

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors
für die *Moraxella catarrhalis*-induzierte proinflammatorische
Immunantwort in pulmonalem Epithel**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Helge Haarmann
aus Höxter

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Slevogt
 2. Prof. Dr. med. C. Grohé
 3. Priv.-Doz. Dr. C. Schulz

Datum der Promotion: 04.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	7
1.1.1 Definition.....	7
1.1.2 Epidemiologie.....	7
1.1.3 Risikofaktoren.....	8
1.1.4 Pathogenese.....	8
1.1.4.1 Die Bedeutung von Bakterien für die Pathogenese der COPD.....	9
1.2 <i>Moraxella catarrhalis</i>	10
1.2.1 Geschichte und Taxonomie.....	10
1.2.2 Infektionen mit <i>M. catarrhalis</i>	11
1.2.3 Virulenzmechanismen.....	11
1.3 Die angeborene Immunabwehr der Lunge.....	12
1.3.1 Mustererkennungsrezeptoren.....	13
1.3.2 Signaltransduktion.....	13
1.3.3 Interleukin-8.....	14
1.4 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR).....	15
1.4.1 Geschichte und Klassifikation.....	15
1.4.2 Liganden	15
1.4.3 Signalübermittlung.....	16
1.4.3.1 Transaktivierung.....	16
1.4.4 EGFR in Lungenerkrankungen.....	17
1.5 Fragestellung.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 <i>Moraxella catarrhalis</i>	20
2.1.1.1 Bakterienkultur.....	20
2.1.2 Zelllinien.....	20
2.1.2.1 Beas-2B.....	20
2.1.2.2 A549.....	21
2.1.2.3 primäre Bronchialepithelzellen (PBEC).....	21
2.1.3 Zellkultur.....	21

2.1.4 PCR.....	23
2.1.4.1 PCR-Primer.....	24
2.1.5 Transfektion.....	25
2.1.6 IL-8-ELISA.....	25
2.1.7 Western Blot.....	26
2.1.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	29
2.1.9 Biolumineszenzassay.....	30
2.1.10 Inhibitoren.....	30
2.1.11 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.12 Geräte.....	31
2.1.13 Analysesoftware	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Auftauen von A549- und Beas-2B-Zellen.....	34
2.2.1.2 Kultivierung von A549- und Beas-2B-Zellen.....	34
2.2.1.3 Aussaat von A549-Zellen	34
2.2.1.4 Aussaat von Beas-2B-Zellen.....	35
2.2.1.5 Kryokonservierung von A549- und Beas-2B-Zellen.....	35
2.2.1.6 Kultivierung von primären Bronchialepithelzellen (PBEC).....	35
2.2.1.7 Aussaat von primären Bronchialepithelzellen (PBEC).....	36
2.2.1.8 Zellzahlbestimmung.....	36
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	36
2.2.2.1 Kultivierung von <i>Moraxella catarrhalis</i>	37
2.2.2.2 Anlegen eines Glycerolstocks	37
2.2.2.3 Infektion von Zellen mit <i>M. catarrhalis</i>	37
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.3.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	38
2.2.3.1.1 RNA-Isolierung.....	38
2.2.3.1.2 Reverse Transkriptase.....	38
2.2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	38
2.2.3.1.4 Elektrophorese.....	39
2.2.3.2 Transfektion von siRNA in A549-Zellen.....	39

2.2.3.3 IL-8 ELISA.....	39
2.2.3.4 Western Blot.....	39
2.2.3.4.1 Extraktion des Gesamtproteins.....	39
2.2.3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
2.2.3.4.3 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.3.4.4 Blotting.....	40
2.2.3.5 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	41
2.2.3.6 Nachweis der NF- κ B-Aktivität durch einen Biolumineszenz-Assay.....	42
2.2.4 Statistik.....	42
3 Ergebnisse.....	44
3.1 EGFR wird in pulmonalen Epithelien exprimiert.....	44
3.2 <i>Moraxella catarrhalis</i> induziert eine Verstärkung der EGFR-Expression.....	44
3.3 <i>Moraxella catarrhalis</i> aktiviert EGFR	45
3.4 Die Inhibition des EGFR senkt die <i>Moraxella catarrhalis</i> -induzierte Gen- expression und Sekretion von IL-8.....	46
3.5 Gen-Silencing des EGFR senkt die Sekretion von IL-8.....	47
3.6 Die <i>Moraxella catarrhalis</i> -induzierte Aktivierung von ERK1/2 ist EGFR- abhängig.....	48
3.7 Die Inhibition des EGFR bzw. ERK1/2 senkt die <i>Moraxella-catarrhalis</i> - induzierte Aktivierung von NF- κ B.....	50
3.8 Die Inhibition des EGFR vermindert die Bindung von NF- κ B an den IL-8- Promotor	51
3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	53
4 Diskussion.....	54
4.1 Die <i>Moraxella catarrhalis</i> -induzierte Verstärkung der EGFR-Expression.....	54
4.2 Die Aktivierung des EGFR.....	55
4.3 Die Aktivierung des EGFR/ERK-Signalweges.....	56
4.4 EGFR als Regulator der IL-8-Expression.....	57
4.5 EGFR reguliert die Aktivierung von NF- κ B über ERK.....	57
4.6 Mögliche Bedeutung einer <i>M. catarrhalis</i> -induzierten EGFR-Aktivierung für die Pathogenese und Progression der COPD.....	59

4.7 Mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer COPD-Therapien.....	60
4.7.1 Derzeitige Therapieleitlinien.....	60
4.7.2 Die Suche nach neuen Therapiestrategien.....	61
4.7.2.1 Schutzimpfung gegen <i>M. catarrhalis</i>	62
4.7.2.2 IL-8-Inhibitoren.....	62
4.7.2.3 IKK-Inhibitoren.....	62
4.7.2.4 Inhibitoren der EGFR-Rezeptortyrosinkinase.....	63
Zusammenfassung/Summary.....	64
Abkürzungsverzeichnis.....	66
Literaturverzeichnis.....	68
Erklärung	77
Lebenslauf.....	78
Danksagung.....	80

1 Einleitung

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.1.1 Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist von der *World Health Organization* (WHO) als eine Erkrankung definiert worden, die durch eine andauernde Einschränkung des Atemflusses der Lunge gekennzeichnet ist (WHO 11/2009). Der Verlust an Lungenfunktion ist nicht vollständig reversibel und verläuft progredient. Zu den charakteristischen klinischen Symptomen zählen Dyspnoe, chronischer Husten und vermehrte Sputumproduktion.

Die COPD ist assoziiert mit einer abnormen Entzündungsreaktion in der Lunge, die in erster Linie durch Zigarettenrauch verursacht wird. Die pathologischen Veränderungen sind gekennzeichnet durch eine Kombination von obstruktiver Bronchiolitis und Emphysembildung. Häufige infektbedingte Exazerbationen, d.h. akute Verschlechterungen der Erkrankung durch virale oder bakterielle Atemwegsinfekte tragen wesentlich zur Schwere der Erkrankung bei. Die COPD kann zudem als Systemerkrankung auch signifikanten extrapulmonale Auswirkungen haben wie z.B. Gewichtsverlust (Rabe et al. 2007, GOLD 2009).

1.1.2 Epidemiologie

Nach aktuellen Statistiken der *WHO* sind ca. 210 Millionen Menschen weltweit an COPD erkrankt (WHO 11/2009). Mit 3 Millionen Todesfällen pro Jahr ist COPD die viert häufigste Todesursache (WHO 10/2008). Weltweit nimmt die Bedeutung der COPD für das Gesundheitswesen zu. Nach Schätzungen der WHO wird die COPD im Jahre 2030 zur dritthäufigsten Todesursache angestiegen sein. 1990 belegte die Erkrankung hingegen noch Rang 6. Als Ursachen für diesen Anstieg werden die mit dem demographischen Wandel verbundene steigende Lebenserwartung, jedoch auch die weltweite Zunahme des Zigarettenrauchens angesehen (GOLD 2009).

1.1.3 Risikofaktoren

Der bisher größte identifizierte Risikofaktor ist das Rauchen von Zigaretten. Weitere Risikofaktoren wie z.B. ein genetisch bedingter α 1-Antitrypsinmangel oder eine berufliche Exposition zu inhalativen Noxen spielen eine untergeordnete Rolle (Rabe et al. 2007).

1.1.4 Pathogenese

COPD ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung der Atemwege mit vermehrter Produktion von zähflüssigen Bronchialsekreten. Zellen der angeborenen Immunabwehr wie Makrophagen, CD8-positive-T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten sind vermehrt nachweisbar. Im Entzündungsprozess werden lokal eine Reihe von Entzündungsmediatoren freigesetzt wie z.B. Leukotriene, Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α). Diese Substanzen können Lungenstrukturen irreversibel schädigen und tragen dazu bei, dass die Entzündung aufrechterhalten wird. Insbesondere IL-8 führt zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, welche durch Freisetzung von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS) Epithelzellen und Matrix schädigen (Mizgerd 2008). Durch ständige Schädigungs- und Reparaturprozesse entwickeln sich narbige Wandstrukturen in den Bronchiolen und Alveolen. Diese können sowohl zu einem verminderten Gasaustausch als auch zu obstruktiver Atemwegseinengung mit konsekutiver Emphysembildung führen. Eine übermäßige Mukusproduktion trägt ebenfalls zur Atemwegsobstruktion bei, vermindert jedoch auch eine erfolgreiche mukoziliäre Clearance, d.h. den Abtransport von Schadstoffen über den rachenwärts gerichteten Zilienschlag des respiratorischen Epithels. So können Schadstoffe und Erreger in der Lunge persistieren (Pauwels et al. 2001, Rabe et al. 2007).

Es wird angenommen, dass bei den meisten Patienten der Rauch von Zigaretten ursächlich für die Entstehung der chronischen Entzündung ist. Jedoch führt langjähriges Rauchen nicht zwangsläufig zur Entstehung von COPD. Nur ca. 15% der Raucher entwickeln eine chronische Bronchitis und eine noch geringere Anzahl das Krankheitsbild der COPD. So wird vermutet, dass eine genetische Disposition eine Voraussetzung zur Entstehung der Erkrankung sein könnte, durch die die Patienten auf inhalative Noxen mit einer übermäßigen chronischen Entzündungsreaktion reagieren (Pauwels et al. 2001, Rabe et al. 2007).

1.1.4.1 Die Bedeutung von Bakterien für die Pathogenese der COPD

In den letzten Jahren gewinnt eine weitere Hypothese an Aufmerksamkeit: Die Beteiligung bakterieller Erreger an der chronischen Entzündung in der Pathogenese und Progression der COPD.

Die unteren Atemwege haben vielfältige Mechanismen zur Abwehr von Erregern. In einer Studie konnten nur bei 4% der gesunden Probanden Bakterien in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden. Bei COPD-Patienten sind jedoch viele Abwehrmechanismen der Lunge krankheitsbedingt geschwächt. So wurden bei 29% der Patienten mit einer stabilen COPD und bei 54% der Patienten mit einer exazerbierten COPD Bakterien in den unteren Atemwegen nachgewiesen (Rosell et al. 2005). Die drei häufigsten Bakterienarten, die in einer stabilen COPD gefunden werden, sind *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* (Rosell et al. 2005). Diese sind auch die drei häufigsten Erreger von bakteriell bedingten Exazerbationen (Sethi & Murphy 2008).

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass die krankheitsbedingte Besiedlung der unteren Atemwege mit Bakterien nicht nur zu Exazerbationen, sondern auch zu chronisch entzündlichen Prozessen führen kann, welches wiederum zur Pathogenese und Progression der COPD beiträgt. Die Hypothese dieses *circulus vitiosus* wird in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

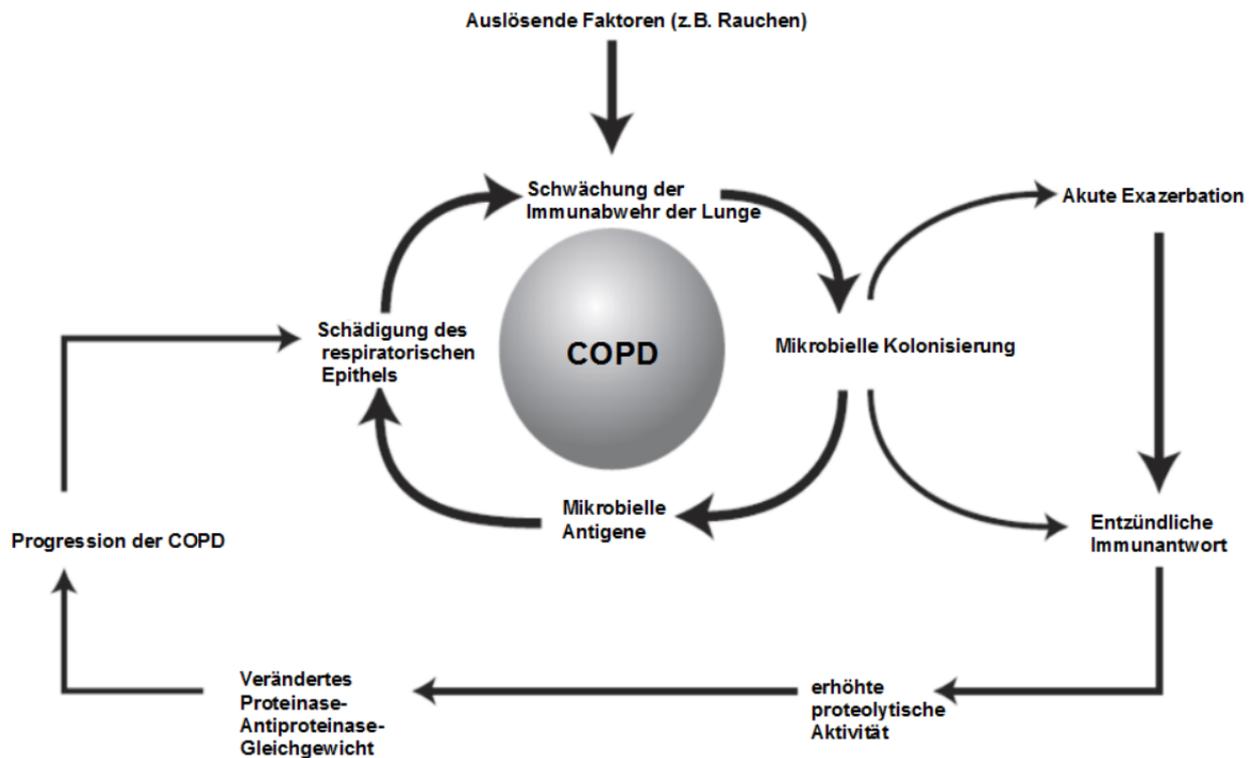


Abb. 1. Die Hypothese eines *circulus vitiosus* in der Pathogenese und Progression der COPD

Durch eine krankheitsbedingt geschwächte Immunabwehr der Lunge kommt es zu einer bakteriellen Besiedlung, welche zur Pathogenese und Progression der COPD beiträgt.

(Quelle: modifiziert nach Sethi & Murphy 2008)

1.2 *Moraxella catarrhalis*

Moraxella catarrhalis, ein gram-negativer aerober Diplokokkus, ist ein fakultativ pathogener Erreger des menschlichen Respirationstraktes. Das Bakterium ist in der Lage in Patienten mit COPD zu kolonisieren und Entzündungsreaktionen und Exazerbationen zu verursachen (Sethi & Murphy 2008).

1.2.1 Geschichte und Taxonomie

Moraxella catarrhalis wurde zuerst im 19. Jahrhundert beschrieben unter dem Namen *Micrococcus catarrhalis* (Frosch und Kolle 1896). 1902 wurde es als ein Krankheitserreger des menschlichen Respirationstraktes klassifiziert (Ghon und Pfeiffer 1902). Eine im Jahr 1921 folgende Studie von Gordon über gram-negative Kokken in Atemwegsinfekten beschrieb *M. catarrhalis* als gewöhnlichen Kolonisierer des Oropharynx gesunder

Erwachsener, wobei jedoch in dieser Studie nicht zwischen *M. catarrhalis* und *Neisseria cinerea*, einem harmlosen Kommensalen, differenziert worden war. *M. catarrhalis* wurde über weite Teile des 20. Jahrhunderts als apathogenes Bakterium angesehen und in klinischen Laboratorien wurde vernachlässigt, Proben von Patienten mit Atemwegsinfekten auf *M. catarrhalis* zu testen. Aufgrund morphologischer Eigenschaften der Kolonien und weiterer phänotypischer Merkmale erfolgte die Klassifizierung als *Neisseria catarrhalis*. In den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts zeigten DNA-Studien, dass auf genetischer Ebene nicht genügend Gemeinsamkeiten mit Neisserien bestanden, so dass das Bakterium mit dem neuen Namen *Branhamella catarrhalis* eine eigene Gattungsbezeichnung bekam. Aufgrund der Erkenntnisse weiterer molekularbiologischer Studien der letzten Jahrzehnte wurde das Bakterium der Gattung *Moraxella* zugeordnet und der heutige Name *Moraxella catarrhalis* gegeben. Mittlerweile konnte *Moraxella catarrhalis* als ein Krankheitserreger einer Reihe von Infektionskrankheiten identifiziert werden (Verduin et al. 2002, Karalus & Campagnari 2000). Ziel der gegenwärtigen Forschung ist es, Pathomechanismen dieses Erregers aufzudecken und geeignete Vakzine zu entwickeln (Karus & Campagnari 2000).

1.2.2 Infektionen mit *M. catarrhalis*

Bei Erwachsenen mit COPD ist *M. catarrhalis* verantwortlich für 10-15% der Exazerbationen (Murphy & Sethi 2008). Die Kolonisationsrate bei Patienten mit COPD beträgt bis zu 32% im Gegensatz zu 1-3% bei gesunden Erwachsenen (Murphy 07/2005, Verduin et al. 2002). Bei Kindern sind 15-20% der Mittelohrentzündungen durch *M. catarrhalis* verursacht. In Einzelfällen konnte *M. catarrhalis* als Erreger von septischer Arthritis, Bakteriämie, Osteomyelitis, Endocarditis und Perikarditis identifiziert werden. Einzelne nosokomiale Ausbrüche von Infektionen wurden berichtet (Karus & Campagnari 2000).

1.2.3 Virulenzmechanismen

M. catarrhalis ist in der Lage durch verschiedene Mechanismen der Immunabwehr des Wirtes zu widerstehen und sich somit ein Überleben im Wirt zu ermöglichen. Der Erreger entgeht dem Komplementsystem durch das Binden und Neutralisieren von Komplementfaktoren. Durch Neutralisieren von α 1-Antichymotrypsin wird die Proteaseaktivität

erhöht, welches zur Zerstörung von Gewebe führt, wodurch der Erreger besser an die Schleimhaut adhären kann. Zudem kann *M. catarrhalis* einen schützenden Biofilm auf den menschlichen Schleimhäuten ausbilden. Der Erreger kann in Epithelzellen invadieren und somit möglicherweise Abwehrmechanismen entgehen (Perez 2009).

Folgende mustererkennende Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr erkennen Bestandteile des Erregers: *toll-like*-Rezeptor 4 (TLR-4), NOD-1 und NOD-2, CEACAM1 (Sethi & Murphy 2008) und TLR-2 (Slevogt et al. 2007). Über die Bindung an CEACAM1 kann *M. catarrhalis* die TLR-2-abhängige inflammatorische Immunantwort abschwächen (Slevogt et al. 2008).

Es gibt Hinweise dafür, dass die Adhärenz von *Moraxella catarrhalis* an die Wirtszelle durch neutrophile Defensine begünstigt wird, welche von aktivierten neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet werden. So könnte die Gegenwart und Aktivierung neutrophiler Granulozyten zur Persistenz des Erregers beitragen (Verduin et al. 2002). Ein vermehrter Nachweis von neutrophilen Granulozyten ist charakteristisch für die COPD (Rabe et al. 2007).

1.3 Die angeborene Immunabwehr der Lunge

Die angeborene Immunabwehr besteht aus Abwehrmechanismen, die dem Körper von Geburt an zur Verfügung stehen, um Krankheitserreger und Schadstoffe zu eliminieren. Die Lunge ist durch die eingeatmete Luft der Umgebung tagtäglich einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt und besitzt vielfältige solcher Abwehrmechanismen. So werden durch die mukoziliäre Clearance im Mukus gebundene Pathogene durch den rachenwärts gerichteten Zilienschlag des respiratorischen Epithels aus der Lunge transportiert. Der Mukus selbst ist reich an antimikrobiell wirksamen Substanzen. Alveolarmakrophagen sind in der Lage Pathogene durch Phagozytose unschädlich zu machen. Die Epithelzellen der Atemwege bilden nicht nur eine physische Barriere, sondern sind im Zusammenspiel mit Alveolarmakrophagen in der Lage, über immunologische Botenstoffe der Zell-Zell-Interaktion Entzündungsreaktionen zu orchestrieren (Sethi & Murphy 2008).

1.3.1 Mustererkennungsrezeptoren

Über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *pattern recognition receptors*, PRR) werden mikrobielle Moleküle von Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen erkannt. Unter den Mustererkennungsrezeptoren spielen *toll-like* Rezeptoren (TLR) als extrazelluläre und NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-Proteine als intrazelluläre Rezeptoren eine wichtige Rolle (Sethi & Murphy 2008).

1.3.2 Signaltransduktion

Wurden pathogene Strukturen über intra- oder extrazelluläre Rezeptoren erkannt, erfolgt die Signaltransduktion, d.h. die Übermittlung dieser Information in den Zellkern. Dabei werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die im Zellkern gezielt die Transkription bestimmter Gene regulieren können. Die Signaltransduktion erfolgt über eine Reihe von intrazellulären Enzymen, die einander in einer bestimmten Reihenfolge kaskadenartig aktivieren. Ein essentieller Signaltransduktionsweg für vielfältige Zellprozesse ist der mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK)-Weg. MAPK regulieren u.a. Mitose, Stoffwechsel, Differenzierung (Roux & Blenis 2004) und Inflammation (Kaminska 2005). Zu der Gruppe der MAPK gehören die extrazellulär-Signal-regulierte Kinasen 1-5 (ERK1-5), die c-Jun-Amino-terminale Kinasen 1-3 (JNK1-3) und die p38-Isoformen α , β , γ , δ . MAPK werden durch die Gruppe der MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert. MAPKK werden durch die Gruppe der MAPKK-Kinasen (MAPKKK) aktiviert (Roux & Blenis 2004).



Abb. 2. Signaltransduktion über den MAPK-Weg

Ein Stimulus führt über den kaskadenartigen Verlauf der Signalweiterleitung über MAPK zu einer Zellantwort. (Quelle: modifiziert nach Roux & Blenis 2004)

Der MAPK-Weg kann durch eine Reihe von Stimuli aktiviert werden. ERK1/2 werden hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren aktiviert, JNK und p38-Isoformen hauptsächlich durch Stress-Stimuli wie osmotischer Schock, ionisierende Strahlung oder durch Zytokine (Roux & Blenis 2004). Liganden für TLR sind ebenfalls in der Lage JNK zu aktivieren (Takeuchi & Akira 2001).

Ein Transkriptionsfaktor, der entscheidend ist für inflammatorische Prozesse, u.a. für die Produktion von Interleukin-8 (Hoffmann et al. 2002), ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor κ B*). So ist die von *Moraxella catarrhalis* in Bronchialepithel verursachte Entzündungsreaktion abhängig von einer MAPK-Aktivierung aber auch von der Aktivierung von NF- κ B (Slevogt et al. 2006).

1.3.3 Interleukin-8

Zytokine sind Glykoproteine, die als Botenstoffe der Zell-Zell-Interaktion dienen. Unter den Zytokinen gibt es sogenannte Chemokine, d.h. chemotaktisch wirksame Zytokine. Interleukin-8 (IL-8) – nach neuer Nomenklatur auch CXCL8 genannt – ist ein Hauptvertreter der Chemokine (Remick 2005).

Chemotaxis beschreibt die Beeinflussung der Fortbewegungsrichtung von Zellen durch Stoffkonzentrationsgradienten. Neutrophile Granulozyten bewegen sich in den Bereich einer erhöhten Konzentration von IL-8. In Reaktion auf einen Kontakt mit mikrobiellen Erregern in den Atemwegen wird IL-8 von Makrophagen und Lungenepithelien sekretiert, um neutrophile Granulozyten zur Erregerelimination an den Ort der Entzündung zu rekrutieren. IL-8 wird frühzeitig im Entzündungsgeschehen produziert und kann für Tage und sogar Wochen am Entzündungsort bestehen bleiben (Remick 2005).

In Proben bronchioalveolärer Lavage (BAL) ist die Konzentration von IL-8 bei Patienten mit stabiler COPD gegenüber gesunden Patienten erhöht (Di Stefano et al. 2004). Exazerbationen der COPD sind mit einem erhöhten Nachweis von neutrophilen Granulozyten und IL-8 verbunden (Drost et al. 2005).

Mehrere Signaltransduktionswege – u.a. NF- κ B, ERK und JNK-Signalwege – regulieren die Genexpression und Proteinproduktion von IL-8 in Atemwegsepithelzellen (Strieter 2002). Diese Signalwege werden von verschiedenen Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr – wie z.B. TLR – aktiviert. Ein wichtiger Aktivator von ERK ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) (Oda et al. 2005). Eine Beteiligung von EGFR an der Modulation der Produktion von IL-8 in Atemwegsepithelzellen konnte in einigen Studien gezeigt werden (Nakanaga et al. 2007, Koff et al. 2008, Burgel & Nadel 2008).

1.4 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein transmembraner Glykoprotein-Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Nahezu alle Zelltypen exprimieren EGFR mit Ausnahme der hämatopoetischen Zellen. Der Rezeptor kann auf vielfältige Weise aktiviert werden und spielt eine wichtige Rolle in zellproliferativen, zellregenerativen und mit zunehmendem Nachweis auch in immunologischen Prozessen der angeborenen Immunabwehr (Edwin et al. 2006, Burgel & Nadel 2008, Koff et al. 2008).

1.4.1 Geschichte und Klassifikation

In den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelte sich die Hypothese der Existenz von wachstumsstimulierenden Faktoren. Cohen und Levi-Montalcini erhielten für ihre geleistete Pionierarbeit zur Wachstumsfaktor-Identifizierung 1986 den Nobel-Preis in Physiologie/Medizin. So waren es Studien von Cohen, in denen aus Speicheldrüsenextrakten von Mäusen eine Substanz identifiziert werden konnte, die epidermale und corneale Epithelzellen zur Proliferation stimulierte und von Cohen entsprechend *epidermal growth factor* (EGF), epidermaler Wachstumsfaktor, genannt wurde (Levi-Montalcini & Cohen 1960, Cohen 1965, Edwin et al. 2006).

Nach seiner Entdeckung wurde EGF ausführlich hinsichtlich seiner mitogenen Effekte erforscht. In den späten 1970ern konnte der Oberflächenrezeptor für EGF, genannt EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) identifiziert werden und später als ein transmembranes Glykoprotein mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität charakterisiert werden. Weitere erforschte strukturähnliche Proteine bilden die ErbB-Rezeptor-Familie, deren synonyme Namensbezeichnungen hier in Klammern aufgeführt sind: ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3), ErbB4 (HER4) (Edwin et al. 2006).

1.4.2 Liganden

Liganden des EGFR sind u.a. EGF, *transforming growth factor* (TGF)- α , Amphiregulin (AR), Heparin-bindendes EGF (HB-EGF) und Betacellulin (BTC). EGF und TGF- α werden als wichtigste Liganden des EGFR angesehen (Herbst 2004).

1.4.3 Signalübermittlung

Die Bindung von Liganden an den EGFR führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors (s. Abb. 3). Dadurch wird der Tyrosinkinaseteil des Rezeptors aktiviert, wodurch Tyrosinreste autophosphoryliert werden. Diese phosphorylierten Tyrosinreste sind Bindungsdomänen für intrazelluläre Signalmoleküle, durch die eine Signalweiterleitung stattfindet (Herbst 2004). Die Tyrosinreste des Rezeptors können auch durch andere Botenstoffe phosphoryliert werden, so dass der Rezeptor auch durch andere Signalwege aktiviert werden kann, welches Transaktivierung genannt wird (s. nächstes Kapitel). Die EGFR-Signalwege sind zudem mit anderen Signalwegen kreuzkommunizierend und enthalten einige Rückkopplungsschleifen. Dies führt zu einer enormen Komplexität der Signalübermittlung (Oda et al. 2005).

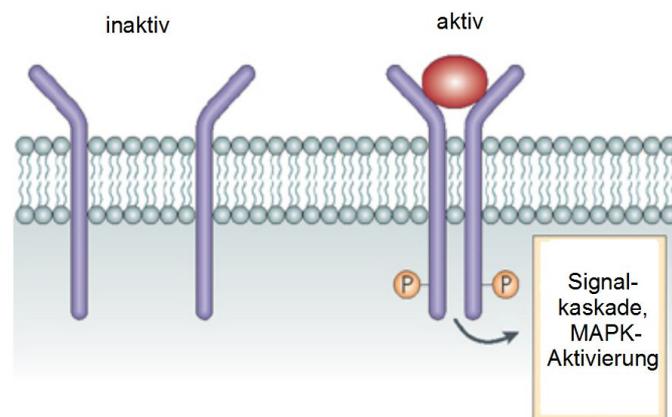


Abb. 3. Rezeptordimerisierung und Aktivierung des EGFR

Der in der Zellmembran gebundene Rezeptor liegt in inaktivem Zustand in monomerer Form vor und bildet bei Ligandenbindung aktivierte Dimere, welches zur Autophosphorylierung des intrinsischen Tyrosinkinaseteils führt, mit einer nachfolgenden Aktivierung von MAPK-abhängigen Signalwegen.

(Quelle: modifiziert nach Hughes & Sperandio 2008)

1.4.3.1 Transaktivierung

Neben der direkten Aktivierung des Rezeptors durch Liganden gibt es auch Wege einer indirekten Aktivierung. Agonisten für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), *toll-like* Rezeptoren (TLR), Oxidantien, Hyperosmolalität und Umwelteinflüsse wie Strahlung und Hitze können EGFR über kreuzkommunizierende Signalwege aktivieren. Eine Möglichkeit dieser sogenannten Transaktivierung des EGFR ist die Phosphorylierung des

Tyrosinkinaseteils durch intrazelluläre Botenstoffe anderer Signalwege. Eine andere Möglichkeit ist die durch andere Signalwege verursachte Freisetzung von EGFR-Liganden (s. Abb. 4) (Edwin et al. 2006, Burgel & Nadel 2008, Koff et al. 2008).

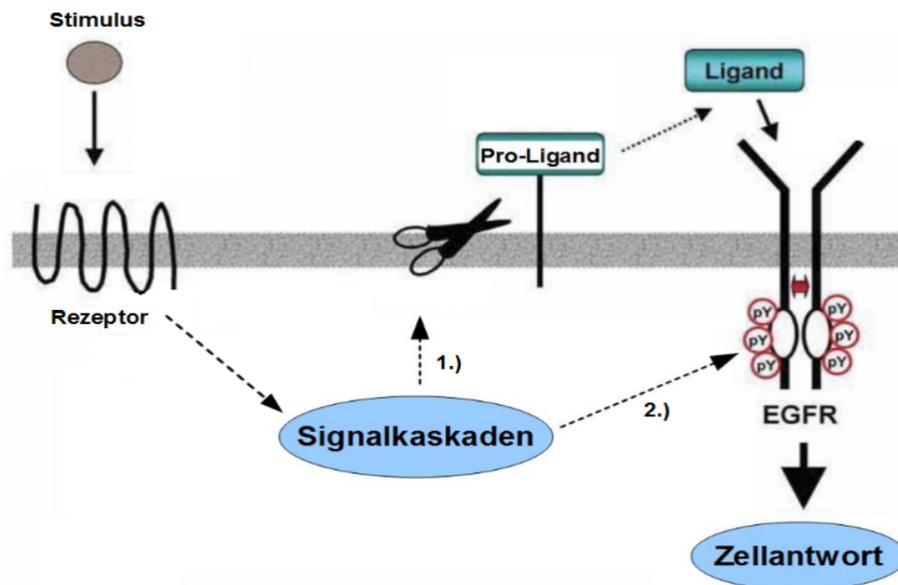


Abb. 4. Die Transaktivierung des EGFR durch andere Rezeptoren

Es sind zwei Mechanismen dargestellt: 1.) die extrazelluläre Aktivierung des Rezeptors durch die von aktivierten Proteasen freigesetzten Liganden und 2.) die intrazelluläre Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase durch Botenstoffe kreuz-kommunizierender Signalwege.

(Quelle: modifiziert nach Edwin et al. 2006 und Burgel & Nadel 2008)

1.4.4 EGFR in Lungenerkrankungen

Chronische Lungenerkrankungen wie COPD, zystische Fibrose und chronisches Asthma sind assoziiert mit muköser Hypersekretion und vermehrter Infiltration des Gewebes mit neutrophilen Granulozyten. In den Atemwegsepithelien gesunder Menschen ist die EGFR-Expression nur gering, bei Patienten mit COPD, zystischer Fibrose, Asthmatikern und Rauchern ist sie jedoch erhöht (de Boer 2006). In Atemwegsepithelien führt eine EGFR-Aktivierung neben Reparatur und Regeneration des Epithels zu einer Steigerung der Mukussynthese, einer Freisetzung von IL-8 und folglich zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Gewebe (Edwin et al. 2006, Burgel & Nadel 2008). Muköse Hypersekretion kann zur Schwere des Krankheitsverlaufs chronischer Lungenerkrankungen beitragen durch eine erhöhte Obstruktion der Atemwege mit folglich geringerer

Ventilation und geringerem Gasaustausch. Chronische Entzündungsprozesse mit Beteiligung neutrophiler Granulozyten stehen im Verdacht zur Pathogenese und Progression der COPD beizutragen. Gegenwärtige Therapien haben nur begrenzten Einfluss auf die Mukusproduktion und Rekrutierung Neutrophiler. EGFR scheint eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Mechanismen zu spielen. Therapien, die inhibierend auf die EGFR-Signalübermittlung wirken, könnten vorteilhaft sein für Patienten mit oben genannten Krankheitsbildern (Barnes 11/2008, Burgel und Nadel 2008).

In vitro-Studien zeigen, dass EGFR zudem bei Infektionen mit Rhinovirus RV16 bzw. respiratorischem Synzytialvirus (RSV) einen regulierenden Einfluss auf die Immunantwort von respiratorischen Epithelzellen haben kann (Liu et al. 04/2008, Monick et al. 2005).

1.5 Fragestellung

M. catarrhalis kolonisiert in bis zu 32% der Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und verursacht ca. 10-15% der Exazerbationen in diesem Krankheitsbild. Eine solche bakterielle Besiedlung in den unteren Atemwegen steht im Verdacht zur chronischen Entzündung in der COPD beizutragen, welche mit Atemwegsverengung, Emphysembildung und progredientem Verlust der Lungenfunktion einhergeht. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) hat regulierenden Einfluss auf Entzündungsreaktionen in pulmonalem Epithel. In dem Erkrankungsbild der COPD ist eine vermehrte Expression des EGFR nachgewiesen. Neuere Forschungsergebnisse zeigen eine Beteiligung des EGFR an der Regulation der Entzündungsreaktion bei viralen Atemwegsinfektionen. Bisher ist nicht bekannt, welche Rolle EGFR in der Infektion mit dem COPD-assoziierten bakteriellen Erreger *M. catarrhalis* spielt. Studienergebnisse auf molekularer Ebene könnten wichtige Mechanismen aufdecken, die beitragen zum Verständnis der Pathogenese und Progression der COPD und grundlegende Informationen für die Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten liefern.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass EGFR ein wichtiger Faktor zur Regulation der *M. catarrhalis*-induzierten Entzündungsreaktion in Lungenepithelzellen ist.

In dieser Arbeit sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Wird die *M. catarrhalis*-induzierte Entzündungsreaktion in Lungenepithelzellen durch die Expression und Aktivierung des EGFR reguliert?

2. Welche Signalwege können für eine *M. catarrhalis*-induzierte EGFR-abhängige Entzündungsreaktion identifiziert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Moraxella catarrhalis*

Der Wildtypstamm O35E (Serotyp A) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA.

2.1.1.1 Bakterienkultur

	Bestandteil	Menge	Hersteller
Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium	BHI-Pulver	37 g	BD Bioscience
	Aqua Bidest	1000 ml	
Kryo-Medium	Brain-Heart-Infusion- Medium	700 µl	
	Glycerol 99%ig	300µl	Sigma
Columbia-Agarplatte	Schafsblut	5,00%	BD Diagnostics

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 Beas-2B

Beas-2B ist eine humane Bronchialepithelzelllinie. Die Ursprungszellen stammen aus einer Biopsie einer gesunden Spenderlunge. Es erfolgte eine Immortalisierung mit dem Adenovirushybrid 12-SV40 (Ad12SV40) (Reddel et al. 1988). Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von C. Harris, NIH, Bethesda, MD zur Verfügung gestellt. Die Verwendung erfolgte in den Passagen 9 bis 30.

2.1.2.2 A549

A549 ist eine humane Alveolarzellkarzinom-Zelllinie. Sie besitzt Eigenschaften von Alveolarepithelzellen des Typs II (Lieber et al. 1976). Die Verwendung erfolgte in den Passagen 10-40. Zur Anwendung kamen auch mit einem pNF- κ B-Luziferase-Reporter gen stabil transfizierte A549-Zellen.

2.1.2.3 primäre Bronchialepithelzellen (PBEC)

Die PBEC wurden in der Klinik für Infektiologie m.S. Pneumologie, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, im Rahmen von bronchoskopischen Untersuchungen mittels einer Bronchialbürste gewonnen. Zuvor erfolgte die schriftliche Einwilligung der Patienten zur Materialgewinnung. Die Studie ist von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Die Verwendung der Zellen erfolgte in der Passage 1 bis 3.

2.1.3 Zellkultur

Verbrauchssubstanzen

	Hersteller
Dulbecco's PBS	PAA
Trypsin/EDTA 1x	Gibco

Primäre Bronchialepithzellen (PBEC)

	Bestandteil	Menge	Hersteller
Stimulationsmedium	Bronchialepithelzell-Basalmedium (BEGM)	500 ml	Clonetics, Cambrex
	Epidermal Growth Factor (EGF)	0,5 ng/ml	Clonetics, Cambrex
	Insulin	5 μ g/ml	Clonetics, Cambrex
	Transferrin	10 μ g/ml	Clonetics, Cambrex
	Epinephrin	0,5 μ g/ml	Clonetics, Cambrex
	Tri-Jodthyronin	6,5 ng/ml	Clonetics, Cambrex
	Bovine pituitary	52 μ g/ml	Clonetics, Cambrex

	extract		
	All trans Retinolsäure	0,1 ng/ml	Clonetics, Cambrex
Zellkulturmedium	Gentamycin	50 µg/ml	Clonetics, Cambrex
	Nystatin	20 µl	Sigma
	Amphotericin B	50 ng/ml	Clonetics, Cambrex
	Ciprofloxacin	10 µl	Sigma
	Stimulationsmedium	100 ml	
Adhäsionsflüssigkeit	Kollagen	400 µl	Vitrogen100
	Acet Acid	31,6 ml	Merck
TSA (Trypsin-Inhibitor)			Clonetics, Cambrex

A549

	Bestandteil	Menge	Hersteller
Stimulationsmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml	Gibco
Zellkulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml	Gibco
	FCS (hitzeinaktiviert)	10,00%	Gibco
Kryo- Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml	Gibco
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00%	Sigma

Beas-2B

	Bestandteil	Menge	Hersteller
Zellkultur- und Stimulationsmedium	Keratinocyte SFM	500 ml	Gibco
	Epidermal growth factor	2,5 µg	Gibco
	Bovine pituitary ex- tract	25 mg	Gibco

	Glutamin 100mM 100x	5 ml	Gibco
	Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	250 µl	Sigma
	All trans Retinolsäure (1 mg/ml)	50 µl	Sigma
Adhäsionsflüssigkeit	Keratinocyte SFM	100 ml	Gibco
	Bovines Serumalbumin (BSA) 100mg/ml	1 ml	Sigma
	Fibronectin 1 mg/ml	1 ml	Sigma
	Vitronectin 50 µg/ml	0,1 ml	Sigma
Kryokonservierungsmedium	Keratinocyte SFM	10 ml	Gibco
	Polyvinylpyrolidon (PVP)	1,00%	Sigma
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	7,50%	Sigma
ETI (Trypsin-Inhibitor)		30 mg/ml	Roche

2.1.4 PCR

	Bestandteil	Menge	Hersteller
<i>RNeasy Kit</i> (RNA-Isolierung)			Qiagen
Lysepuffer	RLT	1 ml	Qiagen
	β-Mercaptoethanol	0,01%	Sigma
TAE Puffer (Gelelektrophorese), pH 8,0	Tris Base	4,84 g	Sigma
	Eisessig 100%ig	1,14 ml	Merck

	EDTA 0,5 M	2 ml	Roth
	Aqua bidest. ad	1 l	
Mastermix (RT-PCR) je Probe	AMV-Reverse-Transkriptase 1 U/µl	0,75 µl	Promega
	AMV-RT Puffer (5x)	4 µl	Promega
	RNAasin (RNase Inhibitor)	0,75 µl	Promega
	Ransom Hexamer Primer	1 µl	Pharmacia Biotech
	Nukleotide 100mM	2 µl	Promega
	Aqua bidest.	variabel	
Mastermix (PCR) je Probe	Red Taq- Puffer 10x	2,5 µl	Sigma
	Red Taq DNA-Polymerase 1 U/µl	0,75µl	Sigma
	Nukleotide 100mM	0,5 µl	Promega
	Vorwärts- und Rückwärts-Primer 0,5 µg/µl	0,25 µl	Molbiol
	Aqua bidest	15,5µl	
Agarose-Gel 2%ig	Agarose	2 g	Promega
	TAE-Puffer (s.o.)	100 ml	
	Ethidiumbromid	4 µl	Sigma
1 kB DNA-Ladder			Invitrogen

2.1.4.1 PCR-Primer

Hersteller: Molbiol

	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Annealing-Temperatur	Zyklen
GAPDH	5'- CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA	5'- TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC	60°C	22

EGFR	5'- TgC AAC CTT CTg gAg ggT GA	5' GTG TTG TTT TCT CCC ATG AC	64°C	30
IL-8	5' CTA GGA CAA GAG CCA GGA AGA	5' AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC	60°C	24

2.1.5 Transfektion

	Hersteller
siRNA EGFR <i>silencer select</i> [®] validated	Ambion
siRNA Kontrolle	MWG- Biotech AG
Transfektionsreagenz: <i>Solution V</i> [®]	Amaxa

2.1.6 IL-8-ELISA

	Bestandteil	Menge	Hersteller
Carbonat-Puffer 0,1 M, pH 9,5	Natriumhydrogen- carbonat	4,2 g	Merck
	Natriumcarbonat	1,78 g	Merck
	Aqua bidest. ad	500 ml	
Blockpuffer	Dulbecco's PBS 1x	45 ml	PAA
	FCS (inakt.)	5 ml	Gibco
Waschpuffer	Dulbecco's PBS 1x	1 l	PAA
	Tween20	0,05%	Sigma
Substratlösung <i>TMB Substrate Reagent Set</i>			BD Bioscience
Stopplösung	Schwefelsäure 95- 97%ig	27,47 ml	Merck
	Aqua bidest.	500 ml	

<i>human IL-8 ELISA Set</i>	Capture Antikörper anti humanes IL-8	1:250	BD Bioscience
	Detektions- Antikörper anti humanes IL-8	1:250	BD Bioscience

2.1.7 Western Blot

	Bestandteil	Menge	Hersteller
Phosphoprotein- waschpuffer	Natriumorthovana- dat 200mM	5 ml	Sigma
	Natriumpyrophos- phat 150 mM	50 ml	Sigma
	Natriumfluorid 1 M	50 ml	Sigma
Lysepuffer	Dulbecco's PBS 1x	500 ml	PAA
	Tris-HCL, pH 7,4	50 mM	Sigma
	EDTA	1 mM	Roth
	EGTA	1 mM	Sigma
	PMSF	1 mM	Sigma
	Antipain	10 µg/ml	Sigma
	Leupeptin	10 µg/ml	Sigma
	Pepstatin	10 µg/ml	Sigma
	Nonidet P-40 99%ig	1%	Fluka
	Natriumfluorid	50 mM	Sigma
	Natriumpyrophos- phat	5 mM	Sigma
Bradford Reagenz	SDS	0,1%	Serva
	Natriumpervanadat	2 mM	Merck
	<i>BioRad Protein Assay</i>	20%	BioRad
Lämmli-Puffer	Aqua bidest.	80%	
	Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8	1 ml	Sigma

	Glycerol	0,8 ml	Sigma
	SDS (10% w/v)	1,6 ml	Serva
	Bromphenolblau (1% w/v)	0,4 ml	Pharmacia Biotech
	β -Mercaptoethanol (1% v/v)	0,4 ml	Sigma
	Aqua bidest	5 ml	
Gelelektrophorese- Puffer	Tris-Base	3 g	Sigma
	Glycin	14,4 g	Merck
	SDS (10% w/v)	1 g	Serva
	Aqua bidest.	1 l	
Blotpuffer	Tris-Base	3 g	Sigma
	Glycin	14,4 g	Merck
	Methanol	20%	Merck
	Aqua bidest	1 l	
Blotpuffer	Tris-Base	3 g	Sigma
	Glycin	14,4 g	Merck
	Methanol	20%	Merck
	Aqua bidest.	1 l	
Blockpuffer	Ody Blocking Buffer	50%	Licor
	Dulbecco's PBS 1x	50%	PAA
Ponceau-S-Protein- färbung	Ponceau S	1 g	Sigma
	Essigsäure 100%ig	50 ml	Merck
	Aqua bidest	1 l	
Sammelgel	Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8	2,5 μ l	Sigma
	SDS (10% w/v)	100 μ l	Serva
	40%iges Bis- Acrylamid Ratio 19:1	1,33 ml	Serva
	TEMED	10 μ l	R&D Systems
	Ammoniumpersulfat 10%ig	50 μ l	Serva

	Aqua bidest.	10 ml	
Trenngel 10%ig	Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	Sigma
	SDS (10% w/v)	100 µl	Serva
	40%ige Bis-Acrylamid-Lösung, 19:1	3,35 ml	Serva
	TEMED	5 µl	R&D Systems
	APS 10%ig	3,35 ml	Serva
	Aqua bidest.	10 ml	
Rekombinanter Protein-Molekulargewicht-Marker			Amersham Life Science

primärer Antikörper	kDa	Spezies	Konzentration	Hersteller
EGFR	170	Ziege	1:500	Santa Cruz
IκBα	36	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz
pEGFR	170	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
pERK	42	Maus	1:1000	
ERK-2	42	Maus	1:1000	Santa Cruz
Akt	40	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling

sekundärer Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus Cy5.5	Ziege	1:2000	Rockland
Anti-Ziege IRDye800	Esel	1:2000	Rockland
Anti-Kaninchen IRDye800	Ziege	1:2000	Rockland
Anti-Kaninchen Cy5.5	Ziege	1:2000	Rockland

2.1.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Antikörper	Spezies	Hersteller
NF- κ B p65 (C-20) sc-372	Kaninchen	Santa Cruz
Pol II (N-20) sc-899	Kaninchen	Santa Cruz

Promotor-Primer	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Annealing-Temperatur	Zyklenzahl	Hersteller
IL-8	5'-AAG AAA ACT TTC GTC ATA CTC CG-3'	5'-TGG CTT TTT ATA TCA TCA CCC TAG-3'	60°C	33	TIB Molbiol

ChIP-PCR Mastermix

Substanz	Menge
10x PAN Taq Puffer	5 μ l
Nukleotide, 100mM	1 μ l
Vorwärtsprimer, 10mM	3 μ l
Rückwärtsprimer, 10mM	3 μ l
50xMg2Cl	4 μ l
H2O	31,5 μ l
PAN Taq Polymerase, 1U/ μ l	0,5 μ l

ChIP-PCR Cycler-Programm

Vorgang	T in °C	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	7min	1
Denaturierung	94	20s	-
Annealing	variabel	20s	variabel
Elongation	72	20s	-
Elongation	72	7min	1

ChIP-RIPA-Puffer

Substanz	Menge
----------	-------

Tris HCl, pH 7,5	10mM
NaCl	150mM
Nonidet P-40	1%
Desoxycholat	1%
SDS	0,1%
EDTA	1mM

ChIP DNA-Ladepuffer (5-fache Konzentration)

Substanz	Menge
Glycerol	5ml
0,5M EDTA	1ml
2% OrangeG	1ml
10% SDS	0,1ml
destilliertes Wasser	2,9 ml

ChIP TE-Puffer

Substanz	Menge
Tris, pH 7,5	10mM
EDTA	1mM

2.1.9 Biolumineszenzassay

Assay Kit	Hersteller
<i>Luciferase Assay System</i>	Promega

2.1.10 Inhibitoren

	Inhibition von	Hersteller
AG1478	EGFR	Calbiochem
U0126	MEK1/MEK2 (ERK1/2-Aktivatoren)	

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

	Verwendung	Hersteller
6/12/24/48-well-Platten	Zellkultur	Falcon
Descosept	Desinfektionsmittel (Bakterienkultur)	Dr. Schumacher GmbH
Einmalimpfösen	Animpfen von Bakterien	Roth
F96-Immuno Plate (Maxisorb)	IL-8-Elisa	Nunc
Hybond-ECL-Membran	Proteintransfer (Western Blot)	Amersham Bioscience
Kunststoffküvetten	Protein- und Bakterien- Messung im Photometer	Serva
Nukleofektorküvetten	Transfektion von A549-Zellen mit siRNA	Amaya
Pasteurpipetten (230 mm)		Brand
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)		Falcon
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)		Falcon
Quarzküvetten Typ 105.200	RNA-Messung	Helma
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)		Eppendorf
Thermowell™ Tubes 0,5 ml	DNase und RNase freie Reaktionsgefäße (RT-PCR)	Costar
Whatman Filterpapier	Proteintransfer (Western Blot)	Whatman
Zellkulturflaschen (T75)	Zellkultur	Falcon
Zellschaber		Costar

2.1.12 Geräte

	Verwendung	Hersteller
BioRad Gelelektrophorese	Gelelektrophorese (PCR)	BioRad

System		
BioRad Gelelektrophorese System	Gelelektrophorese (Western Blot)	BioRad
Blot System	Proteintransfer (Western Blot)	Transblot
CAMEDIA C-4040 200M	Digitalkamera (PCR)	Olympus
Elektrophoresekammer SUB-CELL GT	PCR	Bio-RAD
Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für Olympus Kamera (PCR)	
Gelhalterungssystem (PCR)	Gießen der Gele	BioRad
Gießvorrichtung (Western Blot)	Einspannen der Glasplatten	BioRad
Kühlzentrifuge J2 HS		Beckmann
Laborwaage		Sartorius
Mastercycler Gradient	RT-PCR und PCR	Eppendorf
Mastercycler Personal	RT-PCR und PCR	Eppendorf
Mikroskop BX 60		Olympus
Mini-Q-Anlage	Herstellung von Aqua bi-dest.	Millipore Corporation
MS2 Minishaker (Vortexer)		IKA
Nukleofektor 1	Transfektion von A549-Zellen mit SiRNA	Amaxa Biotechnologies
Odyssey Infrared Imager	Dokumentation (Western Blot)	Licor
pH-Meter 526		WTW
Platereader MR 5000	Auslesen der ELISA-Platten	Dynatech
Polymax 1040	Schwenken der Membranen (Western Blot)	Heidolph Instruments
RCT basic	Magnetrührer (Western Blot)	Ika-Labortechnik
Spektrophotometer 922		Uvicon

Sterilbank Laminair HB 2448		Hereaus
TFX-20M GIBCO BRL UV Transluminator	Darstellung der Banden im PCR Gel	Life Technologies™
Thermomixer Comfort	Erhitzen auf 95 °C	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikro 24- 48R		Hettich
Zellkulturinkubator		Hereaus
Zentrifuge 48 RC, Rotana RPC		Hettich

2.1.13 Analysesoftware

	Hersteller
Bio-Imaging-Control, argus X1	Biostep GmbH
Infrared Odyssey Imaging System Applica- tion Software	Licor
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Arbeiten erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Zellkultivierung erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Unsterile Lösungen und Materialien wurden zunächst autoklaviert, heißluftsterilisiert oder sterilfiltriert. Die Werkbanken und Geräte wurden vor und nach Gebrauch mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Wurden Zellen mit Bakterien stimuliert, erfolgte die Stimulation unter den Bedingungen der Bakterienkultur (s.u.).

2.2.1.1 Auftauen von A549- und Beas-2B-Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff (-196°C) in Kryoröhrchen gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad transferiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmes Kulturmedium gegeben und 5 min bei 172 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (T75) ausgesät. Am folgenden Tag wurden sie mit frischem Kulturmedium versorgt.

2.2.1.2 Kultivierung von A549- und Beas-2B-Zellen

Bei der Anzucht der Zellen in Zellkulturgefäßen erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel. Wenn die Zellen einen nahezu konfluenten Monolayer ausgebildet haben erfolgte entweder die Stimulation der Zellen oder das Aufteilen und Aussäen der Zellen in neue Zellkulturgefäße.

2.2.1.3 Aussaat von A549-Zellen

Das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Trypsinierung mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurden die Zellen vom Flaschengrund gelöst. Die Zellen wurden in neues Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.1.4 Aussaat von Beas-2B-Zellen

Die neuen Zellkulturgefäße wurden vor der Aussaat der Zellen für 30 min mit Adhäsionsflüssigkeit inkubiert. Das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Trypsinierung mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurden die Zellen vom Flaschengrund gelöst und in 10 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 200 µl ETI Trypsininhibitor resuspendiert. Die Zellen wurden in neues Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in die neuen vorbehandelten Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.1.5 Kryokonservierung von A549- und Beas-2B-Zellen

Das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Trypsinierung mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurden die Zellen vom Flaschengrund gelöst und in 10 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Suspension in 1 ml Kryoröhrchen überführt. Dann wurden die Kryoröhrchen zunächst in einer Ethanol-Kryobox auf -80°C heruntergekühlt um schädigende Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

2.2.1.6 Kultivierung von primären Bronchialepithelzellen (PBEC)

Vor Kultivierung der primären Bronchialepithelzellen wurden die Zellkulturgefäße für 30 min bei 37°C mit Adhäsionsflüssigkeit inkubiert. Die durch Bronchialbürste gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in T25-Zellkulturflaschen überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 4 Tage.

2.2.1.7 Aussaat von primären Bronchialepithelzellen (PBEC)

Die neuen Zellkulturgefäße wurden vor der Aussaat der Zellen für 30 min mit Adhäsionsflüssigkeit inkubiert. Das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Trypsinierung mit 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C. Nach einigen Minuten waren die Zellen durch leichtes Klopfen an der Flasche vom Flaschengrund lösbar. Die Trypsinierung wurde dann mit 1,5 ml TSA Trypsininhibitor gestoppt und die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen bei 800 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in neues Zellkulturmedium aufgenommen und in einem Verhältnis von bis zu 1:5 in die neuen vorbehandelten Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.1.8 Zellzahlbestimmung

Wie in den oben genannten Verfahren der Aussaat von Zellen beschrieben, wurden die Zellen nach der Trypsinierung in Suspension gebracht. 20 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellzahlen innerhalb zweier Großquadrate der Zählkammer gezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension wurde anhand der Kammerkonstante nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl aus 2 Großquadraten})/2 * \text{Kammerkonstante } 10^4$$

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

Die Arbeiten erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Bakterienkultivierung erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Unsterile Lösungen und Materialien wurden zunächst autoklaviert, heißluftsterilisiert oder sterilfiltriert. Die Werkbanken und Geräte wurden vor und nach Gebrauch mit Descosept® flächendesinfiziert. Wurden Zellen mit Bakterien stimuliert, erfolgte die Stimulation unter den Bedingungen der Bakterienkultur. Mit Bakterien kontaminierte Abfälle wurden autoklaviert.

2.2.2.1 Kultivierung von *Moraxella catarrhalis*

Zur Anzüchtung von *M. catarrhalis* wurde eine Impföse in den bei -20°C gelagerten Glycerolstock getaucht und auf eine Columbia-Agarplatte mit 5% Schafsblut ausgestrichen. Diese wurde dann für 8-12 h bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit einer Impföse abgestrichen und in 20 ml BHI-Medium in Suspension gebracht. Diese wurde bei 37°C unter Schütteln in 50 ml Zentrifugenröhrchen für ca. 1 h inkubiert und anschließend für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml PBS oder Stimulationsmedium resuspendiert. Die Bakterienkonzentration der Suspension wurde mit einem Photometer bestimmt. Eine OD_{405nm} von 0,3 entspricht ca. 10⁸ colony forming units (cfu) /ml.

2.2.2.2 Anlegen eines Glycerolstocks

Zum Anlegen eines Glycerolstocks wurden die Bakterien wie oben beschrieben auf Columbia-Agarplatten angezüchtet, in BHI-Medium inkubiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kryomedium resuspendiert und in ein 1 ml Kryoröhrchen transferiert. Das Kryoröhrchen wurde für den kurzfristigen Gebrauch bei -20°C gelagert; die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.2.3 Infektion von Zellen mit *M. catarrhalis*

Vorbereitend zur Infektion von Zellen wurde das Zellkulturmedium am Vortag abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem zusatzfreiem Stimulationsmedium versetzt. Am Folgetag erfolgte vor der Infektion noch einmal ein Wechsel des Stimulationsmediums, welches dann mit dem entsprechenden Volumen der aus Bakterien und Stimulationsmedium bestehenden Suspension ersetzt wurde. Falls ein Inhibitor verwendet wurde, wurden die Zellen vor der Infektion mit *M. catarrhalis* 2 h mit dem Inhibitor vorinkubiert. Für die Infektionsdauer wurden die Zellen bei 37°C im CO₂-Begasungsbrutschrank inkubiert.

Die Cytotoxizität der Inhibitoren in den angegebenen Mengen wurde zuvor ausgeschlossen. Erfolgte die Stimulation in einer bestimmten MOI (*multiplicity of infection*), d.h. in einem bestimmten Verhältnis von Bakterien zu Zellen, musste zunächst die Zellzahl gemäß Kapitel 2.2.1.8 bestimmt werden.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.3.1.1 RNA-Isolierung

Die stimulierten Zellen wurden nach Absaugen des Stimulationsmediums mit Lysepuffer lysiert. Im Anschluss wurde die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Lagerung der RNA-Isolate erfolgte bei -80°C .

Die Konzentration der RNA des Isolats wurde über die Messung der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurden $198\ \mu\text{l}$ Aqua bidest. mit $2\ \mu\text{l}$ RNA-Isolat versetzt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $260\ \text{nm}$ bestimmt. Die RNA-Konzentration des Isolats errechnete sich dann nach folgender Formel:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} * 4 = \text{RNA } \mu\text{g/ml}$$

2.2.3.1.2 Reverse Transkriptase

Pro Probe wurden $1\ \mu\text{g}$ RNA in $11,5\ \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser benötigt. Dazu wurde anhand der errechneten Konzentration ein entsprechendes Volumen der RNA-Proben durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf das Endvolumen von $11,5\ \mu\text{l}$ gebracht. Die Proben wurden für $5\ \text{min}$ bei 70°C im Thermocycler denaturiert, anschließend wurde je Probe $8,5\ \mu\text{l}$ RT-Mastermix hinzugegeben und die Proben für $60\ \text{min}$ auf 42°C erhitzt. Zum Schluss wurde die reverse Transkription durch ein Erhitzen auf 95°C für $5\ \text{min}$ gestoppt und die Proben mit der enthaltenen cDNA mit $80\ \mu\text{l}$ Aqua bidest. verdünnt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C .

2.2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

$5\ \mu\text{l}$ der cDNA-Probe wurden mit $20\ \mu\text{l}$ des PCR-Mastermixes vermischt. Im Thermocycler erfolgten dann in gewünschter Zyklenzahl folgende Reaktionsschritte:

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	$0,5\ \text{min}$
Hybridisierung	Primer-spezifische Annealing-Temperatur	$2\ \text{min}$

Polymerisation	72°C	2 min
Extension	72°C	5 min

2.2.3.1.4 Elektrophorese

Zur Lösung der Agarose in TAE-Puffer wurde das Gemisch in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde Ethidiumbromid hinzugegeben und die Lösung in eine Gelhalterung gegossen. Nach dem Festwerden des Gels wurden die Geltaschen mit den in der PCR gewonnenen Proben und dem 1 kB DNA-Marker beladen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 1 h bei einer Spannung von 100 V. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.3.2 Transfektion von siRNA in A549-Zellen

Die Transfektion von small interfering RNA in A549-Zellen wurde mit dem Amaxa Cell Line Nukleofektor Kit V laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei diesem Transfektionsverfahren wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls kurzzeitig für siRNA permeabel gemacht. Die eingedrungene siRNA bindet an die mRNA des Zielproteins und verhindert so dessen Translation.

2.2.3.3 IL-8 ELISA

Nach der Stimulation der Zellen wurde sekretiertes IL-8 im Stimulationsmedium mittels ELISA laut Herstellerprotokoll des *human IL-8 ELISA Set* von BD Biosciences nachgewiesen.

2.2.3.4 Western Blot

2.2.3.4.1 Extraktion des Gesamtproteins

Die Zellkulturgefäße mit den stimulierten Zellen wurden auf Eis gestellt. Das Stimulationsmedium wurde abgesaugt, die Zellen 2x mit 4°C kaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen, der Waschpuffer abgesaugt und die Zellen mit Lysepuffer versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurde das Lysat vom Boden getrennt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei 4°C für 10 min bei 25000 g zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration des im Zelllysats vorhandenen Gesamtproteins wurde mittels des *Bio-Rad Protein Assay* nach Bradford bestimmt. Die Farbstofflösung wurde 1:5 verdünnt. 5 µl des Lysats wurden mit 995µl Farbstofflösung vermischt und für 5 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und anhand der erhaltenen Werte die Gesamtprotein-Konzentration berechnet.

2.2.3.4.3 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Protein-Lysate wurden mit β-Mercaptoethanol-haltigem Lämmli-puffer 1:1 gemischt und bei 95°C im Thermomixer unter Schütteln denaturiert. Die SDS-PAGE erfolgte in einem Gel bestehend aus 6%igen Sammelgel und 10%igen Trenngel. Das Gel wurde mit je 100µg Protein und einem Größenmarker beladen. Die Elektrophorese wurde für 3 h 15 min bei einer Spannung von 100 mV durchgeführt.

2.2.3.4.4 Blotting

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine Hybond-ECL-Membran gelegt. Zwischen zwei Lagen Whatman-Filterpapier erfolgte der Blot in der mit 4°C kaltem Blotpuffer gefüllten Blotkammer für 1 h 30 min bei 100V.

Zur Beurteilung des Transfererfolgs wurde die Membran mit Ponceau-S gefärbt. Der Farbstoff wurde mit Aqua bidest. wieder ausgewaschen.

Die Membran wurde unter Schwenken für 1 h mit Blockpuffer, dann über Nacht bei 4°C mit dem in Blockpuffer mit 0,1 % Tween20 gelösten primären Antikörper inkubiert. Sie wurde anschließend 3x für jeweils 5 min mit PBS + 0,1% Tween20 gewaschen. Daraufhin erfolgte für 1 h die Inkubation mit dem mit Blockpuffer im Verhältnis 1:2000 verdünnten sekundären Antikörper. Anschließend wurde sie 2x mit PBS + 0,1% Tween20 und 2x mit PBS gewaschen.

Mit dem *Odyssee Infrared Imaging System* von Licor wurden die IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper auf der Hybond-ECL-Membran lasergestützt im digital eingescannten Bild sichtbar gemacht.

2.2.3.5 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

In dieser Methode werden die zu einem Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen untersucht. Es werden Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren verwendet, mit welchen Transkriptionsfaktor-DNA-Komplexe isoliert werden. Mittels PCR werden anschließend DNA-Promotorregionen nachgewiesen, an denen Transkriptionsfaktoren gebunden haben. Mit dieser Methode kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorregionen semiquantitativ nachgewiesen werden.

Beas-2B Zellen wurden bis zur 90%igen Konfluenz in T75-Flaschen angezüchtet und am Vorabend der Infektion auf Stimulationsmedium umgefüttert. Am Versuchstag wurden die Zellen 2 h mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 vorinkubiert und daraufhin mit *Moraxella catharrhalis* für eine Dauer von 4 h infiziert. Das Medium wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt und die Zellen für 1 min mit 1% Formaldehyd in PBS behandelt, wodurch der Transkriptionsprozess an diesem bestimmten Zeitpunkt angehalten und die Protein-DNA-Bindungen fixiert wurden. Die Zellen wurden mit einer 0,25M Glycin-PBS Lösung gewaschen und in PBS aufgenommen. Nach einmaligem Waschen des Zellpellets mit PBS (5min Zentrifugation bei 4°C, 1200 rpm), wurde dieses in 2ml ChIP-RIPA Puffer unter Zugabe von 1% Aprotinin resuspendiert und zur Fragmentierung der DNA auf Eis geschallt (jeweils 4 Mal 1min Schallen, 1min Pause, bei 50% Schallintensität). Das Lysat wurde für 20min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die sich anschließenden Immunpräzipitationen aliquotiert.

Für die Immunpräzipitationen wurden 250µl des Lysats mit 6µl des gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichteten Antikörpers über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am Folgetag wurden 60µl ChIP-RIPA Puffer und je 20µl Protein A und G Agarose zum Separieren der Antikörper-Transkriptionsfaktor-Komplexe dazu gegeben und 3 Stunden bei 4°C geschüttelt. Daraufhin wurde die Agarose durch ein einminütiges Zentrifugieren bei 4°C und 13 000 rpm pelletiert und der Überstand entfernt.

Es folgten mehrere Waschschrte: zweimaliges Waschen mit je 1ml ChIP-RIPA Puffer, einmal High-Salt Puffer, einmal ChIP-RIPA- Puffer bei 4°C und abschließend einmal TE-Puffer bei Raumtemperatur. Durch den Wechsel der Salzkonzentrationen in den Waschpuffern wurde ein Grossteil der Verunreinigungen und unspezifischen Bindungen entfernt, sodass bei der folgenden 15min Elution mit 55µl EB-Puffer bei 30°C und 1200 rpm, Antikörper-Agarose- und Transkriptionsfaktor-DNA-Komplexe von einander gelöst

wurden. Agarose und Antikörper wurden für 1min bei Raumtemperatur und 13 000rpm pelletiert und 50µl des Überstandes, in dem die gewonnene DNA gelöst war, mit 150µl TE-Puffer und 0,5% RNase A eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert, mit 2,5% Proteinase K versetzt und für 12h Proteine und RNA in einem Thermocycler verdaut (6h bei 37°C, 6h bei 65°C). Die DNA wurde mittels QIAquick® PCR Purification Kit (*Qiagen*) nach Empfehlung des Herstellers aufgereinigt und in einer Promotor-Primer-PCR amplifiziert.

2.2.3.6 Nachweis der NF-κB-Aktivität durch einen Biolumineszenz-Assay

A549-Zellen wurden mit einem pNF-κB-Luziferase-Reportergen (pNF-κB-*Luc*) stabil transfiziert. Das in pNF-κB-*Luc* enthaltene Luziferase-Gen wird erst exprimiert, wenn aktiviertes NF-κB an den synthetischen Promotor von pNF-κB-*Luc* bindet, welcher mehrere NF-κB-Bindungssequenzen aufweist. Die exprimierte Luziferase wird anschließend mittels eines Biolumineszenz-Assays nachgewiesen. Mit dieser Methode kann die Bindungsaktivität von aktiviertem NF-κB gemessen werden und somit auf indirekte Weise aktiviertes NF-κB semiquantitativ nachgewiesen werden.

Die mit einem NF-κB-Luziferase-Gen stabil transfizierten A549-Zellen wurden nach Ablauf der Stimulationszeit mit 200 µl Reporter-Lysepuffer (1:5 in Aqua dest. verdünnt) lysiert und für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 5 µl Zellextrakt in ein Messröhrchen gegeben und in der Messkammer des Luminometers platziert. Die Chemilumineszenz wurde durch Zugabe von 20 µl Luziferin-Reaktionsgemisch des Luziferase-Assay-System (Promega) pro Probe für 5 s gemessen. Die erhaltenen Luziferase-Werte wurden als relative Luziferaseeinheiten (engl.: *relative luciferase units, RLU*) angegeben.

2.2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm *Prism 5.0* von *Graph Pad*® verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand des *one-way ANOVA* (engl.: *analysis of variance*, Varianzanalyse) und des *Newman-Keuls post-Tests*. Mit diesen Verfahren ist es möglich die Signifikanz der Unterschiede zwischen mehreren Mittelwerten gleicher Ka-

tegorie festzustellen. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet und in der Abbildung mit einem Stern markiert, wenn die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 EGFR wird in pulmonalen Epithelien exprimiert

In einem ersten Schritt bin ich der Frage nachgegangen, ob EGFR in pulmonalen Epithelien exprimiert wird. Die Untersuchungen wurden anhand primärer Bronchialepithelzellen (PBEC) durchgeführt. Darüberhinaus habe ich die Untersuchungen auch an der SV40-transformierten bronchialen Epithelzelllinie Beas-2B und der Alveolarzellkarzinom-Zelllinie A549 durchgeführt. Es erfolgte der Nachweis von EGFR-mRNA mittels RT-PCR bzw. der Nachweis von EGFR-Protein mittels Western Blot in den entsprechenden Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl EGFR-mRNA (Ab. 5 A) als auch EGFR-Protein (Abb. 5 B) in allen untersuchten pulmonalen Epithelzelllinien nachgewiesen werden konnte.

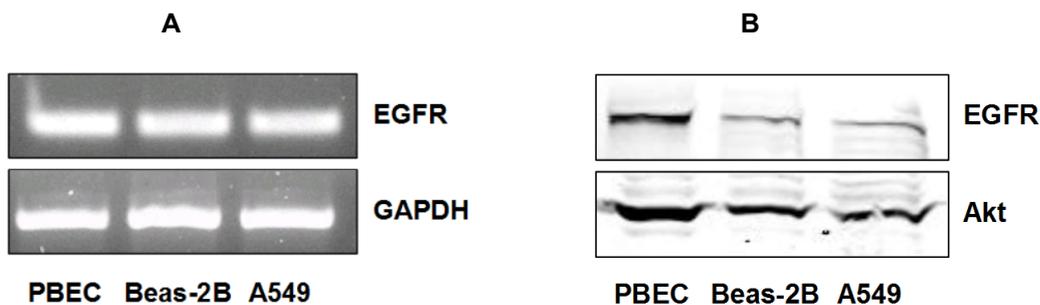


Abb. 5. Die Gen- und Protein-Expression des EGFR in pulmonalen Epithelien

A. In Lysaten von PBECs, Beas-2B- und A549-Zellen wurde mittels RT-PCR EGFR-mRNA nachgewiesen. Die Abbildung zeigt ein Agarose-Gel mit den entsprechenden DNA-Banden. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH-mRNA. Zu sehen ist, dass jede der drei Zelllinien EGFR-mRNA exprimiert.

B. In Lysaten von PBEC, Beas-2B- und A549-Zellen wurde mittels Western Blot EGFR-Protein nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von Akt-Protein. Die Abbildung zeigt eine Hybond-ECL-Membran mit den entsprechenden Protein-Banden. Zu sehen ist, dass jede der 3 Zelllinien EGFR-Protein exprimiert.

3.2 *Moraxella catarrhalis* induziert eine Verstärkung der EGFR-Expression

In einem weiteren Schritt untersuchte ich, ob eine Infektion mit *Moraxella catarrhalis* die EGFR-Expression in pulmonalen Epithelzellen verstärken kann. Dazu wurden A549-Zellen mit dem *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert und die Expression von EGFR-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Hierbei konnte eine dosisabhängige Verstärkung der EGFR-Expression durch *M. catarrhalis* festgestellt werden (Abb. 6).

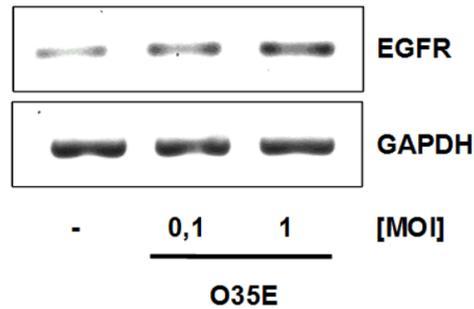


Abb. 6. Die *Moraxella catarrhalis*-induzierte Verstärkung der EGFR-Expression

Pulmonale Epithelzellen wurden dosisabhängig mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert. Die Versuchsdauer betrug 2 h. In den Lysaten wurde mittels RT-PCR EGFR-mRNA nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH-mRNA. Die Abbildung zeigt ein Agarose-Gel mit den entsprechenden DNA-Banden. Zu sehen ist eine dosisabhängige Verstärkung der EGFR-Expression durch *M. catarrhalis*. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.3 *Moraxella catarrhalis* aktiviert EGFR

Der nächste Versuch sollte bestimmen, ob *M. catarrhalis* in der Lage ist, EGFR zu aktivieren. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase. Beas-2B-Zellen wurden mit *M. catarrhalis* in einer Zeitreihe infiziert. Anschließend wurde phosphoryliertes EGFR-Protein mittels Western Blot nachgewiesen. Im Ergebnis konnte ich feststellen, dass *M. catarrhalis* EGFR zeitabhängig phosphoryliert (Abb. 7).

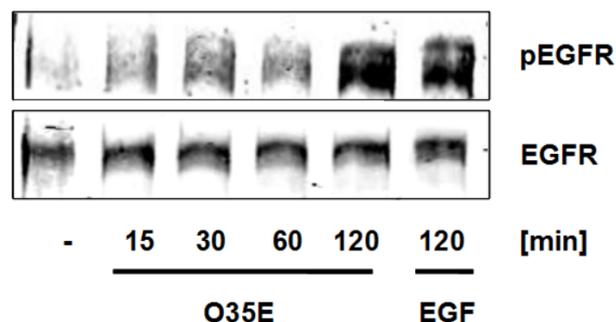


Abb. 7. Die *Moraxella catarrhalis*-induzierte Phosphorylierung des EGFR

Beas-2B-Zellen wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^7 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 15-120 min. Als Positivkontrolle für die Stimulation diente EGF (25 ng/ml). In den Lysaten wurde mittels Western Blot phosphoryliertes EGFR-Protein (pEGFR) nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von EGFR-Protein. Die Abbildung zeigt eine Hybond-ECL-Membran mit den entsprechenden Protein-Banden. Zu erkennen ist eine zeitabhängige Phosphorylierung des EGFR durch *M. catarrhalis*. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.4 Die Inhibition des EGFR senkt die *Moraxella catarrhalis*-induzierte Genexpression und Sekretion von IL-8

Eine Infektion mit *M. catarrhalis* führt zu einer inflammatorischen Zellantwort in pulmonalen Epithelzellen mit einer Erhöhung der Genexpression und Sekretion von IL-8 (Slevogt et al. 2006). Um zu überprüfen, ob dieser inflammatorische Prozess abhängig von einer Aktivierung des EGFR ist, wurde der Rezeptor durch den selektiven EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 inhibiert und die Auswirkung auf die Genexpression und Sekretion von IL-8 bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Genexpression (Abb. 8 A) als auch die Sekretion von IL-8 (Abb. 8 B und C) durch die Inhibition des EGFR vermindert werden. Die Nachweise erfolgten mittels RT-PCR und ELISA.

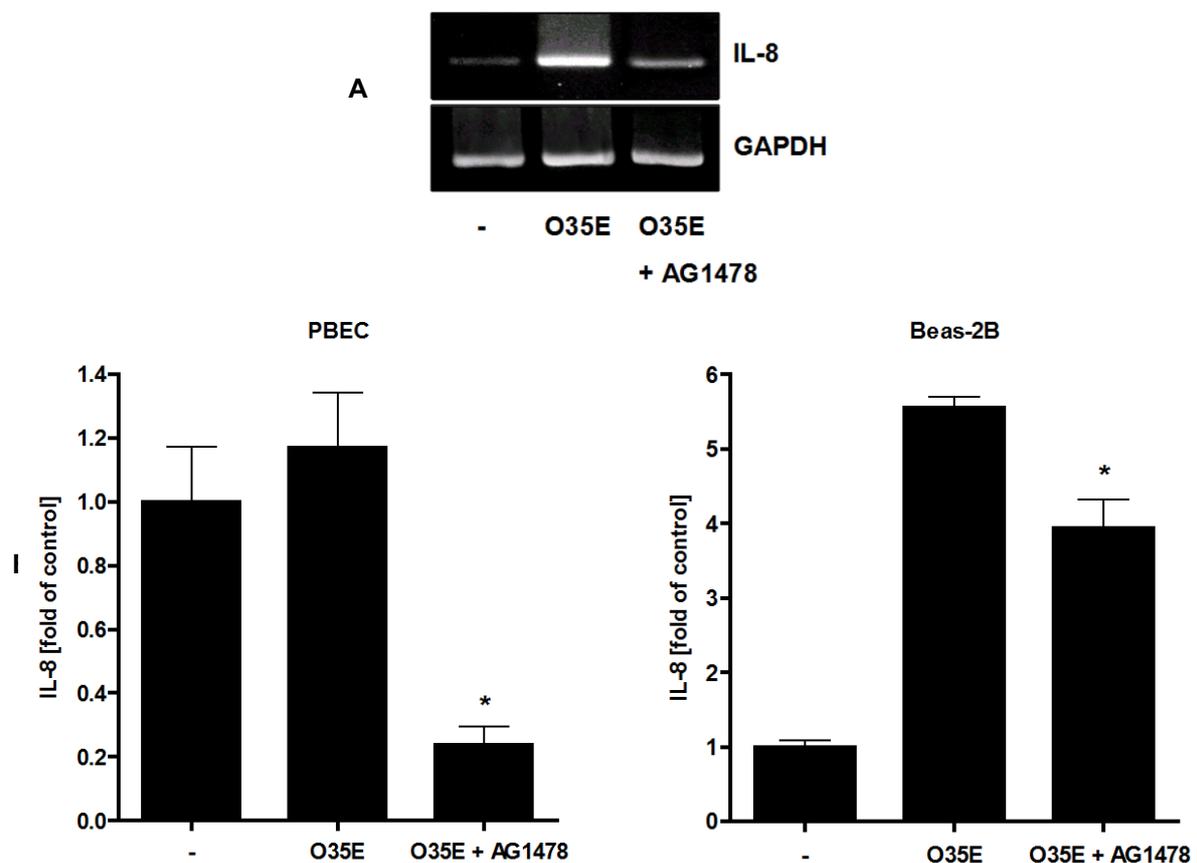


Abb. 8. Die Inhibition des EGFR senkt die *M. catarrhalis*-induzierte Genexpression und Sekretion von IL-8

A. Beas-2B-Zellen wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^7 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 12 h. Im entsprechenden Ansatz erfolgte 2 h vor der Infektion eine Vorinkubation mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 (30 μ M). In den Lysaten wurde mittels RT-PCR IL-8-mRNA nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH-mRNA. Die Abbildung zeigt ein Agarose-Gel mit den entsprechenden DNA-Banden. Zu sehen ist eine deutliche Verminderung der Genexpression von IL-8 durch die Inhibition des EGFR. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

B und **C**. Primäre Bronchialepithelzellen (PBEC) (**B**) und Beas-2B-Zellen (**C**) wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^7 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 16 h. Im entsprechenden Ansatz erfolgte vor der Infektion für 2 h eine Vorinkubation mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 (3 μ M). Nach Versuchsende wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf den Gehalt von IL-8 untersucht. Zu sehen ist eine Verminderung der Sekretion von IL-8 bei den mit EGFR-Inhibitor behandelten Zellen. Die Versuche wurden jeweils mit doppelten Ansätzen durchgeführt. Die Werte für IL-8 sind als ein Vielfaches des Leerwertes (engl.: *fold of control*) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Die Sternmarkierung (*) bedeutet, dass die Verminderung der Sekretion von IL-8 durch AG1478 signifikant ist ($p < 0,05$). Die Abbildungen stellen die Zusammenfassung von jeweils 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

3.5 Gen-Silencing des EGFR senkt die Sekretion von IL-8

Um funktionell zu untersuchen, ob die *M. catarrhalis*-induzierte Sekretion von IL-8 EGFR-abhängig ist, habe ich einen *knock-down* des EGFR-Gens mittels siRNA-Versuchen in pulmonalen Epithelzellen durchgeführt. Dabei wurde die Expression des EGFR durch RNA-Interferenz gesenkt (Abb. 9 A). Anschließend wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* infiziert. In den Zellüberständen erfolgte der Nachweis von sekretiertem IL-8 mittels ELISA. Im Ergebnis wiesen die mit EGFR-siRNA transfizierten Zellen eine deutliche Verminderung der IL-8-Sekretion auf (Abb. 9 B).

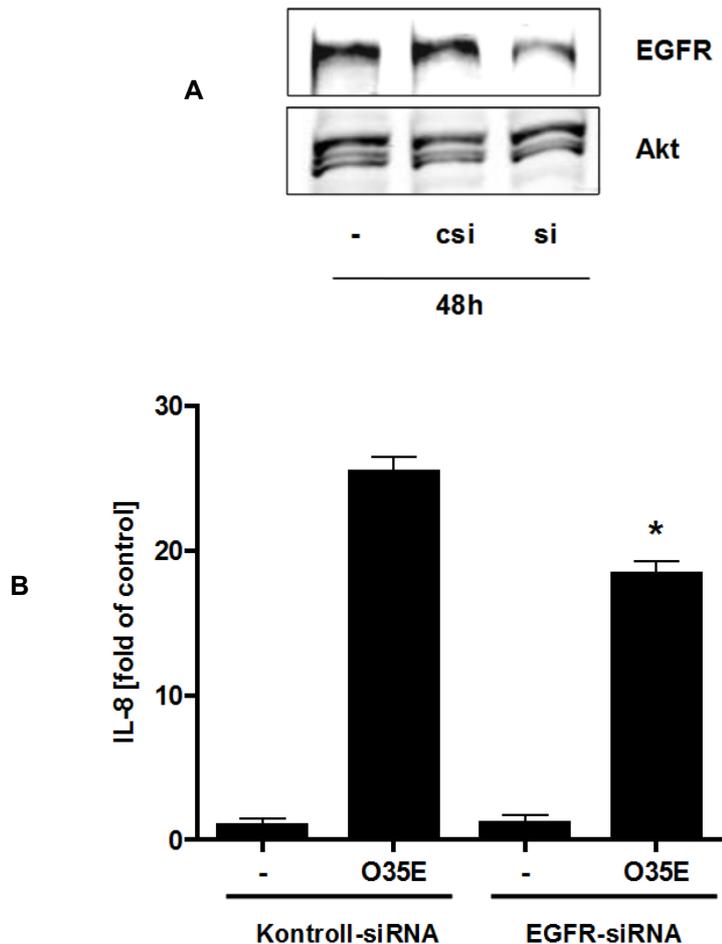


Abb. 9. Gen-Silencing des EGFR senkt die *M. catarrhalis*-induzierte Sekretion von IL-8

A. A549-Zellen wurden mit EGFR-siRNA (si) oder einer Kontroll-siRNA (csi) transfiziert. Untransfizierte Zellen sind mit (-) gekennzeichnet. Nach 48h wurden in den Lysaten mittels Western Blot EGFR-Protein nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von Akt-Protein. Die Abbildung zeigt eine Hybrid-ECL-Membran mit den entsprechenden Protein-Banden. Zu erkennen ist eine verminderte Expression von EGFR-Protein in den mit siRNA transfizierten Zellen nach 48h.

B. A549-Zellen wurden mit EGFR-siRNA (si) oder einer Kontroll-siRNA (csi) transfiziert. Im entsprechenden Ansatz erfolgte 24-48 h nach der Transfektion eine Infektion mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E (10^8 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 16 h. Nach Versuchsende wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf den Gehalt von IL-8 untersucht. Zu sehen ist eine Verminderung der Sekretion von IL-8 bei den mit EGFR-siRNA transfizierten Zellen. Die Versuche wurden jeweils mit doppelten Ansätzen durchgeführt. Die Werte für IL-8 sind als ein Vielfaches des Leerwertes (engl.: *fold of control*) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Die Sternmarkierung (*) bedeutet, dass die Verminderung der Sekretion von IL-8 durch das Gen-Silencing des EGFR signifikant ist ($p < 0,05$). Die Abbildung stellt die Zusammenfassung von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

3.6 Die *Moraxella catarrhalis*-induzierte Aktivierung von ERK1/2 ist EGFR-abhängig

Die *M. catarrhalis*-induzierte Sekretion von IL-8 ist abhängig von einer Aktivierung von ERK1/2 (Slevogt et al. 2006). Dieses Ergebnis konnte ich auf der Ebene der Genexpression mittels RT-PCR bestätigen (Abb.10). EGFR ist ein wichtiger ERK1/2-Aktivator

(Oda et al. 2005). Inwieweit die Aktivierung des EGFR für die *M. catarrhalis*-induzierte Aktivierung von ERK1/2 eine Rolle spielt, sollte in dem nächsten Versuch untersucht werden. Dazu habe ich Beas-2B-Zellen mit *M. catarrhalis* infiziert. Vergleichend wurden einige Ansätze mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot phosphoryliertes ERK1/2 nachgewiesen. Wie in Abb. 11 dargestellt, zeigte sich, dass eine Inhibition des EGFR deutlich die *M. catarrhalis*-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 vermindert. Eine Verminderung der ERK1/2-Phosphorylierung führt zu einer verminderten Genexpression von IL-8 (Abb. 10). Somit ist die Schlussfolgerung, dass eine Infektion von Beas-2B mit *Moraxella catarrhalis* den EGFR/ERK1/2-Signalweg aktiviert, welches zur Genexpression und Sekretion von IL-8 führt.

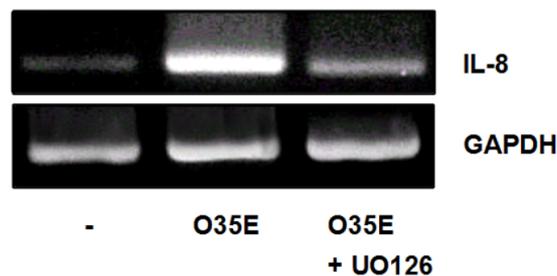


Abb. 10. Die Inhibition von ERK1/2 senkt die *M. catarrhalis*-induzierte Genexpression von IL-8

Beas-2B-Zellen wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^6 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 12 h. Im entsprechenden Ansatz erfolgte 2 h vor der Infektion eine Vorinkubation mit dem ERK1/2-Inhibitor U0126 ($30 \mu\text{M}$). In den Lysaten wurde mittels RT-PCR IL-8-mRNA nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH-mRNA. Die Abbildung zeigt ein Agarose-Gel mit den entsprechenden DNA-Banden. Zu sehen ist eine deutliche Inhibition der Genexpression von IL-8 durch den ERK1/2-Inhibitor U0126. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

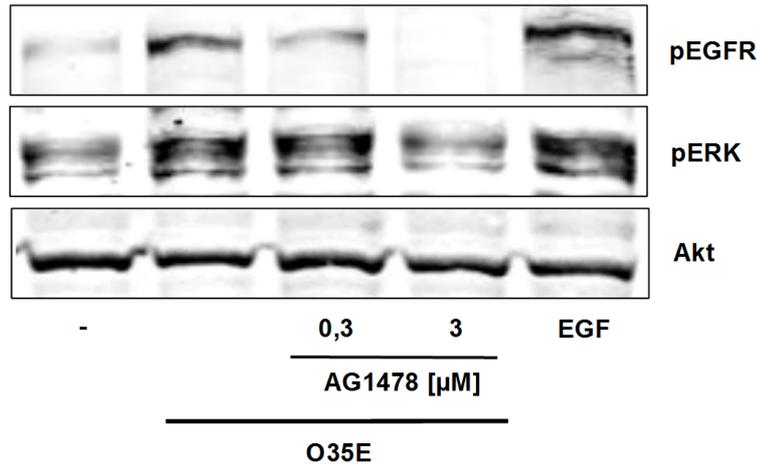


Abb. 11. Die Inhibition des EGFR vermindert die *M. catarrhalis*-induzierte Aktivierung von ERK1/2

Beas-2B-Zellen wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^8 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 2 h. Im entsprechenden Ansatz erfolgte 2 h vor der Infektion eine Vorinkubation mit dem EGFR-Inhibitor AG1478. Als Positivkontrolle für die Stimulation diente EGF (100 ng/ml). In den Lysaten wurde mittels Western Blot phosphoryliertes ERK1/2-Protein nachgewiesen (pERK). Zur Inhibitionskontrolle erfolgte der Nachweis von phosphoryliertem EGFR-Protein (pEGFR). Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von Akt-Protein. Die Abbildung zeigt eine Hybond-ECL-Membran mit den entsprechenden Protein-Banden. Zu erkennen ist, dass die Inhibition des EGFR die *M. catarrhalis*-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 vermindert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.7 Die Inhibition des EGFR bzw. ERK1/2 senkt die *Moraxella-catarrhalis*-induzierte Aktivierung von NF- κ B

Die *M. catarrhalis*-induzierte Sekretion von IL-8 ist abhängig von einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Slevogt et al. 2006). Daher habe ich in einem nächsten Schritt untersucht, ob die Inhibition des EGFR bzw. ERK1/2 die *M. catarrhalis*-induzierte Aktivierung von NF- κ B vermindern kann. Dazu habe ich mit einem NF- κ B-Luziferase-Gen (pNF- κ B-*Luc*) stabil transfizierte A549-Zellen in den entsprechenden Ansätzen mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 bzw. mit dem ERK1/2-Inhibitor U0126 vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *M. catarrhalis*. Nach Versuchsende wurde die Luziferase-Aktivität in den Zelllysaten durch einen Biolumineszenzassay nachgewiesen. Die Ergebnisse in Abb. 12 zeigen, dass die die Inhibition von EGFR bzw. ERK1/2 die *Moraxella catarrhalis*-induzierte Aktivierung von NF- κ B senkt.

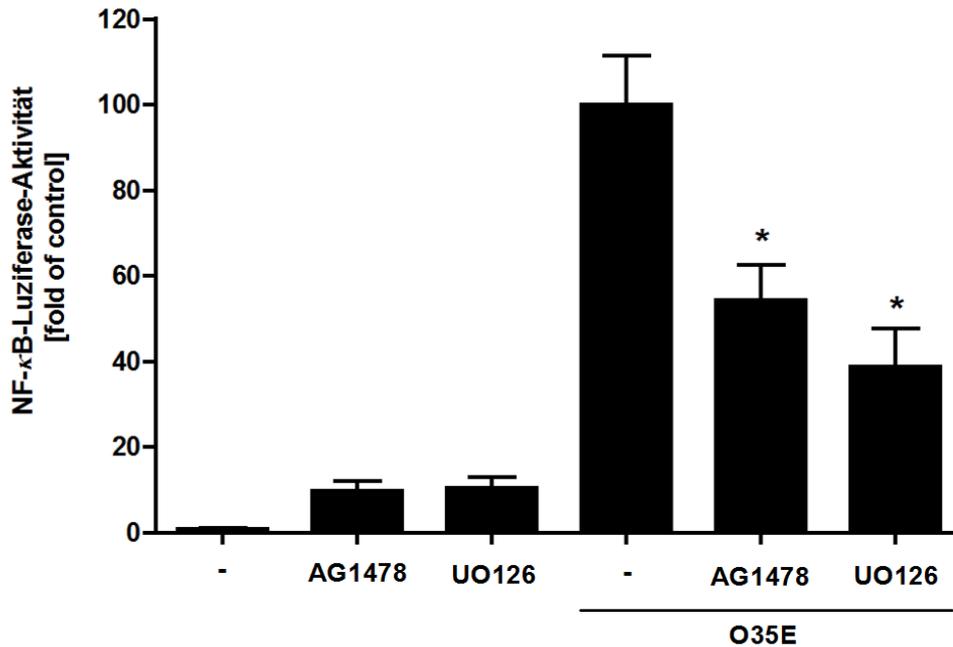


Abb. 12. Die Inhibition von EGFR bzw. ERK1/2 senkt die *Moraxella-catarrhalis*-induzierte Aktivierung von NF-κB

Die mit NF-κB-Luziferase stabil transfizierten A549-Zellen wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^7 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 5 h. Im entsprechenden Ansatz erfolgte vor der Infektion für 1 h eine Vorinkubation mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 ($3\mu\text{M}$) bzw. mit dem ERK1/2-Inhibitor U0126 ($10\mu\text{M}$). Nach Versuchsende wurde die Luziferase-Aktivität in den Zellysaten durch einen Biolumineszenzassay nachgewiesen. Jeder Versuch wurde mit doppelten Ansätzen durchgeführt. Die Werte für die NF-κB-Luziferase-Aktivität sind als ein Vielfaches des Leerwertes (engl.: *fold of control*) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Zu sehen ist eine Verminderung der NF-κB-Luziferase-Aktivität bei den mit EGFR- oder ERK1/2-Inhibitor behandelten Zellen. Die Sternmarkierung (*) bedeutet, dass die Verminderung der NF-κB-Luziferase-Aktivität durch AG1478 oder U0126 signifikant ist ($p < 0,05$). Die Abbildung stellt die Zusammenfassung von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

3.8 Die Inhibition des EGFR vermindert die Bindung von NF-κB an den IL-8-Promotor

Um nachzuweisen, dass die Inhibition des EGFR die Bindung von NF-κB an die IL-8-Promotorregion vermindert, habe ich einen Chromatin-Immunopräzipitations-Assay (ChIP) durchgeführt. Dazu habe ich Beas-2B-Zellen mit *M. catarrhalis* infiziert. In den entsprechenden Ansätzen erfolgte eine Vorinkubation mit dem EGFR-Inhibitor AG1478. Die Ergebnisse in Abb. 13 zeigen, dass die Inhibition des EGFR zu einer verminderten Bindung der NF-κB-Untereinheit p65 an den IL-8-Promotor führt.

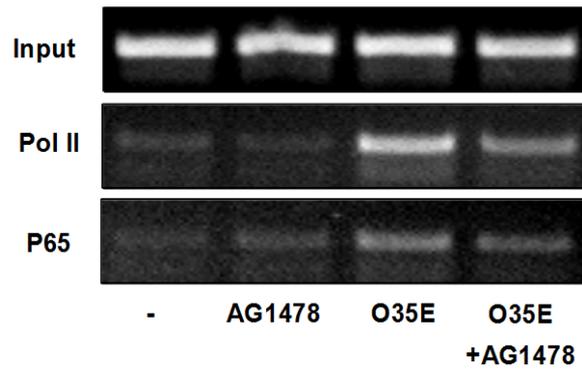


Abb. 13. Die Inhibition des EGFR vermindert die Bindung von NF- κ B an den IL-8-Promotor

Beas-2B-Zellen wurden mit *Moraxella catarrhalis*-Wildtypstamm O35E infiziert (10^8 CFU/ml). Die Infektionsdauer betrug 4 h. In den entsprechenden Ansätzen erfolgte 2 h vor der Infektion eine Vorinkubation mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 ($3\mu\text{M}$). Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und lysiert. Die DNA-Abschnitte, an denen die NF- κ B-Untereinheit p65 und die RNA-Polymerase II (Pol II) gebunden waren, wurden jeweils durch Chromatin-Immunopräzipitation aufgereinigt. Anschließend wurde der DNA-Abschnitt der IL-8-Promotorregion in einer ChIP-PCR amplifiziert. Die Abbildung zeigt ein Agarose-Gel mit den entsprechenden DNA-Banden. Die Bindung der RNA-Polymerase II an die Promotorregion diente als Kontrolle zum Nachweis der eingeleiteten Transkription. Die Amplifikation der Promotorregion in der Gesamt-DNA-Fraktion (Input) erfolgte zum Nachweis des Einsatzes identischer DNA-Mengen. Zu sehen ist, dass die Inhibition des EGFR die Bindung von p65 an den IL-8-Promotor vermindert. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

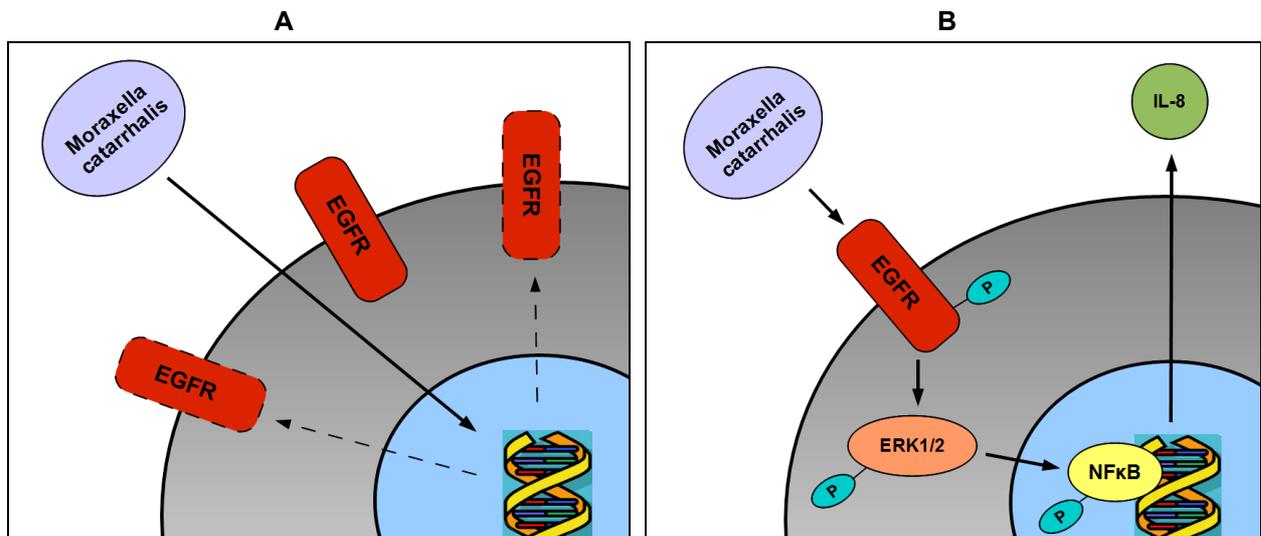


Abb. 14. Zusammenfassung der Ergebnisse

A. Die Infektion von Lungenepithelzellen mit *Moraxella catarrhalis* führt zu einer vermehrten Expression des EGFR.

B. Die Infektion mit *M. catarrhalis* führt über eine Aktivierung von EGFR/ERK1/2 und NF-κB zu einer Steigerung der Genexpression und Sekretion von IL-8.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* in Atemwegsepithelzellen eine erhöhte Expression und Aktivierung des EGFR verursacht. Über einen EGFR/ERK/NF-κB-abhängigen Signalweg wird die Produktion von proinflammatorischem IL-8 induziert.

4 Diskussion

4.1 Die *Moraxella catarrhalis*-induzierte Verstärkung der EGFR-Expression

In dieser Arbeit konnte ich nachweisen, dass eine Infektion von Atemwegsepithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer vermehrten Expression des EGFR führt (siehe Kapitel 3.2). Es gibt wenige Studien, die über eine Induktion der EGFR-Expression durch bakterielle oder virale Erreger berichten.

Maciorkowska et al. konnten eine signifikant erhöhte EGFR-Expression in epithelialen und glandulären Zellen in Magenschleimhautbiopsien von Kindern mit *Helicobacter pylori*-Infektion nachweisen (Maciorkowska et al. 2009). Keates et al. berichteten ebenfalls über eine Erhöhung der EGFR-Expression in gastrischen Epithelzellen bei *Helicobacter pylori*-Infektion *in vitro* (Keates et al. 2007). Bei einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus Typ 16 in Keratinozyten wiesen Akerman et al. eine Erhöhung der EGFR-Expression nach (Akerman et al. 2001).

Es stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus *M. catarrhalis* die EGFR-Expression erhöhen kann. Hsieh et al. fanden heraus, dass die EGFR-Expression über NF- κ B und den ERK/AP-1-Signalweg reguliert wird (Hsieh et al. 2008). EGFR ist ein Haupt-Aktivator von ERK (Oda et al. 2005). Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass *M. catarrhalis* EGFR, ERK und NF- κ B deutlich aktiviert. Wahrscheinlich wird über diese Wege auch die Erhöhung der EGFR-Expression durch *M. catarrhalis* induziert.

In gastrischen Epithelzellen ist nachgewiesen, dass eine Stimulation mit IL-8 zu einer Erhöhung der EGFR-Expression führt (Beswick & Reyes 2008). *M. catarrhalis* induziert eine deutliche IL-8 Sekretion (Slevogt et al. 2006). Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich für die *M. catarrhalis*-induzierte Erhöhung der EGFR-Expression mitverantwortlich.

Es ist belegt, dass die EGFR-Expression bei Patienten mit COPD erhöht ist (Burgel & Nadel 2008). Bisher konnte nicht gezeigt werden, wodurch diese vermehrte Expression zustande kommt. Da *M. catarrhalis* in COPD-Patienten Kolonisationsraten von bis zu 32% aufweist (Murphy 07/2005), ist es denkbar, dass *M. catarrhalis* zumindest mitverantwortlich ist für eine erhöhte EGFR-Expression in der COPD. Möglicherweise können auch andere kolonisierende bakterielle Erreger wie *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* die Expression des EGFR beeinflussen. In weiterführenden Stu-

dien sollte daher ein breiteres Erregerspektrum daraufhin untersucht werden, ob eine Kolonisierung oder Infektion mit diesen Erregern eine Erhöhung der EGFR-Expression verursacht.

4.2 Die Aktivierung des EGFR

EGFR reguliert zellproliferative, zellregenerative und mit zunehmenden Nachweis auch immunologische Prozesse (Edwin et al. 2006, Burgel & Nadel 2008). Meine Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion von Lungenepithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer Aktivierung des EGFR führt (siehe Kapitel 3.3). Diese ist als Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase nachweisbar. Von verschiedenen Autoren wird über eine Aktivierung des EGFR durch bakterielle oder virale Erreger berichtet (Koff et al. 2006, Keates et al. 2005, Monick et al. 2005).

Noch ist unklar, über welchen Mechanismus *M. catarrhalis* EGFR aktiviert. Wang et al. beschrieben 2003, dass EGFR als direkter Rezeptor für den humanen Cytomegalievirus (HCMV) dient (Wang et al. 2003). Sie konnten nachweisen, dass ein Glykoprotein der Virus-Hülle an EGFR bindet und den Rezeptor aktiviert. Solch eine Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass EGFR Eigenschaften eines mustererkennenden Rezeptors (PRR) der angeborenen Immunabwehr haben könnte. Diesen einzigartigen Betrachtungen wurde jedoch einige Jahre später widersprochen. Isaacson et al. konnten keine Aktivierung des EGFR durch HCMV feststellen. Ihren Ergebnissen nach spielt EGFR für den Zelleintritt und die Signalübermittlung durch HCMV keine signifikante Rolle (Isaacson 2007). Die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, dass *M. catarrhalis* direkt EGFR binden und aktivieren kann. Jedoch gibt es hierfür bisher keine Hinweise.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* TLR2 und TLR4 in Atemwegsepithelzellen aktiviert (Slevogt 2007). Koff et al. wiesen nach, dass EGFR über mehrere TLR transaktiviert werden kann. Die Transaktivierung erfolgt über eine autokrine Freisetzung des EGFR-Liganden TGF- α durch die aktivierte Metalloprotease TACE (Koff et al. 2008). Liu et al. beschrieben ebenfalls eine Transaktivierung des EGFR über TLR2 und TLR4 in der Bronchialepithelzelllinie Beas-2B (Liu et al. 09/2008). Es ist wahrscheinlich, dass die Aktivierung des EGFR durch *M. catarrhalis* zumindest teilweise über eine Transaktivierung durch TLR-abhängige Signalwege verläuft.

Laut einer Studie von Beswick & Reyes kann eine Stimulation mit IL-8 zur Aktivierung des EGFR führen (Beswick & Reyes 2008). Da eine Infektion mit *M. catarrhalis* zu einer deutlichen IL-8-Sekretion führt, ist es denkbar, dass sekretiertes IL-8 die EGFR-Aktivierung mitbedingt.

4.3 Die Aktivierung des EGFR/ERK-Signalweges

Slevogt et al. publizierten, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* in Lungenepithelzellen zu einer Aktivierung von ERK1/2 führt (Slevogt et al. 2006). Bisher war jedoch nicht bekannt, über welche Signalwege die ERK1/2-Aktivierung eingeleitet wird. Meine Ergebnisse zeigen, dass die von *M. catarrhalis* verursachte Aktivierung des EGFR für eine deutliche ERK1/2-Aktivierung verantwortlich ist, welches zur Expression von IL-8 führt (siehe Kapitel 3.6). EGFR ist als ERK1/2-Aktivator bekannt (Oda et al. 2005). In einigen Studien konnte ebenfalls eine Aktivierung des EGFR/ERK-Signalweges im Zusammenhang mit einer Infektion durch bakterielle oder virale Erreger nachgewiesen werden. Vielfältige immunologischen Zellantworten werden durch EGFR/ERK-Aktivierung eingeleitet: COX2-Expression bei HCMV-Infektion (Yi et al. 2009); hBD3 (humanes Beta-Defensin 3)-Expression bei *Helicobacter pylori*-Infektion (Boughan et al. 2006); IL-8 Sekretion bei RSV-Infektion (Monick et al. 2005); IL-8 und ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) bei Rhinovirus-Infektion (Liu et al. 04/2008).

Die Erregerelimination durch mukoziliäre Clearance ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr der Lunge. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass in einer Infektion mit Rhinoviren auch die Mucin-Produktion von MUC5AC, einem Hauptbestandteil des mukösen Sekrets, durch die Aktivierung von EGFR/ERK induziert wird (Zhu et al. 2009).

Diese vermehrten Hinweise zeigen, dass die Aktivierung des EGFR/ERK-Signalweges in der angeborenen Immunabwehr möglicherweise eine bedeutendere Rolle spielt, als bisher angenommen.

4.4 EGFR als Regulator der IL-8-Expression

In meinen Untersuchungen konnte ich nachweisen, dass die *M. catarrhalis*-induzierte IL-8-Sekretion von der Expression und Aktivierung des EGFR abhängig ist (siehe Kapitel 3.4 und 3.5). Es gibt einige Studien, die zeigen, dass eine EGFR-Aktivierung in Atemwegsepithelzellen zu einer erhöhten IL-8-Sekretion führt. Subauste & Proud konnten dies zuerst nachweisen (Subauste & Proud 2001). In ihren Versuchen stimulierten sie Beas-2B-Zellen mit EGF. Richter et al. zeigten, dass auch Zigarettenrauch EGFR aktivieren kann, welches zu einer IL-8-Sekretion führte (Richter et al 2002). Liu et al. untersuchten die IL-8-Sekretion in Verbindung mit einer Infektion des Rhinovirus RV16. Sie konnten feststellen, dass die Inhibition des EGFR die IL-8-Sekretion vermindern kann (Liu et al. 04/2008). Monick et al. wiesen nach, dass die vom respiratorischen Synzytialvirus (RSV) verursachte IL-8-Sekretion durch Gen-Silencing des EGFR gesenkt wird (Monick et al. 2005). In einer Untersuchung von Bronchialbiopsien von Patienten mit schwerem Asthma konnten Hamilton et al. feststellen, dass die IL-8-Sekretion mit der EGFR-Expression positiv korreliert ist (Hamilton et al. 2003). Es gibt somit einige Hinweise dafür, dass EGFR ein wichtiger Regulator von IL-8 ist und somit in der proinflammatorischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt.

4.5 EGFR reguliert die Aktivierung von NF- κ B über ERK

Eine chronische Entzündung der Atemwege ist ein charakteristisches Merkmal der COPD (Rabe et al. 2007). NF- κ B kommt dabei eine Schlüsselrolle in der Regulation zahlreicher proinflammatorischer Entzündungsmediatoren wie TNF α , Interleukine und Cyclooxygenasen zu (Ghosh & Karin 2002). Di Stefano et al. untersuchten die Expression und Lokalisation der NF- κ B Untereinheit p65 in Bronchialbiopsien (Di Stefano et al. 2002). Sie konnten nachweisen, dass in der COPD die Höhe der Expression von p65 mit der Schwere der Erkrankung positiv korreliert ist. Für die hauptsächlich in der COPD zu Exazerbationen und Kolonisationen führenden Pathogene *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* ist nachgewiesen, dass sie NF- κ B aktivieren (Shuto et al. 2001, Schmeck et al. 2004, Slevogt et al. 2006).

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von NF- κ B unter anderem über den EGFR/ERK-Signalweg verläuft. Ich konnte EGFR als wichtigen ERK-Aktivator identifizieren (siehe Kapitel 3.6) und anschließend nachweisen, dass die Inhibition von EGFR

und ERK zu einer Verminderung von DNA-bindendem NF- κ B führt (siehe Kapitel 3.7). Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung durch ERK ist eine ERK-abhängige Aktivierung der IKK (I κ B-Kinase) (Chun et al. 2003). NF- κ B wird im Zytoplasma durch eine Komplex-Bildung mit I κ B α (Inhibitor von κ B α) in einem inaktivem Zustand gehalten. Durch die Phosphorylierung von I κ B α durch IKK kommt es zu einer Degradation des inhibitorischen Komplexes. Das nun aktive NF- κ B transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor (Karin & Ben-Neriah 2000).

NF- κ B gehört zu den hauptsächlichen Transkriptionsfaktoren, durch welche die Transkription des IL-8-Gens reguliert wird (Hoffmann et al. 2002). Slevogt et al. zeigten, dass die von *M. catarrhalis* induzierte IL-8-Sekretion deutlich abhängig ist von der Aktivierung von NF- κ B (Slevogt et al. 2006). In der vorliegenden Studie konnte ich nachweisen, dass die Inhibition des EGFR die Bindung von NF- κ B (p65) und RNA-Polymerase II an den IL-8-Promotor vermindert und somit EGFR als Regulator der NF- κ B-vermittelten IL-8-Expression identifizieren (siehe Kapitel 3.8). Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die von *M. catarrhalis* induzierte IL-8-Expression über einen EGFR/ERK/NF- κ B-abhängigen Mechanismus reguliert wird, wie ich es in Abb. 14 B grafisch dargestellt habe (siehe Kapitel 3.9).

4.6 Mögliche Bedeutung einer *M. catarrhalis*-induzierten EGFR-Aktivierung für die Pathogenese und Progression der COPD

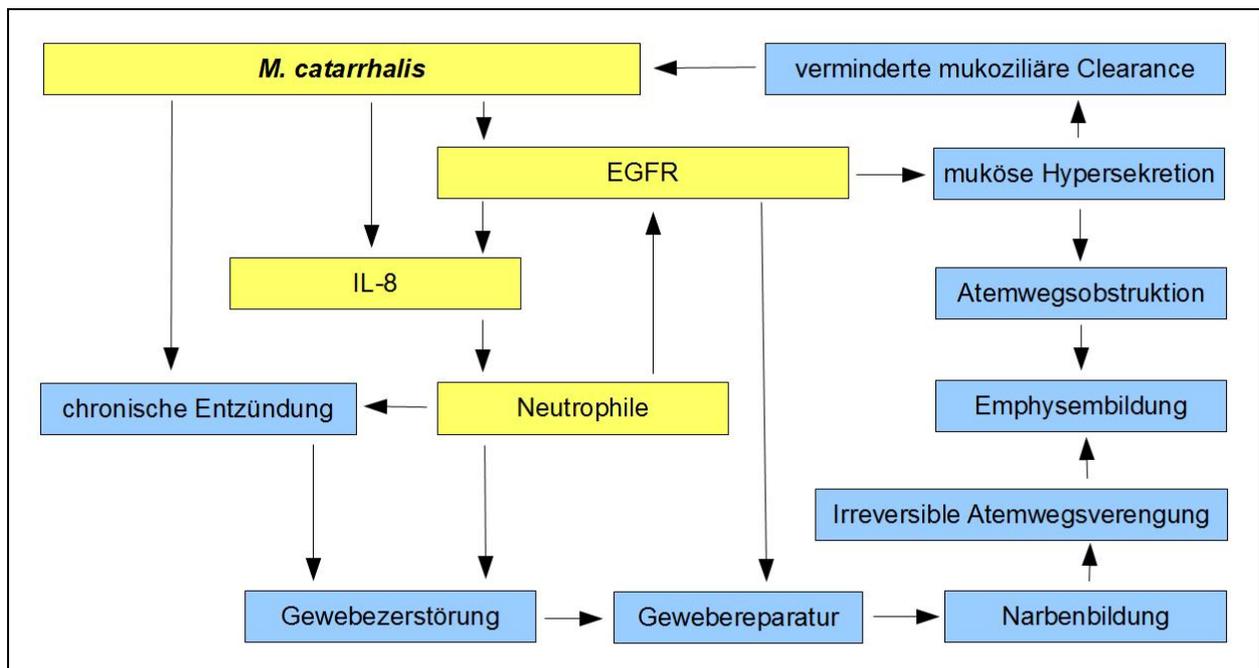


Abb. 15. Mögliche Bedeutung einer Infektion mit *M. catarrhalis* und einer *M. catarrhalis*-induzierten EGFR-Aktivierung für die Pathogenese und Progression der COPD.

Möglicherweise führt *M. catarrhalis* in der COPD u.a. über die Aktivierung des EGFR sowohl zu einer Induzierung proinflammatorischer und zellregenerativer Prozesse als auch zu einer mukösen Hypersekretion, welche zur Pathogenese und Progression der COPD beitragen können.

Im Folgenden stelle ich nun anhand meiner eigenen Ergebnisse und der schon in den vorherigen Kapiteln und der Einleitung besprochenen Arbeiten anderer Autoren dar, welche mögliche Bedeutung eine Infektion mit *M. catarrhalis* und eine *M. catarrhalis*-induzierte EGFR-Aktivierung für die Pathogenese und Progression der COPD haben könnte (siehe Abb. 15).

Eine Infektion mit *M. catarrhalis* führt zu einer Entzündungsreaktion von Atemwegsepithelzellen (Slevogt et al. 2006). Bei einer Kolonisation der unteren Atemwege mit *M. catarrhalis* ist von einer chronischen Entzündungsreaktion des Atemwegsepithels auszugehen. *M. catarrhalis* induziert eine Ausschüttung verschiedener Entzündungsmediatoren, u. a. IL-8. Zudem erhöht *M. catarrhalis* die Expression des EGFR und ist in der Lage diesen Rezeptor zu aktivieren. Eine erhöhte Expression und Aktivierung des EGFR führt zu einer Sekretion von IL-8, zu vermehrten Gewebereparaturprozessen und

wahrscheinlich zu muköser Hypersekretion (Burgel & Nadel 2008). IL-8 induziert die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, welche zur chronischen Entzündung und in diesem Rahmen auch zur Gewebeerstörung durch Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies beitragen (Mizgerd 2008). Neutrophile aktivieren zudem EGFR (Kim & Nadel 2004). Durch vermehrte Zerstörungs- und Reparaturprozesse kommt es zu einer Narben- und Strikturbildung, welches zur irreversiblen Atemwegseinengung mit konsekutiver Emphysembildung führt. Die möglicherweise durch erhöhte EGFR-Expression und EGFR-Aktivierung verursachte muköse Hypersekretion steht im Verdacht zu Atemwegsobstruktion und folglich Emphysembildung beizutragen (Burgel & Nadel 2008). Jedoch wird durch eine muköse Hypersekretion auch die mukoziliäre Clearance, d.h. der Abtransport von Erregern und Schadstoffen vermindert, welches zur besseren Persistenz von Erregern wie *M. catarrhalis* führen kann.

Zu einem gewissen Maße deckt sich meine Darstellung mit der *circulus vitiosus*-Hypothese zur Pathogenese und Progression der COPD von Sethi und Murphy (siehe Einleitung Kapitel 1.1.4.1., Sethi & Murphy 2008). Ich erweitere jedoch diese Hypothese aufgrund meiner Forschungsergebnisse durch die Betrachtung der Bedeutung der EGFR-Aktivierung, welche durch den COPD-assoziierten Erreger *M. catarrhalis in vitro* verursacht wird. Damit verbinde ich sowohl die Hypothesen der Beteiligung des EGFR (u. a. Burgel & Nadel 2008) als auch die Hypothesen der Beteiligung bakterieller Erreger an der Pathogenese und Progression der COPD und bringe sie in einen Zusammenhang.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einbeziehung der induzierten EGFR-Aktivität die Hypothese der Beteiligung bakterieller Erreger an der Pathogenese und Progression der COPD am Beispiel von *M. catarrhalis* stärkt.

4.7 Mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer COPD-Therapien

4.7.1 Derzeitige Therapieleitlinien

Zu den Therapieoptionen bei COPD zählen laut den aktuellen Leitlinien der deutschen Atemwegsliga (Deutsche Atemwegsliga 2007) die Prävention, die nicht-medikamentöse Behandlung, die medikamentöse Behandlung, die apparative und die operative Behandlung.

Zur Prävention zählen die Raucherentwöhnung, bei beruflichen Noxen die Arbeitsplatzhygiene und Schutzimpfungen gegen Grippe (Influenza) und Pneumokokken. Die nicht-medikamentöse Behandlung umfasst körperliches Training, Diäteeinstellung und physiotherapeutische Maßnahmen. Zur medikamentösen Basis-Therapie werden mit steigendem Schweregrad der Erkrankung zunächst kurzwirksame und in der folgenden Stufe kurz- und langwirksame Bronchodilatoren wie Beta-2-Sympathomimetika, Anticholinergika und ggf. Theophyllin verwendet. Bei höherem Schweregrad und je nach Wirksamkeit der Maßnahme werden inhalative Glukokortikoide eingesetzt. In Exazerbationen kommen zur Entzündungshemmung auch orale/i.v. Glukokortikoide zum Einsatz, welche jedoch für eine Langzeittherapie nicht empfohlen werden. Bei Exazerbationen mit Verdacht auf einen bakteriellen Erreger erfolgt eine antibiotische Therapie.

Zu den apparativen bzw. operativen Behandlungsoptionen zählen die Langzeitsauerstofftherapie bei chronischer Hypoxämie, die nicht-invasive Beatmung, chirurgische Maßnahmen der Emphysemchirurgie und in seltenen Fällen die Lungentransplantation.

4.7.2 Die Suche nach neuen Therapiestrategien

Die Progression der COPD ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung einhergehend mit einem zunehmenden *remodeling* der Atemwege, welche eine fortschreitende Einschränkung des Atemflusses zur Folge haben (Rabe et al. 2007).

In der medikamentösen Langzeittherapie ist bislang weder für Bronchodilatoren noch für inhalative Glukokortikoide eine Verbesserung der Prognose nachzuweisen (Deutsche Atemwegsliga 2007). In der COPD ist eine Glukokortikoid-Resistenz zu beobachten, so dass die anti-inflammatorische Wirkung der Glukokortikoide nur gering ist (Barnes 2010). In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass inhalative Glukokortikoide nicht die Progression der COPD verzögern (Blease & Raymon 2003).

Die Suche nach neuen Therapiestrategien richtet sich besonders darauf, chronische Entzündung und *remodeling* der Atemwege vermindern zu können. Gegenstand der Forschung sind Substanzen, die inflammatorische Cytokine, Chemokine und Proteasen in ihrer Expression und Wirksamkeit hemmen (Yao et al. 2008).

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass der COPD-assoziierte Erreger *M. catarrhalis* in pulmonalem Epithel über EGFR-, ERK- und NF- κ B-abhängige Signalwege eine Sekretion von proinflammatorischem IL-8 verursacht. Hier bieten sich mehrere Ansatzpunkte zu einer therapeutischen Intervention.

4.7.2.1 Schutzimpfung gegen *M. catarrhalis*

Eine Infektion mit *M. catarrhalis* könnte durch eine geeignete Schutzimpfung verhindert werden. Von einem Vakzin könnten nicht nur COPD-Patienten profitieren sondern auch Otitis media-Infektionen bei Kindern verhindert werden. Es wurden viele Antigene von *M. catarrhalis* identifiziert und als Vakzin-Kandidaten diskutiert. Die Entwicklung eines Impfstoffes gestaltet sich jedoch schwierig, da *M. catarrhalis* ein ausschließlich humanpathogener Erreger ist. Es gibt kein geeignetes Tiermodell für die Forschung *in vivo* (Murphy & Parameswaran 2009, Tan & Riesbeck 2007).

4.7.2.2 IL-8-Inhibitoren

Inhibitoren von IL-8-Rezeptoren wie der CXCR2-Inhibitor SB 225002 blockieren die IL-8-vermittelte Chemotaxis von Neutrophilen in Tiermodellen (Barnes 2008). In einer kürzlich veröffentlichten klinischen Studie von Holz et al. konnte nachgewiesen werden, dass der CXCR2-Inhibitor SCH527123 in einer Ozon-induzierten Immunantwort die Sputumkonzentration von Neutrophilen deutlich senken konnte (Holz et al. 2010). Die Behandlung erfolgte mit einer einmal täglichen Einnahme von 50 mg des Inhibitors p.o. über 4 Tage und war gut verträglich. Derzeit laufen weitere klinische Studien mit CXCR2-Antagonisten in der Therapie von COPD, Asthma und cystischer Fibrose (Chapman 2009).

4.7.2.3 IKK-Inhibitoren

I κ B-Kinasen regulieren die Freisetzung von aktivem NF- κ B. Es gibt mehrere IKK-Inhibitoren mit denen in Tierstudien erfolgreich inflammatorische Prozesse vermindert werden konnten (Adcock et al. 2006). Eine Studie von Ziegelbauer et al. an Mäusen zeigt die Reduktion von Allergen-induzierter Entzündung und Hyperreaktivität der Atemwege durch einen IKK2-Inhibitor. Dieser Inhibitor konnte auch die Migration von Leukozyten

ins Gewebe vermindern, welches u. a. assoziiert war mit einer Reduktion der Transaktivierung von NF- κ B, Chemokin- und Zytokin-Expression (Ziegelbauer et al. 2005). Bisher gibt es jedoch noch keine klinischen Studien mit IKK-Inhibitoren.

4.7.2.4 Inhibitoren der EGFR-Rezeptortyrosinkinase

Mutationen und Überexpression von ErbB-Rezeptoren sind in Tumorerkrankungen vorzufinden. In den 1980ern wurde ein Antikörper gegen Her2/Neu (ErbB2) entwickelt, der heute unter dem Handelsnamen "Herceptin" hilfreich in der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird. Neben solchen monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen ErbB-Rezeptoren sind auch Inhibitoren der EGFR-Rezeptor-Tyrosinkinase Gegenstand der Forschung und klinischen Erprobung (Edwin et al. 2006). *Gefitinib* beispielsweise ist ein EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor, der seit 2009 in Europa zugelassen ist für die Behandlung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome mit aktivierenden EGFR-Mutationen (Europäische Arzneimittelagentur 2009). Die Nebenwirkungen sind jedoch nicht gering. Mehrere Autoren sehen in EGFR-Inhibitoren ein Potential zur Behandlung der mukösen Hypersekretion in verschiedenen Atemwegserkrankungen wie COPD oder Asthma (Adcock 2006, Barnes 2006). Durch EGFR-Inhibition kann jedoch auch die proinflammatorische Immunantwort des Atemwegsepithels vermindert werden, welches die Ergebnisse meiner und auch anderer Arbeiten zeigen (siehe Kapitel 4.4). Bisher gibt es dazu noch keine Untersuchungen *in vivo*. Tendenziell steht EGFR als Regulator für Inflammation in letzter Zeit vermehrt in der Diskussion (Burgel & Nadel 2008, Koff et al. 2008). Möglicherweise bieten EGFR-Inhibitoren eine Therapieoption zur Reduktion von Atemwegs-entzündung in COPD, Asthma oder cystischer Fibrose. Experimentelle Studien z.B. im Mausmodell wären zunächst notwendig, bevor klinische Studien in Erwägung gezogen werden können.

Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist mit weltweit zunehmender Inzidenz eine der größten Herausforderungen in der Gesundheitsfürsorge. Chronische Entzündung in den unteren Atemwegen wird als ein Hauptfaktor für die Pathogenese und Progression der Erkrankung angesehen. *Moraxella catarrhalis* ist ein COPD-assoziiertes Erreger, der Exazerbationen und bakterielle Kolonisierung der unteren Atemwege verursacht, welche im Verdacht steht zu chronischer Entzündung beizutragen. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist in der COPD oft überexprimiert und wird assoziiert mit muköser Hypersekretion, welche zur Atemwegobstruktion beiträgt. In letzter Zeit gibt es vermehrte Hinweise, dass EGFR auch proinflammatorische Prozesse reguliert. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Bedeutung EGFR für die *M. catarrhalis*-induzierte proinflammatorische Immunantwort in Atemwegsepithelzellen hat.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* die Expression und Aktivierung des EGFR induziert. In Versuchen mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 und siRNA wies ich nach, dass die Aktivierung des EGFR für die Produktion des proinflammatorischen IL-8 von großer Bedeutung ist. Mittels Western-Blot stellte ich bei einer Inhibition des EGFR eine Minderung der Aktivierung von ERK fest. Außerdem konnte ich zeigen, dass eine Inhibition von EGFR bzw. ERK jeweils zu einer verminderten DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führte. Durch Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) wies ich eine verminderte Bindung von aktivem NF- κ B an den IL-8-Promotor in AG1478-behandelten Zellen nach.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass eine Infektion mit *Moraxella catarrhalis* in Atemwegsepithelzellen eine erhöhte Expression und Aktivierung des EGFR verursacht. Über einen EGFR/ERK/NF- κ B-abhängigen Signalweg wird die Produktion von proinflammatorischem IL-8 induziert.

Die Inhibition der EGFR-Signalübermittlung in der COPD könnte ein wichtiger Angriffspunkt nicht nur zur Behandlung der mukösen Hypersekretion sondern auch zur Minderung der von bakteriellen Erregern ausgelösten Atemwegsentzündung sein.

Schlagerworte: *Moraxella catarrhalis*, COPD, Infektion, Atemwegsepithelzellen, EGFR, EGFR-Expression, EGFR- Aktivierung, ERK, NF- κ B, IL-8

Dissertation title:

The role of the epidermal growth factor receptor in the *Moraxella catarrhalis*-induced proinflammatory immune response in the pulmonary epithelium.

Summary

Chronic obstructive lung disease (COPD) is a worldwide health care burden with increasing incidence. Chronic lower airway inflammation is considered a major cause for pathogenesis and disease progression. *Moraxella catarrhalis* is a COPD associated pathogen leading to exacerbations and bacterial colonization in the lower airways, which may contribute to chronic inflammation. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is often overexpressed in COPD and is associated with mucous hypersecretion leading to airway obstruction. Increasing evidence reveals EGFR also to be a regulator of inflammatory processes. The goal of this study was to investigate the role of EGFR in the *Moraxella catarrhalis* induced proinflammatory immune response in airway epithelial cells.

The results show, that an infection with *M. catarrhalis* leads to the expression and activation of EGFR. In investigations with the EGFR inhibitor AG1478 and siRNA I could demonstrate, that activation of EGFR is essential for the production of proinflammatory IL-8. Using Western-Blot analysis, I observed a decrease in ERK activation in response to EGFR inhibition. Moreover, I found that inhibition of EGFR or ERK leads to a decrease in DNA binding activity of transcription factor NF- κ B. By chromatin immunoprecipitation (ChIP) I detected reduced binding of active NF- κ B to the IL-8 promotor in AG1478-treated cells.

In conclusion, I could show that an infection of airway epithelial cells with *Moraxella catarrhalis* leads to increased EGFR expression and activation. Via an EGFR/ERK/NF- κ B dependent pathway production of proinflammatory IL-8 is induced.

The inhibition of EGFR signaling in COPD could be an important target not only for treatment of mucous hypersecretion but also to reduce airway inflammation caused by bacterial pathogens.

Keywords: *Moraxella catarrhalis*, COPD, infection, airway epithel cells, EGFR, EGFR expression, EGFR activation, ERK, NF- κ B, IL-8

Abkürzungsverzeichnis

A549	eine humane Alveolarzellkarzinom-Zelllinie
A. bidest	<i>Aqua bidest</i> (zweifach destilliertes Wasser)
AK	Antikörper
Beas-2B	eine humane Bronchialepithelzelllinie
BHI	<i>brain heart infusion</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CFU	<i>colony forming units</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CXCR2	CXC-Chemokin-Rezeptor 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i> (Desoxiribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	<i>ethylenediaminetetra acid</i> (Ethylenediamintetraessigsäure)
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i> (extrazellulär Signal-regulierte Kinase)
ETI	<i>Erythrina</i> Trypsin-Inhibitor
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälber-Serum)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCMV	humanes Cytomegalie-Virus
I κ B	<i>inhibitor of κB</i> (κ B-Inhibitor)
IKK	<i>NF-κB inhibitor kinase</i> (NF- κ B-Inhibitor-Kinase)
IL-8	Interleukin 8
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Verhältnis von Bakterien zu Zellen

mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i> (nukleärer Faktor κ B)
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing protein</i>
OD	optische Dichte
PBEC	<i>primary bronchial epithelial cells</i> (primäre Bronchialepithelzellen)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> (Mustererkennungszepptoren)
RNA	<i>ribonuclein acid</i> (Ribonukleinsäure)
RSV	respiratorisches Synzytialvirus
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
WB	<i>Western Blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp

Literaturverzeichnis

- Adcock IM, Chung KF, Caramori G, Ito K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 8;533(1-3):118-32.
- Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL et al.. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3837-43.
- Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 May 31;120(2-3):76-85.
- Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3546-56. Review.
- Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):183-92.
- Barnes PJ. Novel signal transduction modulators for the treatment of airway diseases. *Pharmacol Ther.* 2006 Jan;109(1-2):238-45.
- Beswick EJ, Reyes VE. Macrophage migration inhibitory factor and interleukin-8 produced by gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* exposure induce expression and activation of the epidermal growth factor receptor. *Infect Immun.* 2008 Jul;76(7):3233-40.
- Blease K, Raymon HK. Small molecule inhibitors of cell signaling: novel future therapeutics for asthma and chronic obstructive pulmonary diseases. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003 May;4(5):544-51. Review.
- Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M et al.. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem.* 2006 Apr 28;281(17):11637-48.
- Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J.* 2008 Oct;32(4):1068-81. Review.

- Burgel PR, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax*. 2007 Feb;62(2):153-61.
- Chapman RW, Phillips JE, Hipkin RW, Curran AK, Lundell D, Fine JS. CXCR2 antagonists for the treatment of pulmonary disease. *Pharmacol Ther*. 2009 Jan;121(1):55-68.
- Chun KS, Keum YS, Han SS, Song YS, Kim SH, Surh YJ. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*. 2003 Sep;24(9):1515-24. Epub 2003 Jul 4.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 2001 Dec;34:50s-59s. Review.
- Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol*. 1965;12, 394–407
- de Boer WI, Hau CM, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Expression of epidermal growth factors and their receptors in the bronchial epithelium of subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol*. 2006 Feb;125(2):184-92.
- Deutsche Atemwegsliga. COPD-Leitlinie 2007. <http://www.atemwegsliga.de/copd.php> (Zugriff am 07.07.10)
- Di Stefano A, Caramori G, Oates T et al.. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002 Sep;20(3):556-63.
- Di Stefano A, Capelli A, Donner CF. Role of interleukin-8 in the pathogenesis and treatment of COPD. *Chest*. 2004 Sep;126(3):676-8.
- Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J et al.. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005 Apr;60(4):293-300.
- Edwin F, Wiepz GJ, Singh R et al.. A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol Biol*. 2006;327:1-24. Review.

- Europäische Arzneimittelagentur. Iressa/Gefitinib. Zusammenfassung des Europäischen Öffentlichen Beurteilungsberichts (EPAR) für die Öffentlichkeit. Letzte Aktualisierung 05/2009.
- <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/iressa/H-1016-de1.pdf> (Zugriff am 09.07.2010)
- Evans CM, Koo JS. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol Ther.* 2009 Mar;121(3):332-48. Epub 2008 Nov 18. Review.
- Frosch P, Kollé W. Die Mikrokokken. In: Flugge C (ed). *Die Mikroorganismen*. Leipzig, Deutschland, Verlag von Vogel. 1896;154-155
- Gensch E, Gallup M, Sucher A et al.. Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J Biol Chem.* 2004 Sep 10;279(37):39085-93.
- Ghon A, Pfeiffer H. Der *Micrococcus catarrhalis* (R. Pfeiffer) als Krankheitserreger. *Z Klin Med* 1902;44:263-81
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S81-96. Review.
- GOLD (Global initiative for chronic obstructive lung disease). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated 2009. <http://www.goldcopd.org> (Zugriff am 26.03.10)
- Hamilton LM, Torres-Lozano C, Puddicombe SM et al.. The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003 Feb;33(2):233-40.
- Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6. Review.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002 Nov;72(5):847-55. Review.
- Holz O, Khalilieh S, Ludwig-Sengpiel A et al.. SCH527123, a novel CXCR2 antagonist, inhibits ozone-induced neutrophilia in healthy subjects. *Eur Respir J.* 2010 Mar;35(3):564-70.

- Hsieh HL, Sun CC, Wu CB et al.. Sphingosine 1-phosphate induces EGFR expression via Akt/NF-kappaB and ERK/AP-1 pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 2008 Apr 15;103(6):1732-46.
- Hughes DT, Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Feb;6(2):111-20. Review.
- Isaacson MK, Feire AL, Compton T. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol.* 2007 Jun;81(12):6241-7. Epub 2007 Apr 11.
- Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30;1754(1-2):253-62.
- Karalus R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect.* 2000 Apr;2(5):547-59. Review.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63. Review.
- Keates S, Keates AC, Nath S, Peek RM Jr, Kelly CP. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by cag+ *Helicobacter pylori* induces upregulation of the early growth response gene Egr-1 in gastric epithelial cells. *Gut.* 2005 Oct;54(10):1363-9.
- Keates S, Keates AC, Katchar K, Peek RM Jr, Kelly CP. *Helicobacter pylori* induces up-regulation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Infect Dis.* 2007 Jul 1;196(1):95-103.
- Kim S, Nadel JA. Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy. *Treat Respir Med.* 2004;3(3):147-59. Review.
- Koff JL, Shao MX, Kim S, Ueki IF, Nadel JA. *Pseudomonas* lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8693-700.

- Koff JL, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Jun;294(6):L1068-75
- Levi-Montalcini R., Cohen S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann. NY Acad. Sci.* 1960;**85**, 324–341.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976 Jan 15;17(1):62-70.
- Liu K, Gualano RC, Hibbs ML, Anderson GP, Bozinovski S. Epidermal growth factor receptor signaling to Erk1/2 and STATs control the intensity of the epithelial inflammatory responses to rhinovirus infection. *J Biol Chem*. 2008 Apr 11;283(15):9977-85.
- Liu K, Anderson GP, Bozinovski S. DNA vector augments inflammation in epithelial cells via EGFR-dependent regulation of TLR4 and TLR2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Sep;39(3):305-11.
- Maciorkowska E, Guzińska-Ustymowicz K, Ryszczuk E, Kemon A, Kaczmarek M. The EGFR expression in gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*. *Adv Med Sci*. 2009;54(2):187-93.
- Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14;358(7):716-27. Review.
- Monick MM, Cameron K, Staber J et al.. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. *J Biol Chem*. 2005 Jan 21;280(3):2147-58.
- Murphy TF, Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis*. 2009 Jul 1;49(1):124-31. Review.
- Murphy TF. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Jun;19(3):225-30. Review.

- Murphy TF, Brauer AL, Grant BJ, Sethi S. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jul 15;172(2):195-9.
- Murphy TF, Brauer AL, Aebi C, Sethi S. Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun*. 2005 Jun;73(6):3471-8.
- Murphy TF. Lung infections. 2. *Branhamella catarrhalis*: epidemiological and clinical aspects of a human respiratory tract pathogen. *Thorax*. 1998 Feb;53(2):124-8. Review.
- Nakanaga T, Nadel JA, Ueki IF, Koff JL, Shao MX. Regulation of interleukin-8 via an airway epithelial signaling cascade. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 May;292(5):L1289-96.
- Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Apr;163(5):1256-76. Review.
- Perez Vidakovics ML, Riesbeck K. Virulence mechanisms of *Moraxella* in the pathogenesis of infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Jun;22(3):279-85. Review.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A et al.; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Sep 15;176(6):532-55.
- Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12 Suppl):S466-7. Review.
- Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*. 1988 Apr 1;48(7):1904-9.

- Richter A, O'Donnell RA, Powell RM et al.. Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Jul;27(1):85-90.
- Rosell A, Monsó E, Soler N et al.. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med.* 2005 Apr 25;165(8):891-7.
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):320-44. Review.
- Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., and Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995;19, 183–232
- Schmeck B, Zahlten J, Moog K et al.. Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem.* 2004 Dec 17;279(51):53241-7.
- Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2008 Nov 27;359(22):2355-65. Review.
- Shuto T, Xu H, Wang B, Han J et al.. Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 17;98(15):8774-9. Epub 2001 Jul 3.
- Slevogt H, Schmeck B, Jonat C, et al. Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 May;290(5):L818-26.
- Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN et al.. Moraxella catarrhalis is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol.* 2007 Mar;9(3):694-707.

- Slevogt H, Zabel S, Opitz B et al.. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered anti-bacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*. 2008 Nov;9(11):1270-8. Epub 2008 Oct 5.
- Strieter RM. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Oct;283(4):L688-9. Review.
- Subauste MC, Proud D. Effects of tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on interleukin-8 production by, and human rhinovirus replication in, bronchial epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2001 Jul;1(7):1229-34.
- Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 2001
- Tan TT, Riesbeck K. Current progress of adhesins as vaccine candidates for *Moraxella catarrhalis*. *Expert Rev Vaccines*. 2007 Dec;6(6):949-56. Review.
- Verduin CM, Hol C, Flier A, van Dijk H, van Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jan;15(1):125-44. Review.
- Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*. 2003 Jul 24;424(6947):456-61.
- WHO (World Health Organization). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Fact sheet no 315. Updated November 2009.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/en/index.html> (Zugriff am 30.03.10)
- WHO (World Health Organization). The top 10 causes of death. Fact sheet no 310. Updated October 2008.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en> (Zugriff am 22.09.09)
- Yao H, de Boer WI, Rahman I. Targeting lung inflammation: novel therapies for the treatment of COPD. *Curr Respir Med Rev*. 2008;4(1):57-68.

- Yi HA, Kim MS, Jang SY, Lee YM, Ahn JH, Lee CH. Cellular signals involved in cyclooxygenase-2 expression induced by human cytomegalovirus. *Virus Res.* 2009 Dec;146(1-2):89-96.
- Zhu L, Lee PK, Lee WM, Zhao Y, Yu D, Chen Y. Rhinovirus-induced major airway mucin production involves a novel TLR3-EGFR-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 May;40(5):610-9. Epub 2008 Oct 31.
- Ziegelbauer K, Gantner F, Lukacs NW et al.. A selective novel low-molecular-weight inhibitor of I κ B kinase-beta (IKK-beta) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. *Br J Pharmacol.* 2005 May;145(2):178-92.

Erklärung

Ich, Helge Haarmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Die Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors für die *Moraxella-catarrhalis*-induzierte proinflammatorische Immunantwort in pulmonalem Epithel" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Posterpreis, Kongress der *European Respiratory Society*, Berlin 2008:

The *Moraxella catarrhalis* induced inflammatory response of pulmonary epithelial cells is mediated by activation of EGFR. Philippe Dje N'Guessan, **Helge Haarmann**, Tamara Steiner, Norbert Suttorp, Hortense Slevogt. *Internal Medicine / Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.*

Poster, Kongress der *European Respiratory Society*, Berlin 2008:

Role and regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced beta defensin 3 expression in human pulmonary epithelial cells. Philippe Dje N'Guessan, Tamara Steiner, Stefanie Scharf, **Haarmann Helge**, Bastian Opitz, Julia Eitel, Stefan Hippenstiel, Norbert Suttorp, Hortense Slevogt. *Internal Medicine / Infectious Diseases and Respiratory Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.*

Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Papers in preparation:

The *Moraxella catarrhalis* induced inflammatory response of pulmonary epithelial cells is mediated by activation of EGFR. Philippe Dje N'Guessan, **Helge Haarmann**, Tamara Steiner, Andreas Weimann, Norbert Suttorp, Hortense Slevogt. *Internal Medicine / Infectious Diseases and Respiratory Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.*

Role and regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced beta defensin-3 expression in human pulmonary epithelial cells. Hortense Slevogt, Tamara Steiner, Stefanie Scharf, **Haarmann Helge**, Bastian Opitz, Julia Eitel, Norbert Suttorp, Philippe Dje N'Guessan. *Internal Medicine / Infectious Diseases and Respiratory Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.*

Danksagung

Für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit danke ich Priv.-Doz. Dr. med. Hortense Slevogt und Dr. med. Philippe N'Guessan.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Suttorp für die Gelegenheit, in seiner Arbeitsgruppe tätig werden zu können.

Der Forschungsförderung der Charité danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Forschungsstipendiums.

Für die exzellente technische Unterstützung bedanke ich mich bei den technischen Assistenten Jacqueline Hellwig, Doris Stoll, Annika Kühn und Frauke Schreiber.

Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern im Labor, aber auch meinen lieben Verwandten und Freunden danke ich für die vielfältige Unterstützung zur Realisierung dieser Arbeit.

Ich danke dem Herrn Jesus Christus, dessen Liebe, Treue und Befähigung mir diese Arbeit ermöglicht hat.