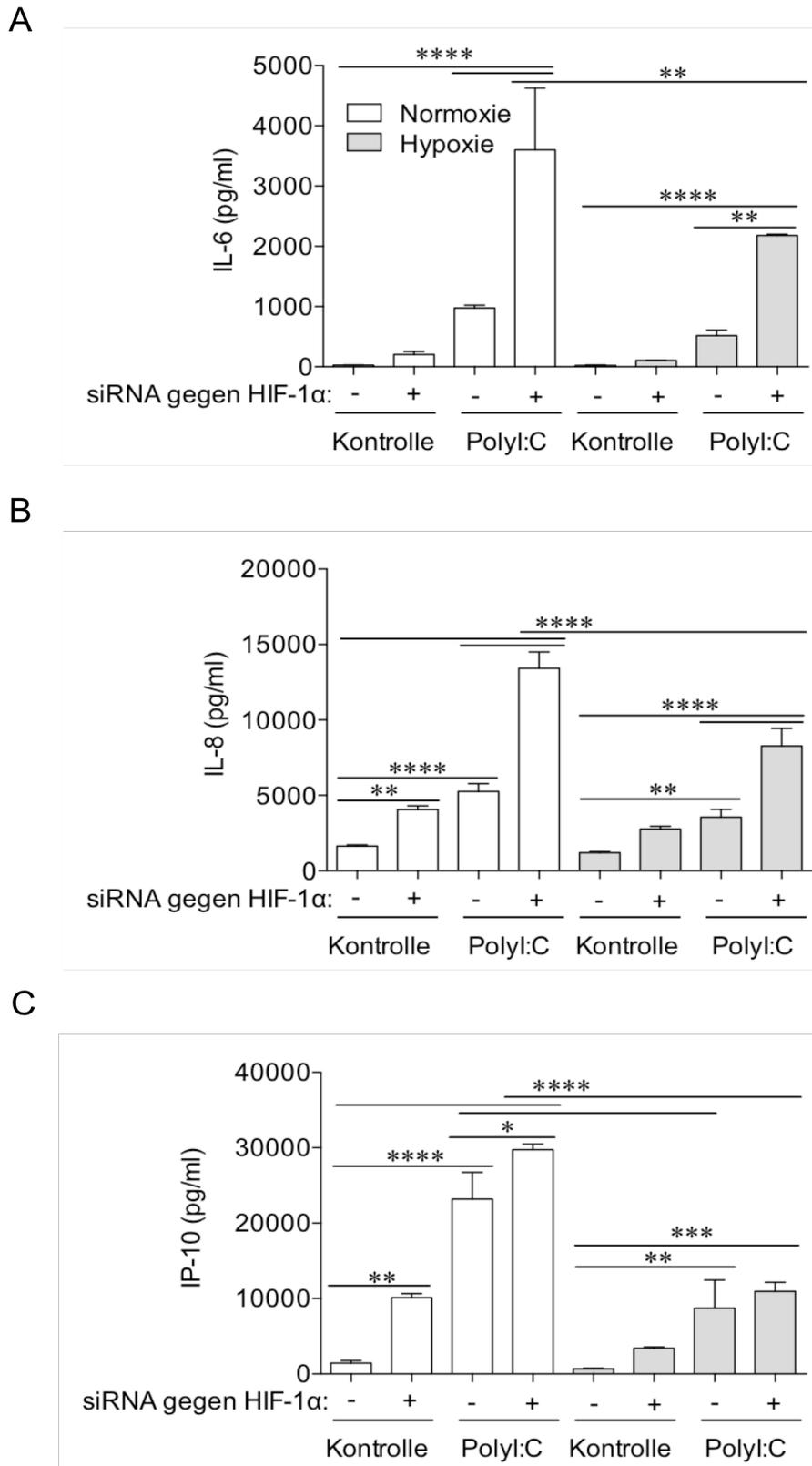
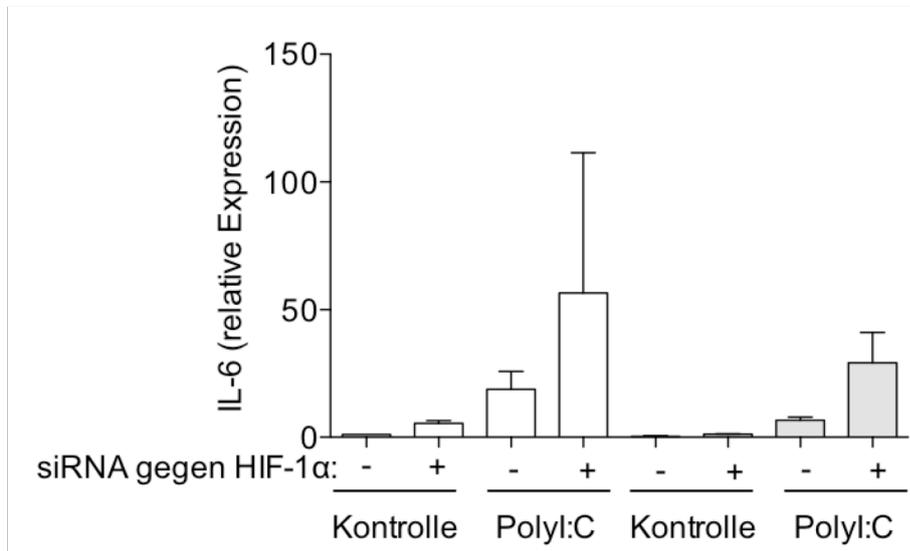


Abb. 15: Die verminderte Expression von HIF-1α führt zu einem Anstieg der Abgabe von Entzündungsmediatoren in primären Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch für HIF-1α mRNA (+) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden unter normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) Bedingungen kultiviert, danach mit Polyl:C (1µg/ml) (A-C) stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Die Konzentration von IL-6 (A), IL-8 (B) und IP-10 (C) wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 3/Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 und ****p < 0.0001 an.

Die relative Expression von IL-6 (Abb. 16 A) und des AMPs hBD-2 (Abb. 16 B) stieg nach siRNA-Behandlung gegen HIF-1 α und Stimulation mit PolyI:C in primären Atemwegsepithelzellen an (Abb. 16).

A



B

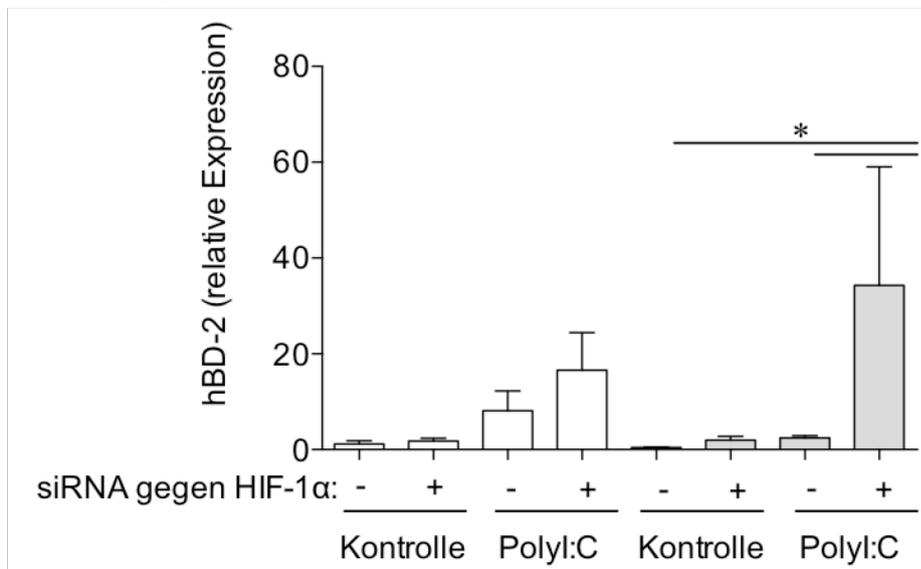


Abb. 16: Die verminderte Expression von HIF-1 α führt zu einem Anstieg der Expression von IL-6 und hBD-2 in primären Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch für HIF-1 α mRNA (+) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden unter normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) kultiviert, danach mit PolyI:C (1 μ g/ml) (A-C) beimpft und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Epitheliale RNA wurde isoliert die Induktion von IL-6 (A) und hBD-2 (B) mittels qRT-PCR ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n \geq 3/Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von *p < 0.05 an.

Um sicherzustellen, dass eine Hypoxie von 2% Sauerstoff und die Verwendung von siRNA nicht als Solches zu einem erhöhten Zelltod führen, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Es konnten keine erhöhten LDH-Spiegel bei den unter Hypoxie inkubierten oder mit siRNA behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 17). Lediglich die Stimulation mit PolyI:C führte zu einer minimalen aber nicht signifikanten Erhöhung der LDH. Die unter Hypoxie inkubierten Zellen zeigten etwa gleich hohe Werte wie die unter Normoxie behandelten Zellen. Bei der Behandlung siRNA spezifisch gegen HIF-1 α fielen die LDH-Werte sogar tendenziell niedriger als bei den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen aus. Ein erhöhter Zelltod bzw. eine verminderte Zellviabilität als Erklärung für eine verminderte Produktion von Entzündungsmediatoren ist somit nicht wahrscheinlich.

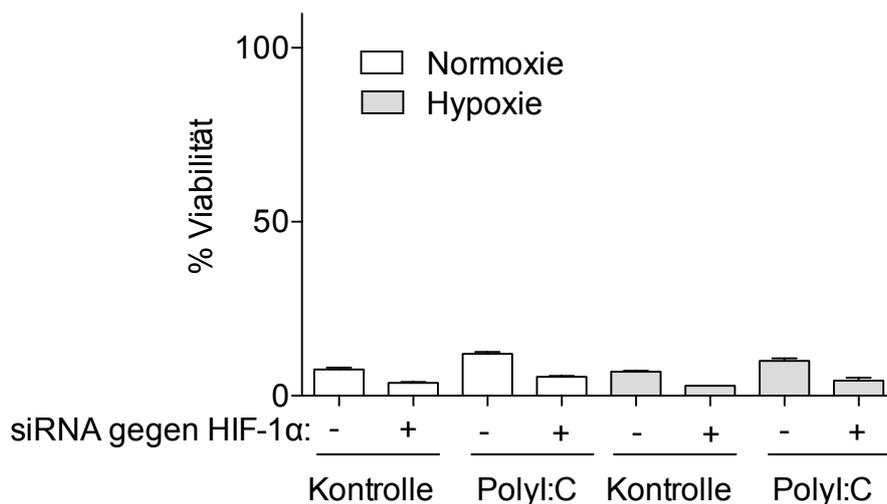


Abb. 17: Der Einsatz von siRNA gegen HIF-1 α und die Hypoxie selbst führen zu keiner verminderten Viabilität. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch gegen HIF-1 α mRNA (+) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden unter normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) kultiviert, danach mit PolyI:C (1 μ g/ml) stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Mittels LDH-Zytotoxizität Assay wurde die LDH-Menge bestimmt und prozentual zu einem Kontroll-Lysat angegeben.

Nach der Transfektion mit siRNA wurden Atemwegsepithelzellen auch mit Flagellin (Abb. 18) stimuliert und unter Normoxie inkubiert. Bei verminderter Induktion von HIF-1 α zeigte sich eine erhöhte basale Abgabe von IL-6. Die Zellen, die mit siRNA gegen HIF-1 α behandelt worden waren, zeigten nach Stimulation mit Flagellin eine weiter gesteigerte Abgabe von IL-6 im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten und mit Flagellin stimulierten Zellen.

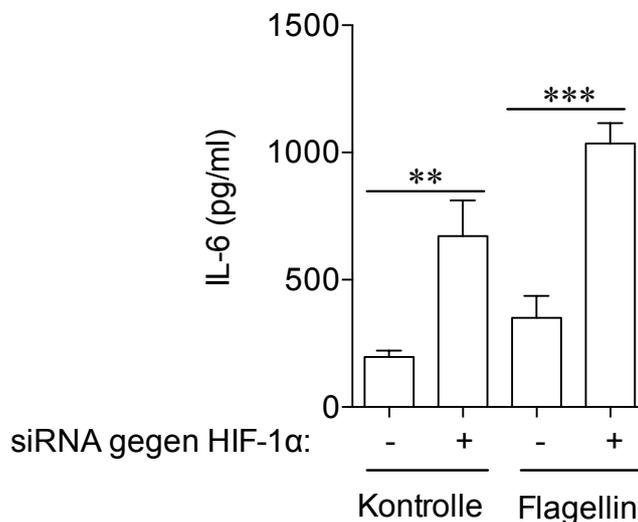


Abb. 18: Die verminderte Expression von HIF-1α führt zu einem Anstieg der Abgabe von Entzündungsmediatoren in primären Atemwegsepithelzellen. Primäre Atemwegsepithelzellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch für HIF-1α mRNA (+) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Flagellin (1µg/ml) stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie inkubiert. Die Konzentration von IL-6 wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 3/Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von **p < 0.01 und ***p < 0.001 an.

4.2.2. Die Behandlung mit siRNA gegen HIF-1α führt zu einer erhöhten Abgabe von Interleukinen in Calu-3-Zellen

Es wurden auch Calu-3-Zellen mit siRNA gegen HIF-1α und Kontroll-siRNA behandelt (Abb. 19). Auch hier zeigte es sich, dass die Zellen mit Knockdown von HIF-1α basal mehr IL-6 (Abb. 19 A) abgaben. Die durch Flagellin induzierte Abgabe von IL-6 (Abb. 19 A) und IL-8 (Abb. 19 B) war in Calu-3-Zellen, die mit siRNA gegen HIF-1α behandelt wurden, signifikant erhöht.

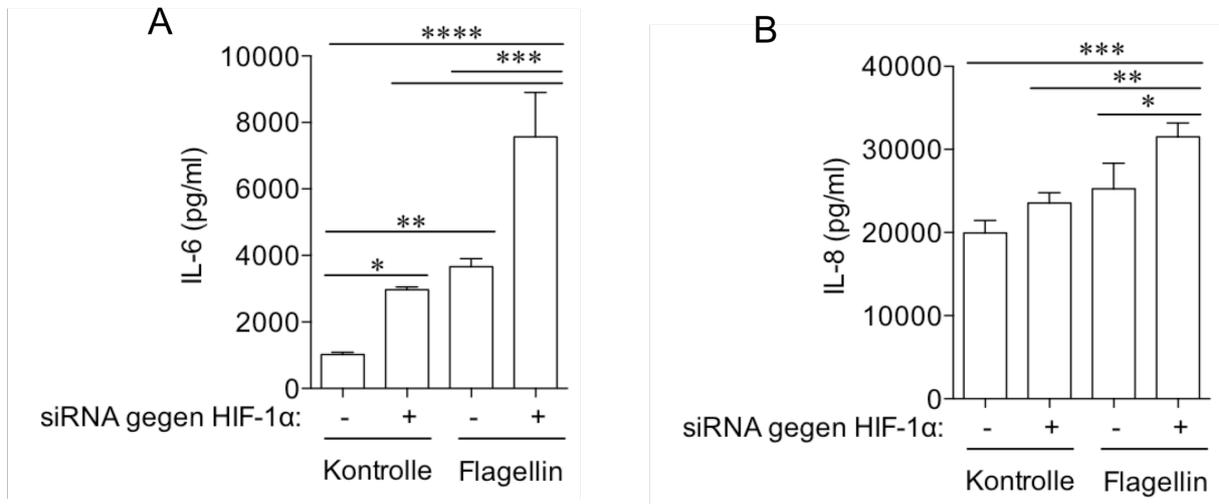


Abb. 19: Die verminderte Expression von HIF-1 α führt zu einem Anstieg der Abgabe von Entzündungsmediatoren in Calu-3-Zellen. Calu-3-Zellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch für HIF-1 α mRNA (+) transfiziert. Nach Transfektion wurden die Zellen mit Flagellin (1 μ g/ml) (A, B) stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie inkubiert. Die Konzentration von IL-6 (A) und IL-8 (B) wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n \geq 3$ /Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$ an.

Des Weiteren wurden Calu-3-Zellen wie die primären Atemwegsepithelzellen nach der Transfektion unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert und mit PolyI:C stimuliert (Abb. 20). Auch hier konnte durch den Knockdown von HIF-1 α eine gesteigerte Abgabe von IL-6 (Abb. 20 A) und IP-10 (Abb. 20 B) unter basalen Bedingungen nachgewiesen werden. Die durch PolyI:C induzierte Abgabe von IL-6 und IP-10 wurde durch die siRNA gegen HIF-1 α signifikant gesteigert.

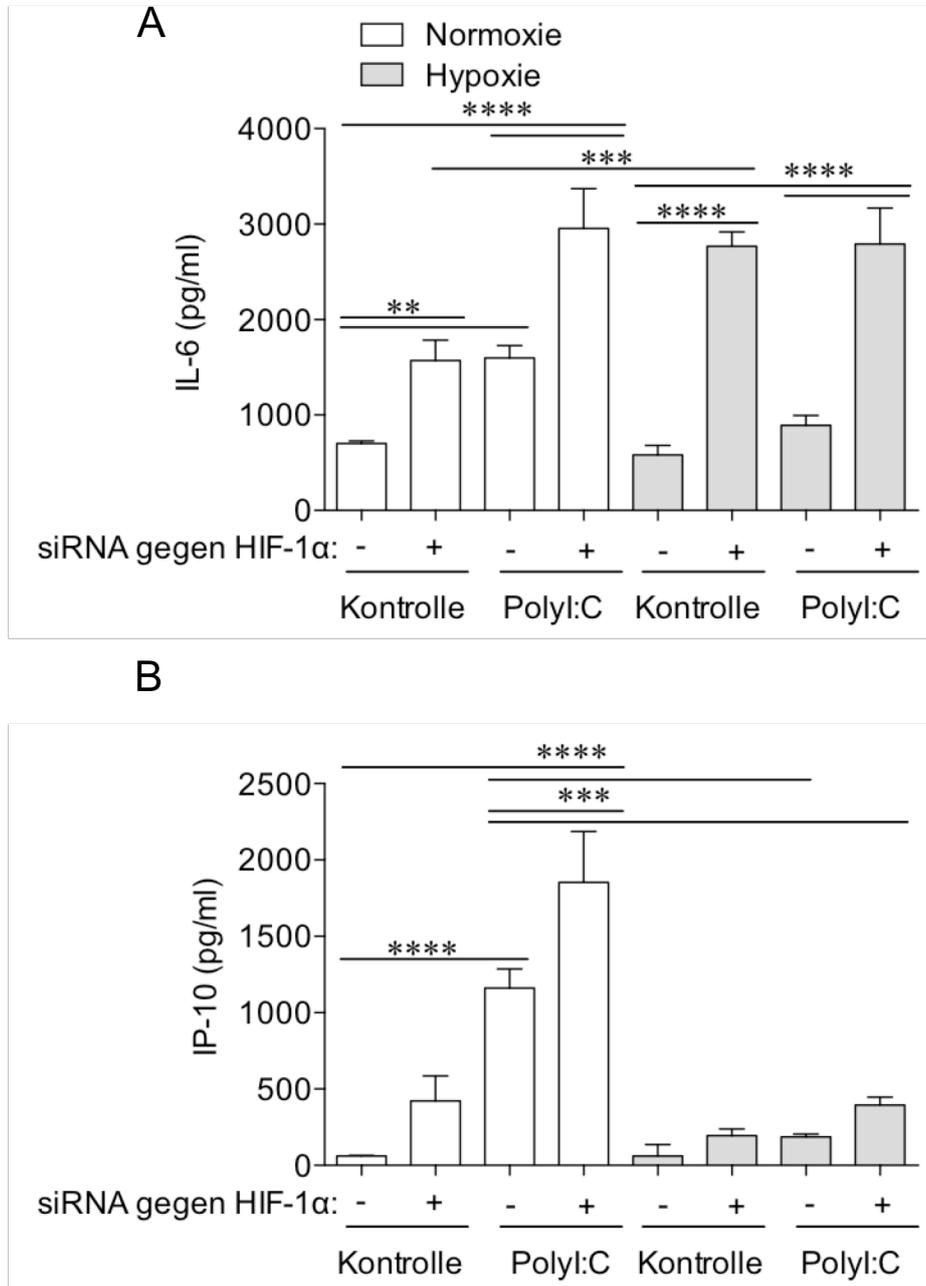


Abb. 20: Die verminderte Expression von HIF-1α führt zu einem Anstieg der Abgabe von Entzündungsmediatoren in Calu-3-Zellen. Calu-3-Zellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch für HIF-1α mRNA (+) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden unter normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) kultiviert, danach mit Polyl:C (1µg/ml) (A, B) stimuliert und für weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Die Konzentration von IL-6 (A) und IP-10 (B) wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 3/Gruppe) und sind repräsentativ für zwei verschiedene Versuche. Die Balken geben signifikante Unterschiede von **p < 0.01, ***p < 0.001 und ****p < 0.0001 an.

Um sicherzustellen, dass eine Hypoxie von 2% Sauerstoff und die Verwendung von siRNA auch bei Calu-3-Zellen nicht als Solches zu einem erhöhten Zelltod führen, wurde auch hier ein LDH-Assay durchgeführt. Es konnten keine signifikant erhöhten LDH-Spiegel bei den unter Hypoxie inkubierten oder mit siRNA behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 21). Ein erhöhter Zelltod bzw. eine verminderte Zellviabilität als Erklärung für eine verminderte Produktion von Entzündungsmediatoren ist somit wie bei den Primärzellen nicht wahrscheinlich.

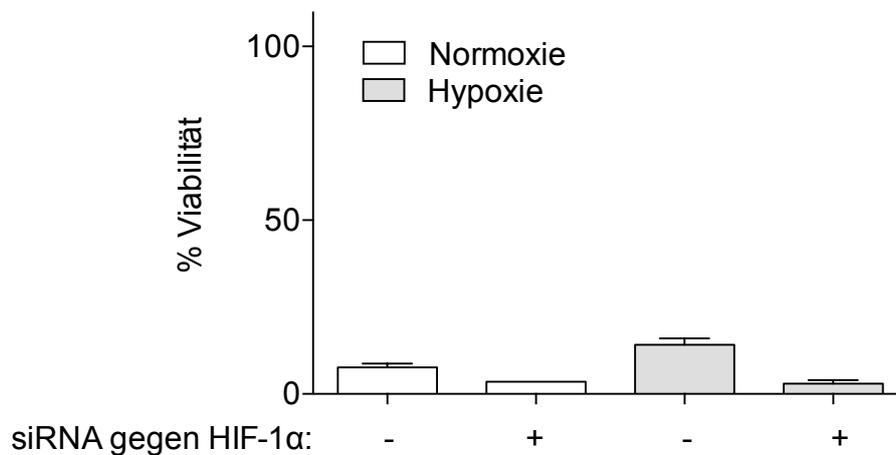


Abb. 21: Der Einsatz von siRNA gegen HIF-1 α und die Hypoxie selbst führen zu keiner verminderten Viabilität. Calu-3-Zellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (-) oder siRNA spezifisch gegen HIF-1 α mRNA (+) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für zwei Stunden unter normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) kultiviert, danach weitere vierundzwanzig Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Mittels LDH-Zytotoxizität Assay wurde die LDH-Menge bestimmt und prozentual zu einem Kontroll-Lysat angegeben

4.5. Der Einfluss von Hypoxie auf die Inflammation in Mäuselungen

4.3.1. Entzündungszellen in der Lunge

Um zu untersuchen, wie sich die Hypoxie auf die pulmonale Entzündung im Mausmodell auswirkt, wurden Mäuse für vierundzwanzig Stunden unter Hypoxie (10% O₂) oder Normoxie gehalten. Daraufhin wurden die Lungen mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* infiziert und die Mäuse anschließend für weitere vierundzwanzig Stunden unter Hypoxie oder Normoxie gehalten. In der bronchoalveolären Lavage (BAL) der Mäuse, die transnasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* infiziert und unter Hypoxie inkubiert wurden, zeigte sich im Vergleich zu den Mäusen, die nach der Stimulation unter Normoxie inkubiert wurden, kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an gesamten Entzündungszellen (Abb. 22 A)

und der Anzahl an Makrophagen (Abb. 22 B) und neutrophilen Granulozyten (Abb. 22 C). Die Gesamtzellzahl ($p=0,166$) und die Anzahl an neutrophilen Granulozyten ($p=0,160$) fiel jedoch unter Hypoxie tendenziell geringer aus.

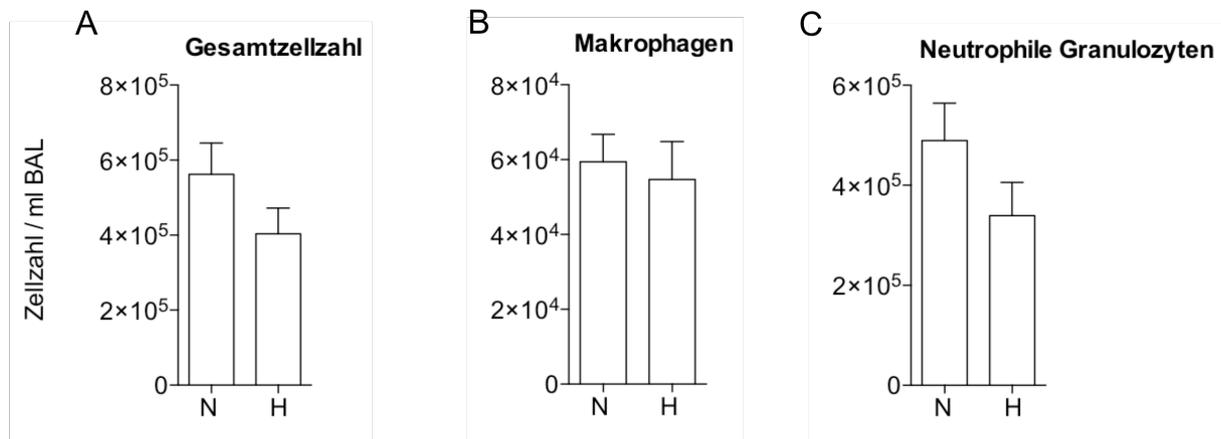


Abb. 22: Die Auswirkung der Hypoxie auf die Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Mäusen. Mäuse wurden für vierundzwanzig Stunden der Normoxie (N) oder der Hypoxie (10% O₂) (H) ausgesetzt, dann transnasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* in PBS infiziert und weitere vierundzwanzig Stunden der Normoxie oder Hypoxie ausgesetzt. Die Anzahl aller Entzündungszellen (A), der Makrophagen (B) und Neutrophilen Granulozyten (C) wurden in der BAL bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n \geq 7$ /Gruppe).

4.3.2. KC, MIP-2 und IL-6 Abgabe unter Normoxie und Hypoxie in BAL und Lungenhomogenisat

In der BAL aus den Mäusen, die unter Hypoxie gehalten wurden, waren die Konzentrationen der Zytokine KC (Abb. 23 A), MIP-2 (Abb. 23 B) und IL-6 (Abb. 23 C) signifikant vermindert. Dieser Unterschied zeigte sich auch im Lungenhomogenisat. Auch hier waren die Konzentrationen von KC (Abb. 23 A), MIP-2 (Abb. 23 B) und IL-6 (Abb. 23 C) bei den Tieren, die unter Hypoxie gehalten wurden, verringert. Im Blutplasma waren die Konzentrationen von KC (Abb. 23 A) und IL-6 (Abb. 23 C) verringert, jedoch nicht signifikant. MIP-2 konnte im Blutplasma nicht nachgewiesen werden (Abb. 23 B).

Somit lässt sich auch in vivo eine verminderte Entzündungsantwort unter Hypoxie nachweisen.

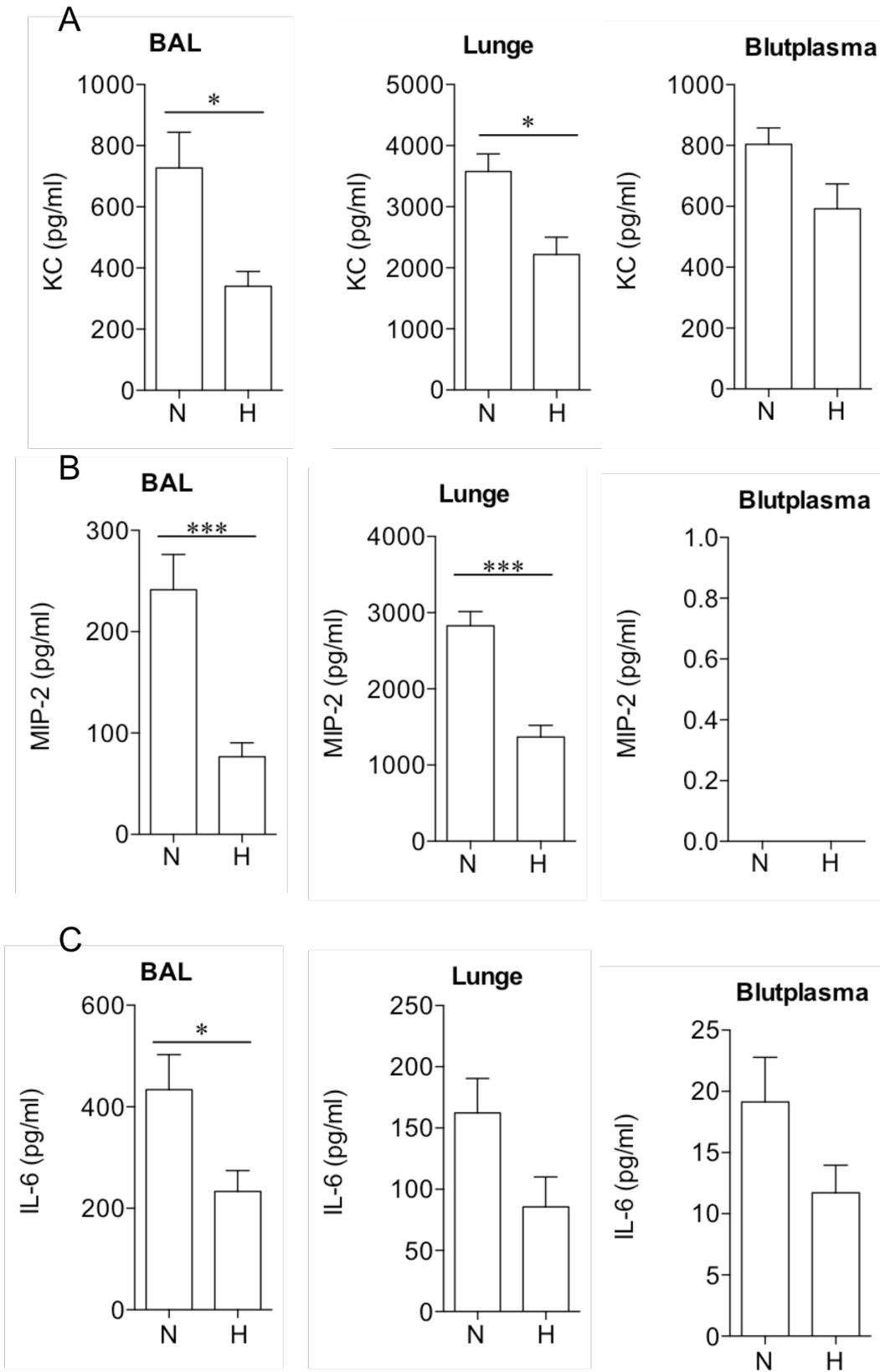


Abb. 23: Die Konzentrationen von inflammatorischen Zytokinen sind in den Lungen von Mäusen, die der Hypoxie ausgesetzt wurden, vermindert. Mäuse wurden für vierundzwanzig Stunden der Normoxie (N) oder der Hypoxie (10% O₂) (H) ausgesetzt, dann transnasal mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* in PBS infiziert und weitere vierundzwanzig Stunden der Normoxie oder Hypoxie ausgesetzt. Die Konzentration von KC (A), MIP-2 (B) und IL-6 (C) wurde in der bronchoalveolären Lavage (BAL), im Lungenhomogenisat (Lunge) und im Blutplasma gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen (n ≥ 7/Gruppe). Die Balken geben signifikante Unterschiede von *p < 0,05 und ***p < 0,001 an.

5. Diskussion

Akute und chronische Lungenerkrankungen sind häufig mit einer mukosalen und systemischen Hypoxie assoziiert (Worlitzsch, Tarran et al. 2002, Schaible, Schaffer et al. 2010, Yasuo, Mizuno et al. 2011). So lässt sich bei Patienten mit einer COPD im Stadium einer akuten Exazerbation eine Hypoxämie feststellen (Papi, Luppi et al. 2006) und Patienten mit CF weisen nach einer Infektion mit *P. aeruginosa* eine mukosale Hypoxie auf (Worlitzsch, Tarran et al. 2002). Kommt es zu einer Infektion, muss die Immunantwort adäquat reguliert sein, damit Pathogene eliminiert werden können und eine Immunpathologie verhindert wird. Es ist deshalb wichtig, den Einfluss der Hypoxie auf Entzündungsvorgänge zu verstehen. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher die Wirkung der Hypoxie und die Rolle von HIF-1 auf angeborene Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen bei mikrobieller Infektion.

5.1. Die Auswirkung der Hypoxie auf die Entzündungsantwort von Atemwegsepithelzellen

Eine wesentliche Stärke dieser Arbeit liegt in der Verwendung einer Hypoxiekammer, die Dank entsprechender Sensoren den Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck auf einem eingestellten Level halten kann und somit konstante Versuchsbedingungen gewährleistet. Die in dieser Arbeit verwendete Hypoxiekammer erlaubte es, den Effekt der Hypoxie auf angeborene Immunmechanismen in Atemwegsepithelzellen unmittelbar zu untersuchen. Die Experimente mit der Hypoxiekammer wurden zudem mit dem Hypoxie-Imitator CoCl_2 und siRNA-Experimenten gegen HIF-1 α ergänzt, sodass die Auswirkung der Hypoxie auf Entzündungsvorgänge von Atemwegsepithelzellen mit verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht wurde. Viele Arbeiten, die den Einfluss der Hypoxie auf Entzündungsvorgänge bereits untersuchten, verzichteten hingegen häufig auf eine wie hier genutzte Hypoxiekammer und erheben ihre Daten nur mit Hypoxie-Imitatoren wie CoCl_2 (Ciafre, Niola et al. 2007, Dai, Gao et al. 2012) oder über die Hemmung von HIF-1 (Peyssonnaud, Boutin et al. 2008, Semenza 2010).

Eine weitere Stärke der vorliegenden Arbeit ist, dass für die grundlegenden Versuche primäre Atemwegsepithelzellen von unterschiedlichen Spendern verwendet wurden. Auch wenn eine Standardisierung leichter mit Zelllinien wie A549 oder Calu-3 erzielt werden kann, stellen Primärzellen ein für die Fragestellung deutlich geeigneteres

Modell dar. Sie gleichen dem natürlichen Atemwegsepithel viel mehr als eine Tumorzelle. Von Tumorzellen ist z.B. bekannt, dass deren Expression von Faktoren, die Hypoxie vermitteln, verändert ist (Powis, Kirkpatrick 2004). Außerdem bilden humane Atemwegsepithelzellen untereinander Zellverbindungen aus, die bei Tumorzellen wie A549-Zellen fehlen (Fessart, Begueret et al. 2013). Die in dieser Arbeit beschriebene Auswirkung der Hypoxie auf die Aktivierung der Atemwegsepithelzellen konnte bei allen Versuchen mit Primärzellen beobachtet werden. Somit sind die Experimente mit den primären Atemwegszellen für die Situation in Patienten hinsichtlich der Wirkung der Hypoxie auf die angeborene Immunantwort von Atemwegsepithelzellen aussagekräftiger als die Ergebnisse von Experimenten, die sich auf Krebszelllinien stützen.

Um herauszufinden, welche Auswirkung die Hypoxie auf die angeborenen Immunmechanismen von Atemwegsepithelzellen hat, wurden Atemwegszellen der Hypoxie ausgesetzt und mit *P. aeruginosa*, IL-1 β , bakteriellem Flagellin (Ligand für TLR-5) und dem synthetischen Analogon viraler dsRNA PolyI:C (Ligand für TLR-3) stimuliert. Hierbei stellte sich heraus, dass die Immunantwort bzw. Entzündungsreaktion und antimikrobielle Aktivität von Atemwegsepithelzellen durch die vorherrschende Hypoxie gehemmt wird: Es wurden weniger Interleukine produziert und auch die Expression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 lag vermindert vor. Die Experimente mit IL-1 β und den verschiedenen TLR-Liganden weisen darauf hin, dass eine verminderte Aktivierung der Atemwegsepithelzellen nicht spezifisch für einzelne Signalwege ist, sondern eher aus der Adaptation der Zellen an einen verminderten Sauerstoffpartialdruck resultiert.

Diese Ergebnisse erscheinen überraschend, da die Literatur Veröffentlichungen aufführt, in denen nachgewiesen wurde, dass in verschiedenen Zelltypen die Hypoxie Entzündungsvorgänge fördert (Madjdipour, Jewell et al. 2003, Walmsley, Cowburn et al. 2006, Chao, Wood et al. 2009, Kim, Choi et al. 2010). So zeigen neutrophile Granulozyten eine höhere Phagozytosekapazität sowie eine geringere Apoptoserate unter Hypoxie (Walmsley, Cowburn et al. 2006). Alveolarmakrophagen werden bei einem reduzierten alveolären Sauerstofflevel aktiviert und schütten zirkulierende Mediatoren aus. Hierdurch kommt es zu einer systemische Entzündungsreaktion (Chao, Wood et al. 2009). Darüber hinaus sind in der Literatur Daten zu finden, in denen gezeigt wird, dass Epithelzelllinien eine höhere Abgabe von Entzündungsmediatoren unter Hypoxie zeigen. Signorelli et al. wiesen in den

Zellüberständen von unter Hypoxie (1% O₂) inkubierten A549 Zellen eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 im Vergleich zu unter Normoxie inkubierten Zellen nach (Signorelli, Jennings et al. 2010). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu jenen aus der hier vorliegenden Arbeit, in der keine erhöhte Abgabe von Zytokinen wie IL-6 nachgewiesen werden konnte. Signorelli et al. stimulierten die Atemwegsepithelzellen jedoch nicht mit Bakterien. Somit kann keine wirkliche Aussage zu der Immunantwort unter Hypoxie abgeleitet werden. Des Weiteren verwendeten Signorelli et al. für ihre Versuche A549-Zellen und keine primären Atemwegsepithelzellen. Diese Zellen entstammen einem humanen Adenokarzinom der Lunge.

Auf der anderen Seite zeigen Arbeiten von Ishida et al. und Loboda et al., dass Hypoxie einen inhibierenden Einfluss auf die Entzündungsantwort von Endothelzellen hat, also den gleichen Effekt wie er in dieser Arbeit für Atemwegsepithelzellen beschrieben wird. So kommt es in Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen zu einer verminderten Expression von Zellrezeptoren wie TLR-4, IL-1R1 (Interleukin-1-Rezeptor Typ 1) und TNF-R1 (TNF cell surface receptor 1) (Ishida, Kubo et al. 2002) und es wird weniger IL-8 gebildet (Loboda, Stachurska et al. 2009). Diese Veröffentlichungen unterstützen die Ergebnisse aus dieser Arbeit. Auf Grund der gegensätzlichen Wirkung der Hypoxie auf die Immunantwort in den verschiedenen Zelltypen legen die beschriebenen Daten nahe, dass eine Hypoxie zellspezifisch wirkt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Zellkulturversuche konnten auch in vivo in einem Tierversuch bestätigt werden. So zeigte sich in den Lungen von Mäusen, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden und mit hitzeinaktivierten Bakterien infiziert worden waren, ebenfalls eine verminderte Entzündungsantwort unter Hypoxie im Vergleich zu unter Normoxie gehaltenen Mäusen. Die Konzentration von Zytokinen wie IL-6 und KC, die auch von Atemwegsepithelzellen gebildet werden, waren in den Lungen der Mäuse, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, vermindert nachweisbar.

Kritisch hinterfragt werden muss, ob eine Sauerstoffkonzentration von 2% eine zelltoxische Wirkung haben könnte und der Grund für eine verminderte Produktion von Entzündungsmediatoren in einem erhöhtem Zelluntergang liegt. Die Mikroskopie nach der Inkubation unter Hypoxie zeigte jedoch keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen. Die Atemwegsepithelzellen bildeten nach der Inkubation

unter Hypoxie wie die unter Normoxie kultivierten Zellen einen geschlossenen Zellrasen. In den Zellkulturüberständen der unter Hypoxie inkubierten Atemwegsepithelzellen konnten auch keine erhöhten LDH-Werte nachgewiesen werden. Zudem wirkt sich die Hypoxie nicht auf die basale Expression und Abgabe von Entzündungsmediatoren von Atemwegsepithelzellen aus. Die Wirkung der Hypoxie wurde also erst nach mikrobieller Stimulation sichtbar. Dass hypoxische Bedingungen mit einem Sauerstoffanteil bis 1% zu keiner verminderten Integrität der Plasmamembran von Atemwegszellen führen, wurde bereits gezeigt (Signorelli, Jennings et al. 2010).

5.2. Die Auswirkung der Hypoxie auf die Elimination von Pathogenen im Atemwegsepithel

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Hypoxie eine suffiziente Immunabwehr an den epithelialen Oberflächen des Respirationstrakts beeinträchtigt. Zudem könnte unter Hypoxie eine verminderte Bildung von Faktoren wie AMP, die für eine Tötung von Bakterien oder deren Wachstumshemmung verantwortlich sind, bakterielle Besiedlung an der epithelialen Oberfläche begünstigen. Hierdurch könnte die Hypoxie zu einer exzessiven Kolonisierung der Atemwege, wie sie für Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen wie COPD oder CF typisch ist, beitragen. Auch das Auftreten viraler Atemwegsinfektionen könnte durch die mangelnde Immunabwehr von Atemwegsepithelzellen oder die gesteigerte bakterielle Kolonisierung unter hypoxischen Bedingungen gefördert werden. Die Ergebnisse aus dem Versuch mit den polarisierten Atemwegsepithelzellen dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass Hypoxie die bakterielle Kolonisierung begünstigt. So zeigte sich an der epithelialen Oberfläche von polarisierten Atemwegszellen ein deutlich gesteigertes Wachstum von *P. aeruginosa*. Außerdem kam es zu einer verminderten Abgabe von Entzündungsmediatoren. Aktuelle Daten anderer Forschergruppen unterstützen die Hypothese, dass Atemwegsepithelzellen unter Hypoxie verändert auf *P. aeruginosa* reagieren. Unter Hypoxie wird die Internalisierung von *P. aeruginosa* in Alveolar- und Atemwegsepithelzellen negativ beeinflusst (Schaible, McClean et al. 2013). Ein Grund für eine vermehrte Entzündung in den Atemwegen bei chronisch Lungenkranken wie beispielsweise CF-Patienten (Urquhart, Montgomery et al. 2005) könnte ein primäres Unvermögen des Immunsystems unter

Hypoxie sein, die Erreger zu eliminieren. Durch ihre Persistenz und Kolonisierung in den Atemwegen könnten sie somit sekundär zu erhöhten Entzündungsparametern führen, die ihrerseits eine effiziente Klärung der Erreger stören.

Schaible et al. konnten ebenfalls eine verminderte Internalisierung von *P. aeruginosa* in A549 Zellen unter Hypoxie zeigen. Jedoch wiesen sie zusätzlich mittels LDH-Assay einen erhöhten Zelltod bei den Zellen nach, die nicht der Hypoxie ausgesetzt waren und eine erhöhte Internalisierung des Erregers zeigen (Schaible, McClean et al. 2013). Somit sprechen sie der Hypoxie eine protektive Rolle bei der Infektion mit *P. aeruginosa* in Atemwegsepithelzellen zu. Anzumerken ist hier, dass die Internalisierung des Erregers nicht unbedingt einer Infektion gleichzusetzen ist, da sie auch im Rahmen einer Immunantwort erfolgen kann (Lepanto, Lecumberry et al. 2013). Die apikale Persistenz des Erregers bzw. die Kolonisierung des Epithels unter Hypoxie kann darüber hinaus die Bildung von Biofilmen durch den Erreger fördern. Diese Biofilme haben eine Schwächung des Immunsystems zur Folge und behindern darüber hinaus die Wirkung von Antibiotika. Dies ist ein großes Problem beispielsweise bei CF-Patienten (Jensen, Bjarnsholt et al. 2007, Lepanto, Lecumberry et al. 2014). Auf welche Weise die Hypoxie zur Bildung von Biofilmen beiträgt ist Gegenstand der Forschung.

Natürlich müssen auch die Erkenntnisse aus diesen in vitro Experimenten der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Relevanz für Patienten kritisch hinterfragt werden, da nicht nur die Sauerstoffversorgung der Zellen entscheidend für die Immunabwehr ist, sondern auch die Eigenschaften des Pathogens. *P. aeruginosa* ist ein opportunistischer Erreger, der bei Patienten mit CF zu rezidivierenden Infekten der Atemwege führen kann (Spilker, Coenye et al. 2004). Allerdings sind *P. aeruginosa* eigentlich aerobe Erreger, die durch Stoffwechselanpassung in der Lage sind, sich auch unter anaeroben Bedingungen zu vermehren, jedoch werden hier weniger Kolonien im Vergleich zu normoxischen Bedingungen gebildet (Hassett 1996). Für sich hier anschließende Experimente sollte daher auch *P. aeruginosa* verwendet werden, die an Hypoxie adaptiert sind.

5.3. Die Rolle von HIF-1 bei der Entzündungsantwort in Atemwegsepithelzellen

Zusätzlich legen die Versuche dieser Arbeit mit CoCl_2 , das die Stabilisierung von HIF-1 α vermittelt (Wang, Jiang et al. 1995, Chachami, Simos et al. 2004, Ciafre, Niola et al. 2007), und mit siRNA gegen HIF-1 α nahe, dass HIF-1 für den hemmenden Einfluss der Hypoxie auf die Inflammation von Atemwegsepithelzellen nach mikrobieller Stimulation verantwortlich ist. Bei der Verwendung von CoCl_2 geben Atemwegsepithelzellen weniger Entzündungsmediatoren nach der Stimulation mit mikrobiellen Stimuli ab. Die Behandlung mit siRNA gegen HIF-1 α führt zu einem gegenteiligen Effekt, nämlich einer gesteigerten Abgabe von Entzündungsmediatoren. Diese Ergebnisse erscheinen zunächst überraschend, da Studien nahe legen, dass HIF-1 α als ein Hauptregulator von angeborenen Immunmechanismen Entzündungsvorgänge in Entzündungszellen unterstützt und nicht hemmt (Cramer, Yamanishi et al. 2003, Peyssonnaux, Datta et al. 2005, Zinkernagel, Johnson et al. 2007). Im Falle einer bakteriellen Infektion kommt es in Phagozyten zu der Stabilisierung von HIF-1 α , auch unter normoxischen Bedingungen. Hieraus resultiert eine Steigerung in der Produktion von Immunmolekülen und der antibakteriellen Kapazität (Peyssonnaux, Datta et al. 2005). Granulozyten und Makrophagen sind auf HIF-1 α bei der Immunabwehr angewiesen, da sie nur in seiner Anwesenheit ausreichend aktiviert werden können und funktionstüchtig sind (Cramer, Yamanishi et al. 2003). In Mäusen mit einer Deletion von HIF-1 α in Makrophagen zeigte sich eine weniger stark ausfallende LPS-induzierte Sepsis mit einer verringerten Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Peyssonnaux, Cejudo-Martin et al. 2007). Auch dendritische Zellen sind für Ihre Reifung auf HIF-1 α angewiesen (Spirig, Djafarzadeh et al. 2010). Somit scheint ein verminderter Sauerstofflevel, der häufig in infiziertem Gewebe vorherrscht, mit HIF-1 für eine adäquate Immunantwort der Entzündungszellen des angeborenen Immunsystems notwendig zu sein.

In mukosalen Epithelzellen konnte jedoch ein protektiver Effekt von HIF-1 α bei einer Colitis in einem Mausmodell festgestellt werden. Bei HIF-1 α gewebsspezifisch deletierten Mäusen, das intestinale Epithel betreffend, kam es zu mehr Krankheitssymptomen wie Gewichtsverlust und zu einer höheren Mortalität. In den mukosalen Epithelzellen soll HIF-1 α die Expression von Genen vermitteln, die für eine intakte epitheliale Barriere benötigt werden, um diese während einer Kolitis zu schützen (Karhausen, Furuta et al. 2004). Auch in Atemwegsepithelzellen erfüllt

HIF-1 α eine protektive Aufgabe, indem es den Verlust der Integrität der epithelialen Barriere durch Sauerstoffradikale verhindert (Olson, Hristova et al. 2011). Im Alveolarepithel unterdrückt er bei einer akuten Lungenschädigung im Mausmodell über eine Anpassung im Kohlenhydratstoffwechsel die Entzündung und schützt somit das Lungengewebe (Eckle, Brodsky et al. 2013). Diese Veröffentlichungen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass eine Entzündungsantwort von Atemwegsepithelzellen unter Hypoxie gehemmt wird. Eine Anpassung des Kohlenhydratstoffwechsels in der Atemwegsepithelzelle über HIF-1 könnte auch für die in dieser Arbeit beschriebene hemmende Wirkung auf die Entzündungsantwort verantwortlich sein.

Zur Unterstützung der Ergebnisse, die bei den Versuchen mit der spezifisch gegen HIF-1 α eingesetzten siRNA erhoben werden konnten, wurde in dieser Arbeit auch CoCl₂ verwendet. In der Literatur ist CoCl₂ als Hypoxie-imitierender Faktor bekannt (Chachami, Simos et al. 2004, Ciafre, Niola et al. 2007), indem er über die Stabilisierung von HIF-1 α zur Aktivierung von HIF-1 führt (Wang, Semenza 1993, Hirsila, Koivunen et al. 2005). In verschiedenen Zelltypen wie z.B. Alveolarmakrophagen und Phäochromozytomzellen wurde jedoch eine zytotoxische Wirkung durch CoCl₂ nachgewiesen (Araya, Maruyama et al. 2002, Zou, Zeng et al. 2002). Dieser Effekt wirkt sich womöglich auch auf das Entzündungsverhalten der Atemwegsepithelzellen aus. Insofern sind die Ergebnisse aus den hier gezeigten Versuchen mit CoCl₂, die den Effekt von HIF auf die Entzündungsantwort unterstützen, durchaus kritisch zu werten. Allerdings zeigten die Zellen, die nicht mit mikrobiellen Faktoren oder *P. aeruginosa* stimuliert wurden, bei der Applikation von CoCl₂ keinen signifikanten Unterschied in der basalen Abgabe von Entzündungsmediatoren im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollzellen. Eine deutliche Wirkung auf die Inflammation durch CoCl₂ allein lässt sich also nicht feststellen.

Vor allem die mit dem Knockdown von HIF-1 α gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass HIF-1 α die Aktivierung von angeborenen Immunmechanismen in Atemwegsepithelzellen hemmt und die verminderte Inflammation unter Hypoxie nach mikrobieller Stimulation vermittelt

5.4. Schlussbemerkung

Die Zellkulturversuche sowie der Tierversuch zeigen, dass die Entzündungsantwort in Atemwegsepithelzellen bzw. Lungen der Mäuse unter hypoxischen Bedingungen geringer ausfällt als unter normoxischen. Ebenso zeigt sich, dass *P. aeruginosa* unter Hypoxie besser auf Epithelzellen persistieren kann. HIF scheint für diese Effekte verantwortlich zu sein. Seine Stabilisierung drosselt die Entzündungsantwort in Atemwegsepithelzellen, auch hypoxieunabhängig. Die verminderte Expression von HIF-1 α und hieraus resultierende verminderte Aktivierung von HIF-1 führt zu einer deutlich erhöhten Inflammation (Abb. 24).

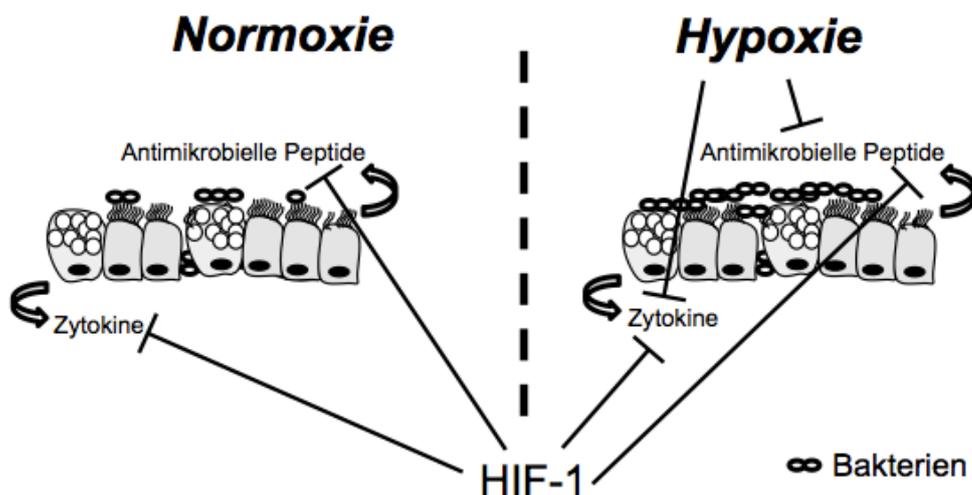


Abb. 24: Zusammenfassung. Bei einer Infektion bilden Atemwegsepithelzellen unter Hypoxie weniger Zytokine und AMPs als unter Normoxie. HIF-1 supprimiert die Entzündungsantwort. Bakterien persistieren auf dem Atemwegsepithel unter Hypoxie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten durch zusätzliche Untersuchungen bestätigt und ergänzt werden. So wären *in vitro* Versuche mit Epithelzellen aus Mäusen, die defizient für HIF-1 α sind, aufschlussreich und könnten die siRNA Zellversuche dieser Arbeit bestätigen. Zusätzlich könnten Versuche mit variablen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt werden, um einen Zusammenhang zwischen Sauerstoffkonzentration und Ausmaß der verminderten Entzündungsantwort festzustellen. Ebenso wären Untersuchungen an Patienten durchzuführen, um zu überprüfen, inwieweit eine Hypoxie in der Lunge die Rate von Exazerbationen beeinflusst.

Eine großes Problem in der Grundlagenforschung sind die variierenden Ergebnisse. Kleine Veränderungen in der Versuchsanordnung können bereits entscheidende Unterschiede für die Resultate bedeuten. Somit ist die Anwendbarkeit der Ergebnisse von zellbiologischer Untersuchungen auf die Klinik in der Regel zunächst nicht ohne Weiteres möglich. Zellbiologische Vorgänge in vivo sind in der Regel komplexer als in vitro. Wenn sich die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch in klinischen Untersuchungen bestätigen lassen, könnten Patienten, die aus unterschiedlichen Gründen hypoxisch sind, durch eine adäquate Sauerstoffkonzentration unter Berücksichtigung der Sauerstofftoxizität in der Lunge vor Exazerbationen geschützt werden. Hierdurch ließe sich vielleicht die Lebensqualität dieser Patienten positiv beeinflussen und deren Mortalität senken. Hinweise hierauf geben bereits Beobachtungen von Patienten mit COPD, bei denen eine Langzeitsauerstofftherapie zu einer verminderten Anzahl von Exazerbationen führt (Rizzi, Grassi et al. 2009). Das Gleiche zeigt sich auch mit einer nicht-invasiven Beatmung mit Supplementärsauerstoffgabe bei Patienten mit CF (Goss, Burns 2007). Ein nicht unerheblicher Teil der Literatur sieht den Grund hierfür in einer gesteigerten Entzündungsantwort unter Hypoxie, die zu einem Gewebeschaden führt (Schaible, Schaffer et al. 2010). Die eigentliche Ursache der vermehrten Entzündung könnte jedoch in einem primären Unvermögen einer rechtzeitigen und ausreichenden Immunantwort unter Hypoxie bestehen, was die vorgelegte Arbeit nahe legt.

Auch wenn akute und chronische Lungenerkrankungen nicht nur durch Hypoxie beeinflusst werden, so hat diese sicherlich einen entscheidenden Effekt auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf. Diese Arbeit konnte zeigen, wie eine Hypoxie die Immunantwort der Atemwegsepithelzellen schwächt und eine effiziente Pathogenelimination verhindert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass HIF-1 Entzündungsmechanismen von Atemwegsepithelzellen reguliert. Bei der Verwendung von siRNA gegen HIF-1 α kommt es nämlich zu einer signifikant erhöhten Immunantwort, sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie, was auf einen die Immunantwort hemmenden Effekt von HIF-1 schließen lässt.

Es ist zu hoffen, dass sich an diese Arbeit anschließende Untersuchungen diese Ergebnisse vertiefen und sich in Zukunft Therapieoptionen daraus entwickeln lassen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aaron, S. D., K. Ramotar, W. Ferris, K. Vandemheen, R. Saginur, E. Tullis, D. Haase, D. Kottachchi, M. St Denis, F. Chan (2004). "Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*." *Am J Respir Crit Care Med* 169: 811-815.
2. Almirall, J., C. A. Gonzalez, X. Balanzo, I. Bolibar (1999). "Proportion of community-acquired pneumonia cases attributable to tobacco smoking." *Chest* 116: 375-379.
3. Araya, J., M. Maruyama, A. Inoue, T. Fujita, J. Kawahara, K. Sassa, R. Hayashi, Y. Kawagishi, N. Yamashita, E. Sugiyama, M. Kobayashi (2002). "Inhibition of proteasome activity is involved in cobalt-induced apoptosis of human alveolar macrophages." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L849-858.
4. Bals, R., C. Beisswenger, S. Blouquit, T. Chinet (2004). "Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells." *J Cyst Fibros* 3 Suppl 2: 49-51.
5. Barbera, J. A., J. Roca, A. Ferrer, M. A. Felez, O. Diaz, N. Roger, R. Rodriguez-Roisin (1997). "Mechanisms of worsening gas exchange during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* 10: 1285-1291.
6. Bauer, T. T., T. Welte, C. Ernen, B. M. Schlosser, I. Thate-Waschke, J. de Zeeuw, G. Schultze-Werninghaus (2005). "Cost analyses of community-acquired pneumonia from the hospital perspective." *Chest* 128: 2238-2246.
7. Beisswenger, C., E. S. Lysenko, J. N. Weiser (2009). "Early bacterial colonization induces toll-like receptor-dependent transforming growth factor beta signaling in the epithelium." *Infect Immun* 77: 2212-2220.
8. Blouin, C. C., E. L. Page, G. M. Soucy, D. E. Richard (2004). "Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha." *Blood* 103: 1124-1130.
9. Boucher, R. C. (2007). "Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy." *Annu Rev Med* 58: 157-170.
10. Chachami, G., G. Simos, A. Hatziefthimiou, S. Bonanou, P. A. Molyvdas, E. Paraskeva (2004). "Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression

- in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism." *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 544-551.
11. Chao, J., J. G. Wood, N. C. Gonzalez (2009). "Alveolar hypoxia, alveolar macrophages, and systemic inflammation." *Respir Res* 10: 54.
 12. Ciafre, S. A., F. Niola, E. Giorda, M. G. Farace, D. Caporossi (2007). "CoCl₂-simulated hypoxia in skeletal muscle cell lines: Role of free radicals in gene up-regulation and induction of apoptosis." *Free Radic Res* 41: 391-401.
 13. Clarke, T. B., N. Francella, A. Huegel, J. N. Weiser (2011). "Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium." *Cell Host Microbe* 9: 404-414.
 14. Costa, L. D., P. S. Costa, P. A. Camargos (2014). "Exacerbation of asthma and airway infection: is the virus the villain?" *J Pediatr (Rio J)*.
 15. Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H. P. Gerber, N. Ferrara, R. S. Johnson (2003). "HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation." *Cell* 112: 645-657.
 16. Dai, Z. J., J. Gao, X. B. Ma, K. Yan, X. X. Liu, H. F. Kang, Z. Z. Ji, H. T. Guan, X. J. Wang (2012). "Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells." *J Exp Clin Cancer Res* 31: 28.
 17. Dalal, A. A., L. Christensen, F. Liu, A. A. Riedel (2010). "Direct costs of chronic obstructive pulmonary disease among managed care patients." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 5: 341-349.
 18. Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." *Chest* 118: 503-508.
 19. Dremsizov, T., G. Clermont, J. A. Kellum, K. G. Kalassian, M. J. Fine, D. C. Angus (2006). "Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course?" *Chest* 129: 968-978.
 20. Eckle, T., K. Brodsky, M. Bonney, T. Packard, J. Han, C. H. Borchers, T. J. Mariansi, D. J. Kominsky, M. Mittelbronn, H. K. Eltzschig (2013). "HIF1A reduces acute lung injury by optimizing carbohydrate metabolism in the alveolar epithelium." *PLoS Biol* 11: e1001665.
 21. Eltzschig, H. K., P. Carmeliet (2011). "Hypoxia and inflammation." *N Engl J Med* 364: 656-665.

22. Epstein, A. C., J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield, P. J. Ratcliffe (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." *Cell* 107: 43-54.
23. Erb-Downward, J. R., D. L. Thompson, M. K. Han, C. M. Freeman, L. McCloskey, L. A. Schmidt, V. B. Young, G. B. Toews, J. L. Curtis, B. Sundaram, F. J. Martinez, G. B. Huffnagle (2011). "Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD." *PLoS One* 6: e16384.
24. Famulla, S. C., A.; Horigths, A.; Sell, H.; Eckel, J. (2010). "Hypoxie im Fettgewebe vermindert die TNF α -induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und führt zu einer geringeren basalen und TNF α -induzierten Sekretion der Chemokine MCP-1 und IL-8." *Diabetologie und Stoffwechsel*: 5 - P280.
25. Ferkol, T., D. Schraufnagel (2014). "The global burden of respiratory disease." *Ann Am Thorac Soc* 11: 404-406.
26. Fessart, D., H. Begueret, F. Delom (2013). "Three-dimensional culture model to distinguish normal from malignant human bronchial epithelial cells." *Eur Respir J* 42: 1345-1356.
27. Froy, O. (2005). "Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways." *Cell Microbiol* 7: 1387-1397.
28. Goss, C. H., J. L. Burns (2007). "Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis." *Thorax* 62: 360-367.
29. Haeberle, H. A., C. Durrstein, P. Rosenberger, Y. M. Hosakote, J. Kuhlicke, V. A. Kempf, R. P. Garofalo, H. K. Eltzschig (2008). "Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection." *PLoS One* 3: e3352.
30. Han, M. K., Y. Zhou, S. Murray, N. Tayob, I. Noth, V. N. Lama, B. B. Moore, E. S. White, K. R. Flaherty, G. B. Huffnagle, F. J. Martinez, C. Investigators (2014). "Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study." *Lancet Respir Med* 2: 548-556.

31. Harris, J. K., M. A. De Groote, S. D. Sagel, E. T. Zemanick, R. Kapsner, C. Penvari, H. Kaess, R. R. Deterding, F. J. Accurso, N. R. Pace (2007). "Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20529-20533.
32. Hartmann, H., H. K. Eltzschig, H. Wurz, K. Hantke, A. Rakin, A. S. Yazdi, G. Matteoli, E. Bohn, I. B. Autenrieth, J. Karhausen, D. Neumann, S. P. Colgan, V. A. Kempf (2008). "Hypoxia-independent activation of HIF-1 by enterobacteriaceae and their siderophores." *Gastroenterology* 134: 756-767.
33. Hassett, D. J. (1996). "Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen." *J Bacteriol* 178: 7322-7325.
34. Herr, C., C. Beisswenger, C. Hess, K. Kandler, N. Suttorp, T. Welte, J. M. Schroeder, C. Vogelmeier, R. B. f. t. C. S. Group (2009). "Suppression of pulmonary innate host defence in smokers." *Thorax* 64: 144-149.
35. Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Opitz, H. Schutte, S. Rosseau, N. Suttorp (2007). "[New aspects of the pathophysiology of pneumonia]." *Internist (Berl)* 48: 459-460, 462-454, 466-457.
36. Hirsila, M., P. Koivunen, L. Xu, T. Seeley, K. I. Kivirikko, J. Myllyharju (2005). "Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway." *FASEB J* 19: 1308-1310.
37. Holländer, G. A. Ed. (2006). *Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis*. Urban & Fischer Verlag, München
38. Huang, F., C. Y. Kao, S. Wachi, P. Thai, J. Ryu, R. Wu (2007). "Requirement for both JAK-mediated PI3K signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-dependent NF-kappaB activation by IL-17A in enhancing cytokine expression in human airway epithelial cells." *J Immunol* 179: 6504-6513.
39. Ishida, I., H. Kubo, S. Suzuki, T. Suzuki, S. Akashi, K. Inoue, S. Maeda, H. Kikuchi, H. Sasaki, T. Kondo (2002). "Hypoxia diminishes toll-like receptor 4 expression through reactive oxygen species generated by mitochondria in endothelial cells." *J Immunol* 169: 2069-2075.
40. Jensen, P. O., T. Bjarnsholt, R. Phipps, T. B. Rasmussen, H. Calum, L. Christoffersen, C. Moser, P. Williams, T. Pressler, M. Givskov, N. Hoiby (2007). "Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* 153: 1329-1338.

41. Kao, C. Y., Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, F. Huang, C. Kim, R. W. Harper, 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* 173: 3482-3491.
42. Karhausen, J., G. T. Furuta, J. E. Tomaszewski, R. S. Johnson, S. P. Colgan, V. H. Haase (2004). "Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis." *J Clin Invest* 114: 1098-1106.
43. Kelly, C. J., L. E. Glover, E. L. Campbell, D. J. Kominsky, S. F. Ehrentraut, B. E. Bowers, A. J. Bayless, B. J. Saeedi, S. P. Colgan (2013). "Fundamental role for HIF-1alpha in constitutive expression of human beta defensin-1." *Mucosal Immunol* 6: 1110-1118.
44. Kim, S. Y., Y. J. Choi, S. M. Joung, B. H. Lee, Y. S. Jung, J. Y. Lee (2010). "Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor." *Immunology* 129: 516-524.
45. Kooguchi, K., S. Hashimoto, A. Kobayashi, Y. Kitamura, I. Kudoh, J. Wiener-Kronish, T. Sawa (1998). "Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." *Infect Immun* 66: 3164-3169.
46. Koury, J., E. A. Deitch, H. Homma, B. Abungu, P. Gangurde, M. R. Condon, Q. Lu, D. Z. Xu, R. Feinman (2004). "Persistent HIF-1alpha activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide." *Shock* 22: 270-277.
47. Kreda, S. M., C. W. Davis, M. C. Rose (2012). "CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(9): a009589.
48. Kumar, H., T. Kawai, S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* 30: 16-34.
49. Lai, Y., R. L. Gallo (2009). "AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense." *Trends Immunol* 30: 131-141.
50. Legendre, C., M. J. Mooij, C. Adams, F. O'Gara (2011). "Impaired expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cystic fibrosis airway epithelial cells - a role for HIF-1 in the pathophysiology of CF?" *J Cyst Fibros* 10: 286-290.
51. Lepanto, P., F. Lecumberry, J. Rossello, A. Kierbel (2013). "A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of

- Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells." *Mol Cell Probes*.
52. Lepanto, P., F. Lecumberry, J. Rossello, A. Kierbel (2014). "A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells." *Mol Cell Probes* 28: 1-5.
 53. Loboda, A., A. Stachurska, U. Florczyk, D. Rudnicka, A. Jazwa, J. Wegrzyn, M. Kozakowska, K. Stalinska, L. Poellinger, A. L. Levonen, S. Yla-Herttuala, A. Jozkowicz, J. Dulak (2009). "HIF-1 induction attenuates Nrf2-dependent IL-8 expression in human endothelial cells." *Antioxid Redox Signal* 11: 1501-1517.
 54. Madjdpour, C., U. R. Jewell, S. Kneller, U. Ziegler, R. Schwendener, C. Booy, L. Klausli, T. Pasch, R. C. Schimmer, B. Beck-Schimmer (2003). "Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L360-367.
 55. Martin, T. R., C. W. Frevert (2005). "Innate immunity in the lungs." *Proc Am Thorac Soc* 2: 403-411.
 56. Maus, U. A., S. Janzen, G. Wall, M. Srivastava, T. S. Blackwell, J. W. Christman, W. Seeger, T. Welte, J. Lohmeyer (2006). "Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation." *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 227-235.
 57. Miravittles, M., A. Anzueto, D. Legnani, L. Forstmeier, M. Fargel (2007). "Patient's perception of exacerbations of COPD--the PERCEIVE study." *Respir Med* 101: 453-460.
 58. Morgenroth K., W. Opferkuch, Eds. (1990). *Abwehrsysteme der Lunge und Lungenentzündung*, de Gruyter, Berlin - New York.
 59. Murray, J. F., Ed. (1978). *Die normale Lunge*, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York.
 60. Ng, H. P., Y. Zhou, K. Song, C. A. Hodges, M. L. Drumm, G. Wang (2014). "Neutrophil-mediated phagocytic host defense defect in myeloid Cfr-inactivated mice." *PLoS One* 9: e106813.
 61. Olson, N., M. Hristova, N. H. Heintz, K. M. Lounsbury, A. van der Vliet (2011). "Activation of hypoxia-inducible factor-1 protects airway epithelium against

- oxidant-induced barrier dysfunction." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L993-L1002.
62. Paone, A., R. Galli, C. Gabellini, D. Lukashev, D. Starace, A. Gorch, P. De Cesaris, E. Ziparo, D. Del Bufalo, M. V. Sitkovsky, A. Filippini, A. Riccioli (2010). "Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Neoplasia* 12: 539-549.
 63. Papandreou, I., R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim, N. C. Denko (2006). "HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption." *Cell Metab* 3: 187-197.
 64. Papi, A., F. Luppi, F. Franco, L. M. Fabbri (2006). "Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." *Proc Am Thorac Soc* 3: 245-251.
 65. Parker, D., A. Prince (2011). "Innate immunity in the respiratory epithelium." *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 189-201.
 66. Peyssonnaud, C., A. T. Boutin, A. S. Zinkernagel, V. Datta, V. Nizet, R. S. Johnson (2008). "Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection." *J Invest Dermatol* 128: 1964-1968.
 67. Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A. S. Zinkernagel, R. S. Johnson, V. Nizet (2007). "Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis." *J Immunol* 178: 7516-7519.
 68. Peyssonnaud, C., V. Datta, T. Cramer, A. Doedens, E. A. Theodorakis, R. L. Gallo, N. Hurtado-Ziola, V. Nizet, R. S. Johnson (2005). "HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes." *J Clin Invest* 115: 1806-1815.
 69. Powis, G., L. Kirkpatrick (2004). "Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target." *Mol Cancer Ther* 3: 647-654.
 70. Proud, D., S. P. Sanders, S. Wiehler (2004). "Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo." *J Immunol* 172: 4637-4645.
 71. Rizzi, M., M. Grassi, M. Pecis, A. Andreoli, A. E. Taurino, M. Sergi, F. Fanfulla (2009). "A specific home care program improves the survival of patients with

- chronic obstructive pulmonary disease receiving long term oxygen therapy." *Arch Phys Med Rehabil* 90: 395-401.
72. Roca, M., A. Verduri, L. Corbetta, E. Clini, L. M. Fabbri, B. Beghe (2013). "Mechanisms of acute exacerbation of respiratory symptoms in chronic obstructive pulmonary disease." *Eur J Clin Invest* 43: 510-521.
 73. Rosenfeld, M., J. Emerson, J. Williams-Warren, M. Pepe, A. Smith, A. B. Montgomery, B. Ramsey (2001). "Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis." *J Pediatr* 139: 359-365.
 74. Rubins, J. B. (2003). "Alveolar macrophages: wielding the double-edged sword of inflammation." *Am J Respir Crit Care Med* 167: 103-104.
 75. Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman, A. S. Prince (2005). "Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1209-1223.
 76. Schaible, B., S. McClean, A. Selfridge, A. Broquet, K. Asehounne, C. T. Taylor, K. Schaffer (2013). "Hypoxia modulates infection of epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS One* 8: e56491.
 77. Schaible, B., K. Schaffer, C. T. Taylor (2010). "Hypoxia, innate immunity and infection in the lung." *Respir Physiol Neurobiol* 174: 235-243.
 78. Schofield, C. J., P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 343-354.
 79. Seiler, F., P. M. Lepper, R. Bals, C. Beisswenger (2014). "Regulation and function of antimicrobial peptides in immunity and diseases of the lung." *Protein Pept Lett* 21: 341-351.
 80. Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." *J Appl Physiol* (1985) 88: 1474-1480.
 81. Semenza, G. L. (2001). "HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus." *Cell* 107: 1-3.
 82. Semenza, G. L. (2010). "Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics." *Oncogene* 29: 625-634.
 83. Semenza, G. L. (2011). "Oxygen sensing, homeostasis, and disease." *N Engl J Med* 365: 537-547.
 84. Sethi, S. (2010). "Infection as a comorbidity of COPD." *Eur Respir J* 35: 1209-1215.

85. Sibille, Y., H. Y. Reynolds (1990). "Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury." *Am Rev Respir Dis* 141: 471-501.
86. Siegel, S. J., J. N. Weiser (2015). "Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract." *Annu Rev Microbiol* 69: 425-444.
87. Signorelli, S., P. Jennings, M. O. Leonard, W. Pfaller (2010). "Differential effects of hypoxic stress in alveolar epithelial cells and microvascular endothelial cells." *Cell Physiol Biochem* 25: 135-144.
88. Singh, A. M., W. W. Busse (2006). "Asthma exacerbations. 2: aetiology." *Thorax* 61: 809-816.
89. Singh, P. K., H. P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B. A. Conway, E. P. Greenberg, E. V. Valore, M. J. Welsh, T. Ganz, B. F. Tack, P. B. McCray, Jr. (1998). "Production of beta-defensins by human airway epithelia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14961-14966.
90. Skerrett, S. J., H. D. Liggitt, A. M. Hajjar, R. K. Ernst, S. I. Miller, C. B. Wilson (2004). "Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L143-152.
91. Spilker, T., T. Coenye, P. Vandamme, J. J. LiPuma (2004). "PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* 42: 2074-2079.
92. Spirig, R., S. Djafarzadeh, T. Rigueira, S. G. Shaw, C. von Garnier, J. Takala, S. M. Jakob, R. Rieben, P. M. Lepper (2010). "Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha and dendritic cell maturation under normoxic conditions." *PLoS One* 5: e0010983.
93. Stoltz, D. A., D. K. Meyerholz, A. A. Pezzulo, S. Ramachandran, M. P. Rogan, G. J. Davis, R. A. Hanfland, C. Wohlford-Lenane, C. L. Dohrn, J. A. Bartlett, G. A. t. Nelson, E. H. Chang, P. J. Taft, P. S. Ludwig, M. Estin, E. E. Hornick, J. L. Launspach, M. Samuel, T. Rokhlina, P. H. Karp, L. S. Ostedgaard, A. Uc, T. D. Starner, A. R. Horswill, K. A. Brogden, R. S. Prather, S. S. Richter, J. Shilyansky, P. B. McCray, Jr., J. Zabner, M. J. Welsh (2010). "Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth." *Sci Transl Med* 2: 29ra31.
94. Strieter, R. M., S. L. Kunkel (1994). "Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils." *J Investig Med* 42: 640-651.

95. Suissa, S., S. Dell'Aniello, P. Ernst (2012). "Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality." *Thorax* 67: 957-963.
96. Tsutsumi-Ishii, Y., I. Nagaoka (2003). "Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production." *J Immunol* 170: 4226-4236.
97. Urquhart, D. S., H. Montgomery, A. Jaffe (2005). "Assessment of hypoxia in children with cystic fibrosis." *Arch Dis Child* 90: 1138-1143.
98. Walmsley, S. R., A. S. Cowburn, M. R. Clatworthy, N. W. Morrell, E. C. Roper, V. Singleton, P. Maxwell, M. K. Whyte, E. R. Chilvers (2006). "Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis." *Blood* 108: 3176-3178.
99. Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue, G. L. Semenza (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514.
100. Wang, G. L., G. L. Semenza (1993). "Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction." *Blood* 82: 3610-3615.
101. Wedzicha, J. A., T. A. Seemungal (2007). "COPD exacerbations: defining their cause and prevention." *Lancet* 370: 786-796.
102. Weiser, J. N. (2010). "The pneumococcus: why a commensal misbehaves." *J Mol Med (Berl)* 88: 97-102.
103. Welsch, U., T. Deller, Eds. (2010). *Lehrbuch Histologie*. München, Urban & Fischer Verlag, München.
104. Welte, T., A. Torres, D. Nathwani (2012). "Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe." *Thorax* 67: 71-79.
105. Werth, N., C. Beerlage, C. Rosenberger, A. S. Yazdi, M. Edelmann, A. Amr, W. Bernhardt, C. von Eiff, K. Becker, A. Schafer, A. Peschel, V. A. Kempf (2010). "Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens." *PLoS One* 5: e11576.
106. Whitsett, J. A., T. Alenghat (2015). "Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity." *Nat Immunol* 16: 27-35.

107. Wiesener, M. S., J. S. Jurgensen, C. Rosenberger, C. K. Scholze, J. H. Horstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U. A. Frei, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, S. Bachmann, P. H. Maxwell, K. U. Eckardt (2003). "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs." *FASEB J* 17: 271-273.
108. Wilkinson, T. M., J. R. Hurst, W. R. Perera, M. Wilks, G. C. Donaldson, J. A. Wedzicha (2006). "Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD." *Chest* 129: 317-324.
109. Witznath, M., B. Gutbier, A. C. Hocke, B. Schmeck, S. Hippenstiel, K. Berger, T. J. Mitchell, J. R. de los Toyos, S. Rosseau, N. Suttorp, H. Schutte (2006). "Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia." *Crit Care Med* 34: 1947-1954.
110. Woodhead, M. (2002). "Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns." *Eur Respir J Suppl* 36: 20s-27s.
111. Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, G. Doring (2002). "Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients." *J Clin Invest* 109: 317-325.
112. Yasuo, M., S. Mizuno, D. Kraskauskas, H. J. Bogaard, R. Natarajan, C. D. Cool, M. Zamora, N. F. Voelkel (2011). "Hypoxia inducible factor-1alpha in human emphysema lung tissue." *Eur Respir J* 37: 775-783.
113. Zhang, Z., J. P. Louboutin, D. J. Weiner, J. B. Goldberg, J. M. Wilson (2005). "Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5." *Infect Immun* 73: 7151-7160.
114. Zinkernagel, A. S., R. S. Johnson, V. Nizet (2007). "Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection." *J Mol Med (Berl)* 85: 1339-1346.
115. Zou, W., J. Zeng, M. Zhuo, W. Xu, L. Sun, J. Wang, X. Liu (2002). "Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells." *J Neurosci Res* 67: 837-843.

7. Publikationen/Dank

7.1. Vorträge, Publikationen, Preise und Reisestipendien

Vorträge und Publikationen

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, R. Bals, C. Beisswenger (Mainz, 12. September 2015). „Hypoxia and HIF-1alpha regulate innate immune responses in respiratory epithelial cells.“

43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie.

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, R. Bals, C. Beisswenger (Rostock, 24. September 2013). „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha regulate innate immune responses of respiratory epithelial cells.“

65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie/ Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie.

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger (Marburg, 26. Oktober 2013). „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha regulate innate immune responses of respiratory epithelial cells.“

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin.

M. Polke (Bremen, 27. März 2014). „Hypoxie und der Hypoxie-regulierte Transkriptionsfaktor HIF-1alpha regulieren die angeborene Immunantwort in respiratorischen Epithelzellen.“

55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und 36. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie.

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger (Wiesbaden, 27. April 2014). „Hypoxie und der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1alpha regulieren die angeborene Immunantwort in Atemwegsepithelzellen. „

120. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin.

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger (München, 08. September 2014). „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 α suppress the host defense of the respiratory epithelium.“

International Congress 2014 of the European Respiratory Society.

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger (2014). „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 α regulate innate immune responses in respiratory epithelial cells.“

Pneumologie, Georg Thieme Verlag: 68 - A40

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger (2014). „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 α suppress the host defense of the respiratory epithelium.“ *Eur Respir J: 44: 58.*

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger (2014). „Hypoxie und HIF-1 α regulieren die angeborene Immunantwort in Atemwegsepithelzellen.“ *Jahresbroschüre der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin: 43*

M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger. „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 α suppress the host defense of the respiratory epithelium.“ *In preparation*

Preise und Reisestipendien

„**Best of DGP-Herbsttagung**“ auf der Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der *Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin* am 26. Oktober 2013 in Marburg für den folgenden Beitrag:
M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger. „Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha regulate innate immune responses of respiratory epithelial cells.“

Young Investigator Award 2014 (3. Platz) auf dem 120. Kongress der *Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* am 28. April 2014 in Wiesbaden für den folgenden Beitrag:
M. Polke, P. M. Lepper, A. Kamyschnikow, F. Langer, D. Monz, R. Bals, C. Beisswenger. „Hypoxie und der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1alpha regulieren die angeborene Immunantwort in Atemwegsepithelzellen.“

Reisestipendium der *Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin* als „invited speaker“ am Hauptkongress der Gesellschaft in Bremen, 2014.

Reisestipendium der *Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* anlässlich des 120. Internistenkongresses, Wiesbaden, 2014.

7.2. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine Ratschläge und die wissenschaftliche Förderung.

Herrn PD Dr. Christoph Beisswenger gilt mein herzlicher Dank für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die Anleitung bei den praktischen Tätigkeiten im Labor.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Philipp Lepper für seine Ratschläge und die anregenden Diskussionen, die zur Entwicklung der Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Frank Langer danke ich für die intraoperative Gewinnung der primären Atemwegsepithelzellen.

Herrn Dr. Dominik Monz danke ich für die Bereitstellung der Hypoxiekammer für Mäuse.

Herrn Andreas Kamyschnikow danke ich für die Unterstützung bei den siRNA-Experimenten.

Frau Anja Honecker, Herrn Andreas Kamyschnikow, Frau Christina Schmidt und Herrn Bodo Wonnenberg gilt mein Dank für die technische Unterstützung im Labor.

Schließlich danke ich meiner Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützte und ohne die der Einsatz für diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.