

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

DISSERTATION

**Die Bedeutung des humanen  $\beta$ -Defensin-3 für die Infektion von  
humanem respiratorischem Epithel mit *Moraxella catarrhalis***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von  
Tamara Alice Steiner  
aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

## **Meinen Eltern**

„Nicht der Beginn wird belohnt, sondern einzig und allein das Durchhalten.“

Katherina von Siena

**I INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>III</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>IV</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Abstrakt (deutsch)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Abstract (english)</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	Definition, Klinik, Diagnostik und Therapie.....	4
2.1.2	Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung .....	5
2.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren .....	5
2.1.4	Pathogenetische Mechanismen, pathologische Veränderungen und Pathophysiologie .....	6
2.1.5	Die Rolle von Bakterien für die Pathogenese der COPD .....	7
2.1.6	Bakteriell bedingte Exazerbationen der COPD .....	9
<b>2.2</b>	<b><i>Moraxella catarrhalis</i></b> .....	<b>10</b>
2.2.1	Historischer Überblick.....	10
2.2.2	Taxonomische Klassifikation und Nomenklatur.....	11
2.2.3	Charakteristika und Identifizierung.....	12
2.2.4	Epidemiologie und Kolonisation.....	13
2.2.5	<i>M. catarrhalis</i> -assoziierte Infektionskrankheiten.....	14
2.2.6	Therapieresistenz, Therapie und Prävention von <i>M. catarrhalis</i> -assoziierten Infektionskrankheiten.....	15
2.2.7	Virulenzmechanismen .....	16
2.2.7.1	<i>Ubiquitous surface protein</i> A1 und A2 (UspA1 und UspA2).....	17
2.2.7.2	Lipooligosaccharid (LOS) .....	19
<b>2.3</b>	<b>Das Immunsystem</b> .....	<b>20</b>
2.3.1	Angeborenes Immunsystem .....	21
2.3.2	Die Rolle des respiratorischen Epithels in der angeborenen Immunabwehr.....	22
2.3.3	Mustererkennende Rezeptoren ( <i>Pattern recognition receptors</i> (PRRs)) .....	24
2.3.3.1	Toll- <i>like</i> Rezeptoren (TLR) .....	26
2.3.3.1.1	Toll- <i>like</i> Rezeptor 2 (TLR2).....	27

2.3.3.1.2	Toll- <i>like</i> Rezeptor 4 (TLR4).....	28
2.3.4	Die TLR-vermittelte Signaltransduktion.....	29
2.3.4.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK).....	31
2.3.4.2	Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1 (AP-1).....	32
2.3.4.3	Nukleärer Transkriptionsfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).....	33
2.3.5	Antimikrobielle Peptide (AMP).....	35
2.3.5.1	Antimikrobielle Peptide des Menschen.....	37
2.3.5.1.1	Humane $\beta$ -Defensine.....	39
2.3.5.1.1.1	Humanes $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3).....	39
2.3.5.1.1.2	Regulation der Expression von hBD-3.....	41
2.3.5.2	Die Rolle von AMP in der Pathogenese von Krankheiten.....	43
<b>3</b>	<b>HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>48</b>
4.1.1	Zelllinien und Zellen.....	48
4.1.1.1	Humane primäre Bronchialepithelzellen ( <i>primary bronchial epithelial cells</i> (PBEC)).....	48
4.1.1.2	Humane Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B).....	48
4.1.1.3	Humane Typ II-Alveolarepithelzelllinie (A549).....	48
4.1.2	Zellkultur.....	49
4.1.3	Transiente Transfektion von <i>small interfering RNA</i> (siRNA) in A549-Zellen.....	50
4.1.4	Stimulanzen.....	50
4.1.5	Chemische Inhibitoren.....	50
4.1.6	Bakterien.....	51
4.1.7	Bakterienkultur.....	51
4.1.8	Antimikrobielle Peptide (AMP)-Empfindlichkeitstest.....	52
4.1.9	Reverse Transkription (RT).....	52
4.1.10	Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR).....	53
4.1.11	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	53
4.1.12	Western Blot.....	54
4.1.13	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP).....	55
4.1.14	Geräte.....	56
4.1.15	Analysesoftware.....	57
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>57</b>
4.2.1	Zellbiologische Methoden.....	57
4.2.1.1	Kultivierung und Passagierung von primären Bronchialepithel- zellen (PBEC).....	57

4.2.1.2	Kultivierung und Passagierung von BEAS-2B-Zellen.....	58
4.2.1.3	Kultivierung und Passagierung von A549-Zellen .....	58
4.2.1.4	Kryokonservierung und Auftauen von BEAS-2B- und A549-Zellen .....	59
4.2.1.5	Bestimmung der Zellzahlen .....	59
4.2.1.6	Transiente Transfektion von <i>small interfering</i> RNA (siRNA) in A549-Zellen.....	59
4.2.1.7	Einsatz von Stimulanzen, Inhibitoren und Kontrollen .....	60
4.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	60
4.2.2.1	Kultivierung von <i>Moraxella catarrhalis</i> -Stämmen .....	60
4.2.2.2	Anlegen der Glycerolstocks von <i>Moraxella catarrhalis</i> -Stämmen.....	61
4.2.2.3	Hitzeinaktivierung von <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	61
4.2.2.4	Zellstimulation mit <i>Moraxella catarrhalis</i> -Stämmen.....	62
4.2.2.5	Antimikrobielle Peptide (AMP)-Empfindlichkeitstest.....	62
4.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	63
4.2.3.1	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	63
4.2.3.1.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA.....	63
4.2.3.1.2	Reverse Transkription (RT).....	63
4.2.3.1.3	Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	63
4.2.3.1.4	DNA-Gelelektrophorese.....	64
4.2.4	Biochemische Methoden .....	64
4.2.4.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	64
4.2.4.2	Western Blot .....	65
4.2.4.2.1	Isolierung von Gesamtprotein .....	65
4.2.4.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	65
4.2.4.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	65
4.2.4.2.4	Protein-Immunoblot.....	66
4.2.4.3	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) .....	66
4.2.4.4	Statistik .....	68
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Humanes <math>\beta</math>-Defensin-3 (hBD-3) zeigt antimikrobielle Aktivität gegenüber <i>M. catarrhalis</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b><i>M. catarrhalis</i> induziert zeit- und dosisabhängig die hBD-3-Expression in humanen respiratorischen Epithelzellen.....</b>	<b>71</b>
<b>5.3</b>	<b>Verschiedene <i>M. catarrhalis</i>-Wildtypstämme induzieren die hBD-3-Expression in humanen Bronchialepithelzellen .....</b>	<b>75</b>
<b>5.4</b>	<b>Die <i>M. catarrhalis</i>-induzierte hBD-3-Expression in humanem respiratorischem Epithel ist von <i>M. catarrhalis</i>-spezifischem LOS abhängig.....</b>	<b>76</b>

---

5.5	<i>M. catarrhalis</i> -induzierte bzw. <i>M. catarrhalis</i> -LOS-induzierte hBD-3-Expression ist nicht vom TLR4 abhängig.....	79
5.6	<i>M. catarrhalis</i> -induzierte bzw. <i>M. catarrhalis</i> -LOS-induzierte hBD-3-Expression ist vom TLR2 abhängig .....	82
5.7	JNK und ERK1/2 vermitteln die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte hBD-3-Produktion.....	85
5.8	Die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte hBD-3-Expression ist unabhängig von NF- $\kappa$ B, aber abhängig von AP-1 .....	87
5.9	ERK1/2 und JNK regulieren die AP-1-Aktivierung für die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte hBD-3-Sekretion.....	89
6	DISKUSSION.....	91
6.1	Das hBD-3 ist gegenüber <i>M. catarrhalis</i> antimikrobiell wirksam.....	91
6.2	<i>M. catarrhalis</i> induziert die hBD-3-Expression in respiratorischem Epithel.....	93
6.3	Die Rolle der Virulenzfaktoren von <i>M. catarrhalis</i> in der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten hBD-3-Produktion .....	94
6.4	Die Bedeutung von TLRs und anderen Rezeptoren in der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten hBD-3-Expression.....	95
6.5	Die Bedeutung von MAPKs und anderen Signalkinasen in der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten hBD-3-Expression .....	97
6.6	Die Funktion der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 in der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten hBD-3-Expression .....	98
6.7	Modell der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten hBD-3-Sekretion im respiratorischen Epithel.....	99
6.8	Mögliche Bedeutung von humanen $\beta$ -Defensinen in der COPD.....	100
6.9	Ausblick – Antimikrobielle Peptide in der Therapie von Infektionen ....	101
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
8	ANHANG .....	116
8.1	Danksagung .....	116
8.2	Lebenslauf.....	117
8.3	Publikationen .....	119
	8.3.1 Konferenzvortrag .....	119

---

8.3.2	Posterpräsentationen.....	119
8.3.3	Originalarbeiten in Vorbereitung .....	119
<b>8.4</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>120</b>

## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1A und 2.1B: Röntgen-Thoraxübersichtsaufnahmen von COPD-Patienten ...	7
Abbildung 2.2: Die Circulus vitiosus Hypothese der chronischen Infektion und Entzündung bei der COPD .....	9
Abbildung 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines <i>M. catarrhalis</i> -Diplokokkus..	12
Abbildung 2.4: Chemische Struktur des <i>M. catarrhalis</i> -LOS und dessen drei Serotypen A, B und C .....	20
Abbildung 2.5: Induzierbare angeborene Immunantwort des Atemwegsepithels.....	24
Abbildung 2.6: TLR-vermittelte Signalwege .....	31
Abbildung 2.7: Wichtige Funktionen von AMP .....	37
Abbildung 5.1A–C: Antimikrobielle Aktivität von hBD-3 gegenüber <i>M. catarrhalis</i> .....	70
Abbildung 5.2A–F: <i>M. catarrhalis</i> induziert zeitabhängig die hBD-3-Expression in respiratorischen Epithelzellen.....	72
Abbildung 5.3A–F: <i>M. catarrhalis</i> induziert dosisabhängig die hBD-3-Expression in respiratorischen Epithelzellen.....	74
Abbildung 5.4A und 5.4B: Vergleich der hBD-3-Expression nach Stimulation mit den <i>M. catarrhalis</i> -Wildtypstämmen ATCC 25238, O46E und O35E in humanen Bronchialepithelzellen.....	75
Abbildung 5.5A und 5.5B: Vergleich der hBD-3-Expression nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i> -Wildtyp O35E, seiner UspA1-, UspA2- sowie LOS-defizienten-Mutante und mit hitzeinaktiviertem <i>M. catarrhalis</i> - Wildtyp O35E in humanen Bronchialepithelzellen.....	77
Abbildung 5.6A und 5.6B: <i>M. catarrhalis</i> induziert die hBD-3-Expression LOS abhängig .	79
Abbildung 5.7A–C: <i>M. catarrhalis</i> -induzierte und <i>M. catarrhalis</i> -LOS-induzierte hBD-3-Expression wird nicht durch TLR4 vermittelt .....	81
Abbildung 5.8A–C: <i>M. catarrhalis</i> -induzierte und <i>M. catarrhalis</i> -LOS-induzierte hBD-3-Expression wird durch TLR2 vermittelt .....	84
Abbildung 5.9A–C: JNK und ERK1/2 vermitteln die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte hBD-3-Expression.....	86
Abbildung 5.10A und 5.10B: NF- $\kappa$ B hat keinen Einfluss auf die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte hBD-3-Produktion .....	88
Abbildung 5.11: AP-1 reguliert die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte hBD-3-Produktion.....	89
Abbildung 5.12: ERK1/2 und JNK aktivieren die AP-1-Bindung an den hBD-3-Promotor nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i> .....	90
Abbildung 6.1: Modell zur Regulation der hBD-3-Expression in humanem respiratorischem Epithel durch die Infektion mit <i>M. catarrhalis</i> .....	99



**III TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 2.1: Humane kationische antimikrobielle Peptide .....	38
Tabelle 4.1: Kulturmedien und Adhäsionsflüssigkeit für Primäre Bronchialepithelzellen (PBEC) .....	49
Tabelle 4.2: Kulturmedien, Kryomedium und Adhäsionsflüssigkeit für BEAS-2B-Zellen ...	49
Tabelle 4.3: Kulturmedien und Kryomedium für A549-Zellen .....	49
Tabelle 4.4: Materialien für die Zellkultur.....	50
Tabelle 4.5: Reagenzien und Materialien für siRNA-Transfektion .....	50
Tabelle 4.6: siRNA-Sequenzen .....	50
Tabelle 4.7: Stimulanzien.....	50
Tabelle 4.8: Chemische Inhibitoren.....	50
Tabelle 4.9: <i>Moraxella catarrhalis</i> -Stämme .....	51
Tabelle 4.10: Medien für die Kultur von <i>M. catarrhalis</i> -Stämmen .....	51
Tabelle 4.11: Materialien für die Bakterienkultur .....	51
Tabelle 4.12: Lösungen für AMP-Empfindlichkeitstest .....	52
Tabelle 4.13: Sonstige Materialien für AMP-Empfindlichkeitstest.....	52
Tabelle 4.14: Puffer und Mastermixe für RT.....	52
Tabelle 4.15: Sonstige Reagenzien und Materialien für RT.....	52
Tabelle 4.16: Puffer, Mastermix und Gel für PCR .....	53
Tabelle 4.17: Sonstige Reagenzien und Materialien für PCR.....	53
Tabelle 4.18: Primer-Sequenzen für semiquantitative PCR.....	53
Tabelle 4.19: Reagenzien und Materialien für hBD-3-ELISA.....	53
Tabelle 4.20: Puffer, Lösungen und Gele für Western Blot .....	54
Tabelle 4.21: Sonstige Reagenzien und Materialien für Western Blot .....	55
Tabelle 4.22: Primäre Antikörper für Western Blot .....	55
Tabelle 4.23: Sekundäre Antikörper für Western Blot.....	55
Tabelle 4.24: Puffer und Lösungen für ChIP .....	55
Tabelle 4.25: Sonstige Reagenzien und Materialien für ChIP .....	56
Tabelle 4.26: Antikörper für ChIP .....	56
Tabelle 4.27: Geräte .....	56
Tabelle 4.28: Analysesoftware .....	57

## IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Das Abkürzungsverzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (usw., bzw., etc.) sowie SI-Einheiten (Système International d'unités) und deren Präfixe.

A549	humane Typ II-Alveolarepithelzelllinie
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i> ; ein Disintegrin und Metalloprotease
AMP	antimikrobielle Peptide
AP-1	<i>activator protein-1</i> ; Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> <sup>TM</sup>
ATF	<i>activating transcription factor</i> ; aktivierter Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzelllinie
BEBM	<i>Bronchial Epithelial Cell Basal Medium</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i> ; Hirn-Herz-Infusion
bidest.	bidestilliert, zweifach destilliert
bp	Basenpaaren
BRO	Branhamella und Moraxella
BSA	Bovines Serumalbumin
bZIP	<i>basic leucine zipper</i> ; basischer Leucinzipper
C3	<i>complement component 3</i> ; Komplementkomponente 3
C4BP	C4b-bindendes Protein
CAMP	Cathelizidin-antimikrobielles-Peptid
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; Differenzierungscluster
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i> ; karzinoembryonales Antigen-verwandtes Zelladhäsionsmolekül
CF	<i>cystic fibrosis</i> ; zystische Fibrose
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFU	<i>colony forming units</i> ; Kolonie-bildende Einheiten
CLR	<i>C-type lectin receptor</i> ; C-Typ Lektin Rezeptor
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> ; chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i> ; Gefahr-assoziiertes molekulares Muster
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> ; doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
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
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
ETI	<i>Erythrina trypsin inhibitor</i> ; Erythrina-Trypsin-Inhibitor
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i> ; Fas-assoziiertes Todesdomänen-Protein
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
FEV <sub>1</sub>	forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen, Einsekundenkapazität
FVC	forcierte expiratorische Vitalkapazität
Galp	Galactosephosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlcP	Glucosephosphat
GlcPNAc	N-Acetylglucosaminphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> ; Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GOLD	<i>global initiative of obstructive lung disease</i> ; globale Initiative der obstruktiven Lungenerkrankung
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> ; G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

## IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hBD	humanes β-Defensin
HB-EGF	<i>heparin-binding-epidermal growth factor</i> ; Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor
hCAP18	<i>human cationic antimicrobial peptide of 18 kDa</i> ; humanes kationisches antimikrobielles Peptid von 18 kDa Molekulargewicht
HD	humanes α-Defensin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMGB1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
HNP	humanes neutrophiles Peptid
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> ; interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>inhibitory-κB-kinase</i> ; inhibitorische κB-Kinase
IKK-NBD	<i>IKK-NEMO-binding-Domain</i> ; IKK-NEMO-bindende Domäne
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i> ; Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	<i>interferon-regulatory factor</i> ; Interferon-Regulator Faktor
IκB	<i>inhibitory-κB</i> ; Inhibitor-κB
JDP	<i>jun-dimerization protein</i> ; jun-Dimerisierungs-Protein
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase</i> ; c-Jun NH <sub>2</sub> terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KDO	Ketodesoxyoctonsäure
LBP	<i>lipopolysaccharid-binding protein</i> ; Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin rich repeat</i> ; Leucin-reiche Wiederholungseinheit
LT	Leukotrien
LTA	<i>lipoteichoic acid</i> ; Lipoteichonsäure
<i>M. catarrhalis</i> ; <i>M. c.</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Maf	<i>musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
Mal	<i>MyD88-adaptor-like protein</i> ; MyD88-Adapter-ähnliches Protein
MAP	<i>mitogen-activated protein</i> ; Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i> ; Monozyten-chemotaktisches Protein 1
MD-2	<i>myeloid differentiation-2</i> ; myeloider Differenzierungsfaktor-2
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
M-MLV	<i>moloney murine leukaemia virus</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i> ; myeloider Differenzierungsfaktor 88
<i>N. catarrhalis</i>	<i>Neisseria catarrhalis</i>
NALP	<i>NACHT-LRR- and pyrin domain-containing protein</i> ; NACHT-LRR- und Pyrin-Domäne enthaltendes Protein
NE	neutrophile Elastase
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i> ; NF-κB essentieller Modulator
NF-IL-6	<i>nuclear factor for interleukin-6 expression</i> ; nukleärer Faktor für die Interleukin-6-Expression
NF-κB	<i>nuclear transcription factor-κB</i> ; nukleärer Transkriptionsfaktor-κB
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> ; Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i> ; äußeres Membranprotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> ; Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> ,	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-
Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-(Lys) <sub>4</sub> ,	lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysin
P-3-C	
PBEC	<i>primary bronchial epithelial cells</i> ; primäre Bronchialepithelzellen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion

## IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol II	RNA Polymerase II
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> ; Muster erkennende Rezeptoren
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	<i>ribosomal DNA</i> ; ribosomale DNA
rh	rekombinant human
RHD	<i>Rel homology domain</i> ; Rel-Homologie-Domäne
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene-I</i> ; Retinsäure-induzierbares Gen-I
RIP	<i>receptor-interacting protein</i> ; Rezeptor interagierendes Protein
RLR	<i>RIG-I-like</i> Rezeptor
RLT	Lysepuffer für RNA-Isolierung
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> ; ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i> ; Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> ; Standardabweichung des Mittelwertes
si	<i>small interfering</i>
SLPI	<i>secretory leukocyte proteinase inhibitor</i> ; sekretorischer Leukozyten-Proteinase-Inhibitor
SP	Surfactantprotein
SR	<i>Scavenger</i> Rezeptor
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> ; einzelsträngige RNA
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> ; Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
syn.	synonym
TAD	<i>transactivation domain</i> ; Transaktivierungsdomän
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK	<i>transforming growth factor β-activated kinase</i> ; transformierender Wachstumsfaktor β-aktivierte Kinase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBK	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator-binding kinase</i> ; TRAF-Familienmitglied-assozierte NF-κB Aktivator-bindende Kinase
TBP	<i>TAK1-binding protein</i> ; TAK1-bindendes Protein
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethyl-ethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i> ; transformierender Wachstumsfaktor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i> ; Tumornekrosefaktor-α
TNS	<i>Trypsin Neutralizing Solution</i> ; Trypsin-Neutralisations-Lösung
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i> ; Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierter Faktor
TRAM	TRIF-related adapter molecule; TRIF-verwandtes Adaptermolekül
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i> ; TIR-Domäne-enthaltendes IFN-β-induzierendes Adaptermolekül
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Ubc13	ubiquitin-conjugating enzyme 13; Ubiquitin-konjugierendes Enzym 13
Uev1A	<i>ubiquitin-conjugating enzyme variant 1A</i> ; Ubiquitin-konjugierende Enzym-Variante 1A
Usp	<i>ubiquitous surface protein</i> ; ubiquitäres Oberflächenprotein
UV	ultraviolett
VC; IVC	inspiratorische Vitalkapazität
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i> ; vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
w/o	<i>without</i> ; ohne
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Abstrakt (deutsch)

**Einleitung:** *Moraxella catarrhalis* ist ein COPD-assoziiertes Erreger, der durch eine chronische Kolonisation der unteren Atemwege vermutlich die persistierende Inflammation der COPD aufrechterhält und durch akute Infektionen mit einem für den Wirt neuen *M. catarrhalis*-Stamm für ca. 15 % der bakteriell induzierten Exazerbationen der COPD verantwortlich ist. Hinsichtlich der weltweit steigenden Zunahme Antibiotika-resistenter *M. catarrhalis*-Stämme kommt der Erforschung endogener humaner antimikrobieller Peptide (AMP) als mögliche alternative und innovative Antibiotika, von denen auch COPD-Patienten profitieren könnten, eine besondere Bedeutung zu. Die AMP sind evolutionär sehr ursprüngliche und wichtige Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, die neben ihrer antimikrobiellen Wirkung auch immunmodulatorische Funktionen ausüben. Das humane  $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) gehört zu den AMP des Menschen, welches unter den humanen  $\beta$ -Defensinen die stärkste antimikrobielle Aktivität gegen ein sehr breites Erregerspektrum besitzt und nach inflammatorischer oder infektiöser Stimulation u. a. von den Epithelzellen der Atemwege und Lunge freigesetzt wird. Bislang ist die antimikrobielle Aktivität von hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis* sowie die Regulation der hBD-3-Expression im Hinblick auf eine Infektion des respiratorischen Epithels mit *M. catarrhalis* nicht bekannt und wurden daher in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht.

**Methodik:** In einem AMP-Empfindlichkeitstest mit rekombinantem hBD-3 (rhBD-3) und Koloniezählverfahren wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen (O35E, ATCC 25238) untersucht. Nach Infektion von humanen primären Bronchialepithelzellen (PBEC), humaner Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B) und humaner Typ II-Alveolarepithelzelllinie (A549) mit *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen (O35E, ATCC 25238, O46E) oder *M. catarrhalis*-Mutantenstämmen (O35E.1, O35E.2, O35E.lpxA) wurde die hBD-3-Expression per RT-PCR und ELISA analysiert. In siRNA-Transfektionsversuchen (siTLR2, siTLR4) erfolgte die Bestimmung der TLR-vermittelten hBD-3-Expression nach Stimulation mit *M. catarrhalis* oder *M. catarrhalis*-spezifischem LOS. Der Einsatz von Inhibitoren (SB202190, U0126, SP600125, IKK-NBD), Western Blot- und CHIP-Analysen ermöglichten die Bestimmung der an der hBD-3-Expression nach *M. catarrhalis*-Infektion beteiligten MAPKs und Transkriptionsfaktoren.

**Ergebnisse:** Die Inkubation von *M. catarrhalis* mit rhBD-3 zeigte einen starken antimikrobiellen Effekt des Peptids auf diesen Erreger. Des Weiteren induzierte die Infektion von respiratorischen Epithelzellen mit *M. catarrhalis* eine gesteigerte Transkription und Sekretion von hBD-3. Diese *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression war abhängig vom hitzestabilen *M. catarrhalis*-Virulenzfaktor LOS, während die *M. catarrhalis*-Oberflächenproteine UspA1 und UspA2 keine Rolle für die hBD-3-

Produktion spielten. Der transiente Knockdown der TLR2-Expression führte zu einer erniedrigten hBD-3-Sekretion nach Stimulation mit *M. catarrhalis* bzw. *M. catarrhalis*-LOS, wohingegen der transiente Knockdown der TLR4-Expression keinen Einfluss auf die hBD-3-Expression hatte. Zudem führte die Inhibition der MAPKs ERK1/2 und JNK, aber nicht von p38 MAPK, zu einer verringerten hBD-3-Bildung nach *M. catarrhalis*-Infektion. Die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Produktion wurde über die Rekrutierung der AP-1-Transkriptionsfaktoruntereinheit c-Jun an den *hBD-3*-Genpromotor vermittelt und war unabhängig von NF- $\kappa$ B.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend wurde gezeigt, dass das respiratorische Epithel nach Infektion mit *M. catarrhalis* in Abhängigkeit von dessen Virulenzfaktor LOS über einen TLR2-MAPKs ERK1/2 und JNK sowie Transkriptionsfaktor c-Jun/AP-1-vermittelten Signalweg das hBD-3 produziert, welches seinerseits gegenüber *M. catarrhalis* äußerst bakterizid wirkt.

### 1.2 Abstract (english)

Introduction: *Moraxella catarrhalis* is a COPD-associated pathogen, which maintains probably additively through chronic colonisation of the lower airways the persistent inflammation in COPD and is responsible for nearly 15 % of the bacterial induced exacerbations of COPD through an acute infection with one for the host new *M. catarrhalis* strain. Because of the worldwide increase of antibiotic-resistant *M. catarrhalis* strains the research for endogenous human antimicrobial peptides (AMPs) as potential alternative and innovative antibiotics, which could also be a benefit to COPD-patients, becomes a particular importance. AMPs are evolutionary very original and important effector molecules of the innate immunity, which have next to their antimicrobial properties also several immunomodulatory functions. Human  $\beta$ -defensin-3 (hBD-3) belongs to one of the human AMPs, that has the strongest antimicrobial activity against a broad range of pathogens compared to all human  $\beta$ -defensins and is secreted inter alia by airway and lung epithelial cells under inflammatory and infectious conditions. Until now the antimicrobial effect of hBD-3 against *M. catarrhalis* and the regulation of the hBD-3 expression with regard to an infection of the respiratory epithelium with *M. catarrhalis* were unknown and was therefore the object for investigation in this present work.

Methods: The antimicrobial potential against the *M. catarrhalis* wildtype-strains (O35E, ATCC 25238) was examined by an antimicrobial peptide resistance assay with recombinant hBD-3 (rhBD-3) and colony count assay. After infection of human primary bronchial epithelial cells (PBEC), human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) and human type II alveolar epithelial cell line (A549) with *M. catarrhalis* wildtype-strains (O35E, ATCC 25238, O46E) or *M. catarrhalis* mutants (O35E.1, O35E.2, O35E.lpxA) the hBD-3 expression was analyzed via RT-PCR and ELISA. The determination of TLR-mediated hBD-3 expression after stimulation with *M. catarrhalis* or *M. catarrhalis* specific LOS was identified through siRNA transfection studies (siTLR2, siTLR4). The use of inhibitors

(SB202190, U0126, SP600125, IKK-NBD), Western Blot and CHIP analysis enabled the investigation of MAPKs and transcription factors involved in hBD-3 expression after *M. catarrhalis* infection.

**Results:** Incubation of *M. catarrhalis* with rhBD-3 showed a strong antimicrobial effect of the peptide towards this pathogen. Furthermore, infection of respiratory epithelial cells with *M. catarrhalis* induced an increased transcription and secretion of hBD-3. This *M. catarrhalis*-induced hBD-3 expression was dependent on heat-stable *M. catarrhalis*-virulence factor LOS, while the *M. catarrhalis* outer membrane proteins UspA1 and UspA2 were not important for the hBD-3 production. The transient knockdown of TLR2 expression led to a decreased hBD-3 release after stimulation with *M. catarrhalis* or *M. catarrhalis*-specific LOS, whereas the transient knockdown of TLR4 expression had no influence on the hBD-3 expression. In addition, the inhibition of MAPKs ERK1/2 and JNK, but not of p38 MAPK, attenuated the hBD-3 secretion after *M. catarrhalis* infection. *M. catarrhalis*-induced hBD-3 production was mediated via recruitment of AP-1 transcription factor subunit c-Jun to the *hBD-3* gene promoter and was independent of NF- $\kappa$ B.

**Conclusion:** In conclusion, findings of the present study demonstrated, that the respiratory epithelium produces after infection with *M. catarrhalis* in dependence on its virulence factor LOS via a TLR2-MAPKs ERK1/2 and JNK as well as transcription factor c-Jun/AP-1 mediated pathway the hBD-3 peptide, which acts potently bactericidal against *M. catarrhalis*.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

#### 2.1.1 Definition, Klinik, Diagnostik und Therapie

Nach den aktuellen Richtlinien der *American Thoracic Society* (ATS) und *European Respiratory Society* (ERS) sowie der jährlich erneuerten Leitlinie der *Global Initiative of Obstructive Lung Disease* (GOLD) ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease* (COPD)) ein vermeidbarer und behandelbarer Krankheitszustand, der durch eine Atemflussbehinderung charakterisiert ist [1, 2]. Diese Atemflussbehinderung ist nicht vollständig reversibel und im Allgemeinen progressiv und mit einer abnormen inflammatorischen Immunantwort auf schädliche Partikel oder Gase assoziiert [1, 2]. Die COPD betrifft dabei nicht nur die Lunge, sondern besitzt auch signifikante systemische extrapulmonale Effekte, die zum Schweregrad der Erkrankung beitragen können [1, 2].

Die klinische Symptomatik und funktionelle Beeinträchtigung der Lunge auf dem Boden der Atemwegsobstruktion äußert sich im Verlauf der COPD meist in einer Kombination aus chronischem Husten, gesteigerter Sputumproduktion und Dyspnoe [3]. Der Krankheitsverlauf ist dabei durch eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion und eine zunehmende Beeinträchtigung des Befindens, der Leistungsfähigkeit und der Lebensqualität gekennzeichnet [4]. Maßgebend für diese Umstände mit zunehmenden Auswirkungen auch auf andere Organe sind rezidivierende Exazerbationen (näheres Kapitel 2.1.7) [4] und komplexe chronische Komorbiditäten, die die COPD zunehmend als Systemerkrankung verstehen lassen [2, 5].

Zur Diagnosestellung sowie Abschätzung des Schweregrades und der Progression der COPD gilt als Goldstandard die Spirometrie als die am besten validierte und reproduzierbare lungenfunktionsanalytische Methode [2, 6]. Mit ihr lassen sich die ein- und ausgeatmeten Luftvolumen sowie die Atemstromstärke messen und damit eine obstruktive Ventilationsstörung, gekennzeichnet durch eine verzögerte Entleerung der Lungen, abgrenzen [7]. Von den Kenngrößen der Obstruktion sind die Messung der Einsekundenkapazität (syn.: forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen (FEV<sub>1</sub>)) sowie die Bestimmung des Verhältnisses von FEV<sub>1</sub> und forciertes expiratorischer Vitalkapazität (FVC) bzw. von FEV<sub>1</sub> und inspiratorischer Vitalkapazität (VC oder IVC) von höchster Aussagekraft [8]. Diagnostisch läßt sich somit regelhaft bei der COPD die nicht vollständig reversible Atemflussbehinderung in der Spirometrie nach Gabe von Bronchodilatoren anhand einer Verminderung der FEV<sub>1</sub> und/oder des Verhältnisses von FEV<sub>1</sub>/FVC bzw. FEV<sub>1</sub>/VC nachweisen [2, 4].

Die Therapie der COPD richtet sich jeweils nach der Schwere der Lungenerkrankung. Laut der spirometrischen COPD-Klassifikation der GOLD-Leitlinie, ebenfalls in der Leitlinie



der Deutschen Atemwegsliga integriert, erfolgt dazu die Einteilung in vier Schweregrade in Abhängigkeit zur postbronchodilatatorisch gemessenen FEV<sub>1</sub> in Prozent vom Soll [2, 4]. Klinische Zeichen wie Husten, Luftnot und Auswurf gehen optional in die Stadieneinteilung mit ein. In höheren Schweregraden finden auch Blutgaswerte und klinische Zeichen der respiratorischen Insuffizienz mit Rechtsherzinsuffizienz Berücksichtigung [2, 4]. Der nach Schweregrad orientierte Therapiestufenplan empfiehlt bei milder COPD mit geringer Einschränkung der Lungenfunktion zunächst die Vermeidung von Risikofaktoren wie Tabakrauch oder berufliche Noxen sowie Influenza- und Pneumokokkenimpfung und bei beginnender Symptomatik nach Bedarf kurzwirksame Bronchodilatoren. Bei weiterem Abfall der FEV<sub>1</sub> und zunehmender Symptomatik kommen zusätzlich langwirksame Bronchodilatoren sowie Rehabilitation, bei wiederkehrenden Exazerbationen zusätzlich inhalative Glukokortikoide, gegebenenfalls Antibiotika und bei sehr schwerer COPD Langzeitsauerstofftherapie und chirurgische Eingriffe in Betracht [2, 4].

### **2.1.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung**

Die COPD ist weltweit eine der führenden Ursachen für chronische Morbidität und Mortalität [9]. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) galt die COPD im Jahre 2004 weltweit als vierthäufigste Todesursache und soll nach neuesten Einschätzungen im Jahre 2030 sogar auf dem dritten Platz der häufigsten Todesursachen rangieren [10]. Sie ist unter den führenden Todesursachen die einzige, deren Prävalenz weiterhin global zunimmt [11]. Die letzten WHO-Daten von 2007 zeigen, dass etwa 210 Millionen Menschen an COPD leiden [12]. In Deutschland sind nach Hochrechnungen der im Rahmen der *Burden of Lung Disease* (BOLD)-Studie erhobenen Prävalenzdaten etwa 5,9 Millionen der über 40-Jährigen von COPD betroffen [13]. Sozioökonomisch stellt die COPD unbestritten hohe finanzielle Anforderungen [4, 14]. Die volkswirtschaftlichen Gesamtkosten für die COPD-Patientengruppe in Deutschland werden bei steigender Prävalenz mittlerweile auf 12–17 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [15]. Der Hauptanteil der Kosten wird durch Krankenhausaufenthalte und Medikamente verursacht. Ebenfalls hohe Kosten entstehen indirekt gemessen am Verlust von Arbeitstagen durch Frührente und Arbeitsunfähigkeit [16].

### **2.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren**

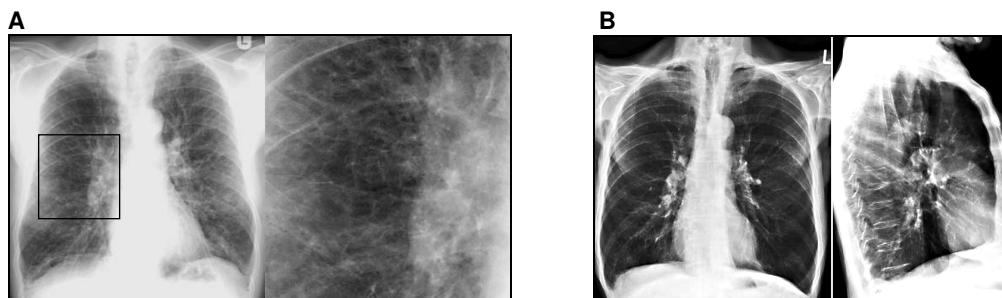
Die Ursache an COPD zu erkranken ist multifaktoriell und basiert auf einem Zusammenwirken von endogenen Wirtsfaktoren und exogenen Umgebungsfaktoren [14, 17]. Der Hauptrisikofaktor weltweit für die Entwicklung von COPD ist das Zigarettenrauchen [14, 17]. Nach neueren Erkenntnissen entwickeln bis zu 50 % der Raucher eine COPD [18] und umgekehrt sind oder waren etwa 80–90 % der COPD-Patienten Raucher [15]. Weitere bedeutende exogene Risikofaktoren sind Passivrauchen,

berufsbedingte Exposition gegenüber inhalativen Noxen, Luftverschmutzung und häufige respiratorische Infektionen in der Kindheit [14, 17]. Unter den endogenen Risikofaktoren spielen insbesondere genetische Faktoren eine Rolle [14, 17]. Ein gut untersuchter genetischer Risikofaktor in Verbindung mit COPD ist der erblich bedingte Mangel des Serinprotease-Inhibitors  $\alpha$ 1-Antitrypsin [19]. Infolge eines  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Defizits unterliegt das Lungengewebe einem verstärkten proteolytischen Abbau durch die neutrophile Elastase (NE) bis zur Ausbildung eines Emphysems, einer häufigen Manifestationsform bei fortgeschrittener COPD. Allerdings weisen nur ungefähr 1 % der COPD-Patienten einen  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel auf [19]. Als zusätzlich für COPD prädisponierende endogene Faktoren werden höheres Lebensalter [17] und intrauterine oder kindliche Lungenentwicklungsstörungen beschrieben [20].

### **2.1.4 Pathogenetische Mechanismen, pathologische Veränderungen und Pathophysiologie**

Im Zentrum der Pathogenese der COPD steht eine Entzündungsreaktion der Atemwege und des Lungengewebes als prinzipiell normale Immunantwort auf inhalierte toxische Partikel und Gase, vor allem auf die Inhalation von Tabakrauch. Diese fällt allerdings bei Patienten, die eine COPD entwickeln, inadäquat übersteigert aus und verstärkt sich mit fortschreitendem Schweregrad der Erkrankung zusätzlich [21, 22]. Alveolarmakrophagen und Atemwegsepithelzellen können durch Inhalation von Noxen direkt aktiviert werden und eine Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren freisetzen. Dazu gehören auch chemotaktische Faktoren, die weitere Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf in das Lungengewebe herbeilocken [23, 24]. Dabei dominieren Makrophagen und neutrophile Granulozyten als Zellen der angeborenen Immunabwehr und  $CD8^+$  T-Lymphozyten als Zellen des erworbenen Immunsystems die lokale Immunreaktion bei der COPD [21, 25]. Die rekrutierten Entzündungszellen geben ihrerseits wiederum inflammatorische Mediatoren ab und halten damit die Entzündungsreaktion aufrecht [23, 24]. Zu den für die Entzündungsvorgänge charakteristischen Mediatoren gehören allgemein neben den erwähnten chemotaktischen Faktoren auch verschiedene proinflammatorische Zytokine, Proteasen, profibrotische Wachstumsfaktoren und Oxidantien [23, 24, 26]. Die unterschiedlichen Mediatoren sind bei Patienten mit COPD erhöht und führen zu histopathologisch charakteristischen Befunden in den proximalen, aber insbesondere in den peripheren Atemwegen (Bronchiolen), im Lungenparenchym und in den pulmonalen Gefäßen [21, 26]. Diese pathologischen Veränderungen umfassen eine gesteigerte Mukusproduktion, weitgehende Zerstörung des Flimmerepithels einhergehend mit verminderter mukoziliärer Clearance [27, 28], eine Verengung der Bronchiolen durch gesteigerte Wanddicke infolge verstärkter Einwanderung von Entzündungszellen, Gewebezunahme aller Wandschichten und Fibrose einhergehend mit der Limitation des Atemflusses [22] sowie im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine Zerstörung des Lungenparenchyms einhergehend mit dem Verlust der elastischen Retraktionskraft und

folglich reduziertem expiratorischem Atemfluss bis zur Lungenüberblähung sowie vermindertem Gasaustausch [27-29]. Damit ergibt sich für die COPD ein komplexes Symptombild, das pathophysiologisch die chronische Bronchitis (Abbildung 2.1A), die chronisch-obstruktive Bronchiolitis (*small airway disease*, Abbildung 2.1A) und das Lungenemphysem (Abbildung 2.1B) als zumeist bei den Patienten parallel vorliegende krankhafte Zustände subsumiert [21, 27-29]. Die verschiedenen inflammatorischen Mediatoren können auch in den systemischen Kreislauf übertreten und somit zu systemischen Effekten im Verlauf der COPD beitragen [23].



**Abbildung 2.1A und 2.1B: Röntgen-Thoraxübersichtsaufnahmen von COPD-Patienten**

(A) Posterior-anterior Röntgen-Thorax und Ausschnittsvergrößerung aus dem Mittelfeld der rechten Lunge mit röntgenmorphologischem Korrelat einer chronischen Bronchitis und chronisch obstruktiven Bronchiolitis bei COPD. Die bronchovaskulären Strukturen sind deformiert und haben einen irregulären Verlauf mit Kalibersprüngen infolge Vernarbung bei chronisch rezidivierender Entzündung. (B) Posterior-anterior und latero-laterale Röntgen-Thorax mit röntgenmorphologischem Korrelat eines Lungenemphysems bei COPD. Die Lungenstrukturzeichnung ist reduziert mit Hypertransparenz infolge Rarefizierung des Lungengewebes. Zusätzlich liegen horizontal verlaufende Rippen, verbreiterte Interkostalräume, vergrößerter Retrosternalraum und abgeflachte Zwerchfellkuppeln infolge einer Überblähung vor. Die Abbildungen stammen von Jend 2006 [30].

Im Zusammenhang mit der beschriebenen chronischen Entzündungsreaktion bei der COPD sind noch weitere Mechanismen involviert, die nicht getrennt ablaufen, sondern einander vernetzt beeinflussen [31]. Dazu zählen eine Störung des Proteasen-Antiproteasen-Gleichgewichts mit einem Übergewicht proteolytischer Aktivität gegenüber antiproteolytischen Schutzmechanismen [32], ein verschobenes Oxidantien-Antioxidantien-Gleichgewicht mit der Folge von oxidativem Stress [33], eine gesteigerte Apoptose [31], autoimmune Mechanismen [34] und zunehmend werden respiratorischen Infektionen eine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese der COPD und ihrer Exazerbationen zugeschrieben [35]. Hierauf wird mit Schwerpunkt auf bakterielle Infektionen in den nachfolgenden Kapiteln 2.1.5 und 2.1.6 genauer eingegangen.

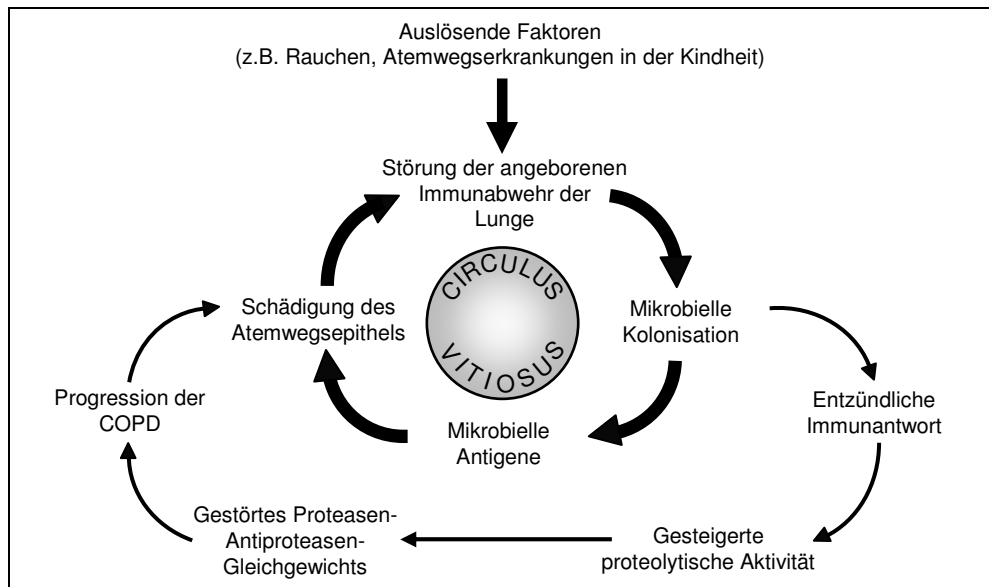
### 2.1.5 Die Rolle von Bakterien für die Pathogenese der COPD

In der klinisch stabilen Phase ohne akute Krankheitserscheinungen sind etwa 25–50 % der COPD-Patienten ständig mit Bakterien im unteren Respirationstrakt besiedelt im

Gegensatz zu einer gesunden Lunge mit sterilen unteren Atemwegen [35, 36]. Zu den am häufigsten kolonisierenden potentiell respiratorischen Pathogenen gehören unbekapselter bzw. nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae* [37]. Das Ausmaß kolonisierender Erreger bei stabiler COPD steht in klarem Zusammenhang mit einer gesteigerten Atemwegsentszündung, die mit einer erhöhten Anzahl von neutrophilen Granulozyten und erhöhten Konzentrationen von inflammatorischen Mediatoren in den Atemwegssekreten zusammenhängt [36, 38]. Zudem unterstützt der Nachweis einer spezifischen Immunglobulin G (IgG) Antikörperantwort gegen die genannten häufigsten besiedelnden Erreger, dass es sich bei der bakteriellen Kolonisation um einen pathologischen Zustand handelt [35, 39]. Histopathologisch wird mit fortschreitender COPD vermehrt eine Gewebeantwort in Form reifer, reich an B-Lymphozyten organisierter Lymphfollikel in den peripheren Atemwegen beobachtet, die ebenfalls Ausdruck einer spezifischen Immunabwehr vermutlich gegen die chronisch lokale Kolonisation bzw. Infektion ist [35, 40]. Die bakterielle Kolonisation in der stabilen Phase hat für COPD-Patienten aber auch direkt klinisch relevante Konsequenzen, da Betroffene signifikant häufiger an akuten Exazerbationen leiden (siehe Kapitel 2.1.6) [41] und in Abhängigkeit zur Bakterienlast eine stärkere Atemwegsobstruktion bei schlechterem Gesundheitszustand aufweisen [42-44]. Diese Beobachtungen lassen insgesamt annehmen, dass eine dauerhafte Besiedlung des Tracheobronchialbaumes mit potentiellen respiratorischen Pathogenen bei Patienten mit COPD die inflammatorische Immunantwort verstärkt und damit zur Persistenz der entzündlichen Prozesse wie auch zu dem Fortschreiten der COPD beiträgt [36].

Ein nützliches Erklärungsmodell, wie die chronische Infektion der unteren Atemwege wahrscheinlich zur Pathogenese der COPD beisteuert, liefert die Circulus vitiosus Hypothese von C. Murphy und S. Sethi (Abbildung 2.2) [42]. Diese geht davon aus, dass nach einer initialen Schädigung der Atemwege, z. B. durch inhalative Noxen oder durch häufige Atemwegserkrankungen in der Kindheit, eine signifikante Störung der angeborenen Abwehrmechanismen der Lunge resultiert, wodurch es inhalierten respiratorischen Pathogenen möglich wird, die unteren Atemwege zu kolonisieren [42]. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass respiratorische Pathogene, die den unteren Respirationstrakt kolonisieren, die angeborene Immunabwehr der Lunge weiter kontinuierlich schädigen und damit dazu beitragen, die chronische Infektion der unteren Atemwege zu unterhalten [35, 37]. Dabei können die Bakterien nicht nur direkt, sondern auch indirekt mittels Auslösung einer inflammatorischen Wirtsantwort des Atemwegsepithels die angeborene Abwehrfähigkeit der Lunge beeinträchtigen [42]. Diese durch die kolonisierenden Pathogene getriggerte entzündliche Wirtsantwort ist für die Erregerelimination nicht ausreichend, vermag aber in Verbindung mit einer gesteigerten proteolytischen Aktivität der Lunge signifikante Lungengewebschädigungen zu verursachen und zur Progression der Atemwegsobstruktion beizutragen [42]. Die Circulus vitiosus Hypothese geht zudem davon aus, dass die chronische Infektion einen

eigenständigen inflammatorischen Stimulus unabhängig von gleichzeitigem Tabakrauchen im Verlauf der COPD darstellt [36, 37]. Dieser Aspekt liefert eine mögliche Erklärung für die persistierende Entzündungsreaktion in den Atemwegen, die auch nach Beendigung des Rauchens, dem initialen Stimulus, bei COPD-Patienten nachgewiesen wird [45].



**Abbildung 2.2: Die Circulus vitiosus Hypothese der chronischen Infektion und Entzündung bei der COPD**

Nachdem eine initiale Schädigung der Atemwege die angeborene Immunabwehr der Lunge stört, hält die mikrobielle Kolonisation direkt (dicke Pfeile) und indirekt mittels Aktivierung gesteigerter Wirtsabwehr (dünne Pfeile) einen Kreislauf von Mechanismen aufrecht, der zu der für die COPD charakteristischen persistierenden Entzündungsreaktion und Infektion beiträgt. Modifiziert nach Sethi & Murphy 2008 [35].

### 2.1.6 Bakteriell bedingte Exazerbationen der COPD

Der Krankheitsverlauf der COPD wird charakteristischerweise erschwert durch häufige und wiederholte akute Episoden mit Verschlechterung der Symptome, sogenannte akute Exazerbationen [46]. Die Exazerbation wird laut GOLD- und ATS/ERS-Leitlinien als ein Ereignis im Verlauf der COPD-Erkrankung definiert, das durch eine Änderung der Dyspnoe, des Hustens und/oder des Auswurfs charakterisiert ist. Diese Änderung geht über die täglichen Schwankungen der Symptome hinaus, beginnt akut und erfordert eine Änderung der regulären Medikation [1, 2]. Die durchschnittliche Ereignisrate beträgt ein- bis zweimal jährlich und nimmt mit dem Fortschreiten der Erkrankung stetig zu [35]. Häufige Exazerbationen führen zu einer stärkeren Abnahme der Lungenfunktion im Verlauf der COPD und zu wiederholten Krankenhauseinweisungen mit längerem Aufenthalt [47]. Die Exazerbationen zählen somit zu den wichtigsten Ursachen für die Zunahme von Morbidität und Mortalität der COPD [48] und sind bestimmender Faktor von steigenden Gesundheitskosten [49] und verminderter Lebensqualität bei Patienten mit

COPD [50]. Die Exazerbationen sind charakterisiert durch eine akute Verstärkung der im Rahmen der COPD basal existierenden sowohl lokalen Atemwegsentszündung als auch systemischen Inflammation [51]. Infektiöse Pathogene wie Bakterien, Viren und atypische Bakterien werden zunehmend als wesentliche Auslöser der Exazerbation der COPD identifiziert. In geringerem Umfang spielen nichtinfektiöse Stimulanzen wie Schadstoffe der Luftverschmutzung eine Rolle [35, 46]. Im Folgenden wird nur auf die bakteriell bedingten Exazerbationen eingegangen.

Verbesserte Studien zeigen, dass nahezu 50 % der Exazerbationen durch akute bakterielle Infektionen der distalen Atemwege verursacht werden [35]. Häufigste Erreger dafür sind interessanterweise, wie schon für die chronische Kolonisierung beschrieben, in absteigender Reihenfolge nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae* [35, 37]. In fortgeschrittenen Stadien der COPD ändert sich das Erregerspektrum der bakteriell-induzierten Exazerbationen, so dass in Abhängigkeit zur Lungenfunktionsabnahme vermehrt *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriaceae* isoliert werden [46, 52]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass ein periodischer Anstieg der Konzentration chronisch kolonisierender, potentiell pathogener Bakterien keinen eigenständigen Mechanismus für die Exazerbation darstellt [53]. Vielmehr spielt die akute Infektion des unteren Respirationstraktes mit einem neuen Bakterienstamm, dessen Antigenstruktur bisher für den Wirt fremd ist und gegen den er noch keine Bakterienstamm-spezifische Immunabwehr gebildet hat, eine zentrale Rolle in der Pathogenese bakterieller COPD-Exazerbationen. So wurde gezeigt, dass die Infektion mit einem neuen Bakterienstamm von nicht-typisierbarem *H. influenzae*, *M. catarrhalis* oder *S. pneumoniae*, das Risiko für die Auslösung einer akuten Exazerbation mehr als verdoppelt [53, 54]. Allgemein zeigen gewöhnlich bakterielle im Vergleich zu nichtbakteriellen COPD-Exazerbationen eine signifikant stärkere neutrophile Atemwegsinflammation und eine intensivere systemische Inflammation [51]. Zudem korreliert ein purulentes verglichen mit einem mukoiden Sputum während der Exazerbation stark mit dem Nachweis von Bakterien im unteren Respirationstrakt [55].

## **2.2 *Moraxella catarrhalis***

### **2.2.1 Historischer Überblick**

*Moraxella catarrhalis* ist ein gram-negativer, unbekapselter Diplokokkus und wichtiger Erreger von Infektionskrankheiten des menschlichen Respirationstraktes [56, 57]. Seifert hat die Kokken scheinbar bereits 1882 zum ersten Mal im Sputum und in Nasensekreten von Patienten mit purulenter Tracheobronchitis als deren Ursache entdeckt [58, 59]. Doch erst 14 Jahre später, im Jahre 1896, erhielt der Diplokokkus erstmals durch Pfeiffer die Bezeichnung *Mikrokokkus catarrhalis* und wurde genauer als Erreger bei Erkrankungen der oberen Luftwege, fieberhaften Bronchitiden und Bronchopneumonien beschrieben [60]. Seit seiner Entdeckung wurde jedoch die pathogene Bedeutung von *M. catarrhalis*

kontrovers diskutiert. Während 1902 Ghon und Pfeiffer sowie auch 1905 Dunn und M. H. Gordon *M. catarrhalis* eindeutig als Atemwegspathogen einordneten [61, 62], richtete sich 1921 J. E. Gordon mit seiner Studie über den Nachweis von gram-negativen Kokken bei der allgemeinen Erkältungskrankheit und der Influenza gegen diese Auffassung und beurteilte den eigentlichen Wirkungsbereich von *M. catarrhalis* dem eines harmlosen Kommensalen gleichkommend [63]. Eine Schlussfolgerung, die auf den Nachweis von *M. catarrhalis* aus dem Rachen auch gesunder Erwachsener und auf die fehlende Pathogenität von Isolaten sowohl gesunder als auch symptomatischer Personen in Tierversuchen basierte [58, 63]. Unglücklicherweise versäumte diese Studie zwischen *M. catarrhalis* und *Neisseria cinerea*, einem häufigen Kommensalen des Respirationstraktes, zu unterscheiden [64] und verkannte die strikte Humanspezifität von *M. catarrhalis*, die generell für eine geringe Pathogenität in Tiermodellen verantwortlich ist [57]. Seitdem wurde jedoch *M. catarrhalis* jegliche Pathogenität aberkannt, so dass die meisten klinischen Labore vernachlässigten, Proben respiratorisch erkrankter Patienten auf die Existenz von *M. catarrhalis* zu prüfen [64, 65]. Erst mit Beginn der 90er Jahre wurde *M. catarrhalis* seine Bedeutung als humanpathogene Spezies wieder zugesprochen, was der Wiederentdeckung eines vormals kaum beachteten Organismus entspricht [58, 65, 66].

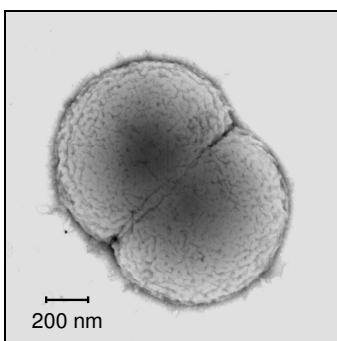
### 2.2.2 Taxonomische Klassifikation und Nomenklatur

Parallel zur Diskussion über die pathogene Rolle durchlief *M. catarrhalis* auch periodisch eine unterschiedliche Nomenklatur [65]. 1920 wurde der ursprünglich als *Mikrokokkus catarrhalis* bezeichnete Organismus wegen seiner phänotypischen und morphologischen Charakteristika dem Genus *Neisseria* der Familie *Neisseriaceae* zugeordnet und in *Neisseria catarrhalis* umbenannt [64, 65, 67]. Berger und Paepcke zeigten 1962, dass die Stämme der häufig zur *Neisseria catarrhalis* zugehörig erachteten Spezies auf der Basis von unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften bei Nitratreduktion und Tributyrinverwertung vielmehr in die zwei Spezies *Neisseria catarrhalis* oder *Neisseria cinerea* einteilbar waren [68]. Mit der Einführung von DNA-Technologien und ergänzenden phylogenetischen Studien erfuhr *N. catarrhalis* weitere Identitätskrisen. Bereits 1968 erkannten Henriksen und Bøvre anhand von Transformationsexperimenten und DNA-Hybridisierungen, dass *N. catarrhalis* genetisch enger mit Spezies der Gattung *Moraxella* und weniger der *Neisseria* verwandt ist [69]. 1970 bestätigte auch Catlin mittels DNA-DNA-Hybridisierungsstudien die geringe genetische Homologie von *N. catarrhalis* zu anderen *Neisseria*-Spezies [70]. Ungeachtet der genetischen Kompatibilität zu *Moraxella*-Spezies setzte er sich zur Abgrenzung zu *Neisseria*-Spezies allerdings mit der Einführung der neuen Gattung *Branhamella* in die Familie *Neisseriaceae* durch, in welche *N. catarrhalis* umbenannt in *Branhamella catarrhalis* eingeordnet wurde [70]. Letztlich zeigten aber fortgeschrittenere DNA-DNA- und rRNA-DNA-Hybridisierungsstudien sowie vergleichende 16S rDNA-Sequenzanalysen keinen rationalen Beleg für eine

abzugrenzende *Branhamella*-Gattung. Vielmehr bewiesen sie, dass der Erreger eine ausreichende genetische Ähnlichkeit mit anderen *Moraxella*-Spezies besitzt und damit bezeichnet als *Moraxella catarrhalis* gewöhnliche Kriterien zur Einordnung in die Gattung *Moraxella* der Familie *Moraxellaceae* in der Ordnung *Pseudomonadales* innerhalb der *Gammaproteobacteria*-Klasse erfüllt [57, 64, 65]. Somit ist seit Mitte der 90er Jahre die taxonomische Frage gelöst und der Name *Moraxella catarrhalis* wird favorisiert [56, 57].

### 2.2.3 Charakteristika und Identifizierung

*M. catarrhalis* ist ein aerobes, gram-negatives unbekapseltes und unbewegliches Bakterium [56, 57]. Der kokkenförmige Erreger ist im Durchmesser 0,5–1,5 µm groß und liegt typischerweise paarig mit einander zugekehrten abgeplatteten Seiten als kaffeebohnenförmiger Diplokokkus vor (Abbildung 2.3) [71]. *M. catarrhalis* kommt hauptsächlich extrazellulär vor, kann allerdings in Epithelzellen der Atemwege und des lymphatischen Rachengewebes eindringen und somit auch intrazellulär auftreten [72-74]. Die optimalen Wachstumsbedingungen für den Organismus liegen bei einer Temperatur von 35–37 °C und einem atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 3–10 % [56, 71]. *M. catarrhalis* lässt sich auf festen Standard-Labormedien wie Columbia-Blutagar, Kochblutagar (syn.: Schokoladenagar, *chocolate agar*), Mueller-Hinton-Agar oder Hirn-Herz-Infusions (*Brain Heart Infusion* (BHI))-Agar und in flüssigen Nährmedien wie Trypton-Soja- oder BHI-Bouillon erfolgreich kultivieren [56]. Die auf Blutagar entstehenden *M. catarrhalis*-Kolonien sind rund, konvex, gräulichweiß, opak, nicht hämolysierend und nach 24-stündiger Inkubation etwa 1–3 mm im Durchmesser groß. Charakteristischerweise lassen sie sich unversehrt mit einer Impföse auf der Agaroberfläche verschieben [56, 57]. In Flüssigmedien kann *M. catarrhalis* spontan autoagglutinieren und multizelluläre Aggregate bilden [66, 75].



**Abbildung 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines *M. catarrhalis*-Diplokokkus**

Die Abbildung zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines *M. catarrhalis*-Diplokokkus des Stammes ATCC 25238 mit typischerweise abgeplatteten aneinanderliegenden Seiten, wodurch die kaffeebohnenförmige Gestalt entsteht. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. D. J. Hill aus dem Institut für zelluläre und molekulare Medizin der Universität Bristol zur Verfügung gestellt und geringfügig modifiziert übernommen.

*M. catarrhalis* produziert die Enzyme Cytochromoxidase, Katalase, Desoxyribonuklease (DNAse) sowie Butyrat-Esterase [66, 71]. Der Erreger ist asaccharolytisch und reduziert typischerweise Nitrat und Nitrit weitgehend ohne Gasbildung [66, 71, 76]. Die gleichartigen morphologischen Merkmale sowie auch einige stoffwechselähnliche Eigenschaften zu *Neisseria*-Spezies führten in der Geschichte des Erregers zur häufigen



Fehlidentifikation von *M. catarrhalis* vor allem anstelle des verbreiteten asaccharolytischen Nasen-Rachen-Kommensalen *Neisseria cinerea* [65]. Heutzutage wird in der klinischen Routine-Diagnostik zur Identifizierung standardmäßig eine kulturelle Isolierung von *M. catarrhalis* aus den Proben auf Blutagar durchgeführt. Anschließend erfolgt die Bestimmung via Gramfärbung mit Nachweis von gram-negativen Diplokokken und via jeweils positiv ausfallendem Oxidase- und Tributyrin-Hydrolyse-Test [56]. Da allerdings außer *M. catarrhalis* auch andere *Moraxella*-Spezies positiv im Tributyrin-Hydrolyse-Test reagieren, gilt die Identifizierung von *M. catarrhalis* erst als gesichert, wenn jeweils mindestens ein Positivtest für die Butyrat-Esterase-Bildung bzw. Tributyrin-Hydrolyse, für die DNase-Produktion und für die Nitrat-/Nitritreduktion vorliegt [57].

#### 2.2.4 Epidemiologie und Kolonisation

*M. catarrhalis* ist ein ausschließlich humanpathogenes Bakterium [37, 56]. Die Übertragung erfolgt vermutlich durch kontaminiertes Atemwegssekret per Tröpfcheninfektion [77]. Der Erreger ist imstande, den Respirationstrakt des Menschen zu besiedeln, auch ohne dabei eine akute symptomatische Erkrankung auszulösen [64, 78]. Die Kolonisation mit *M. catarrhalis* entspricht einem dynamischen Prozess, der von häufigem Erwerb und Elimination unterschiedlicher *M. catarrhalis*-Stämme geprägt ist [39, 79]. Trotz einer im Serum und Sputum erwiesenen spezifischen Antikörperantwort gegen *M. catarrhalis* ist der Erreger in der Lage eine gewisse Zeit im Respirationstrakt zu kolonisieren. Hierbei kann die Kolonisationsdauer eines einzelnen Stammes ca. 1–3 Monate betragen [39, 79]. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Virulenzmechanismen von *M. catarrhalis* diskutiert, die dem Erreger ermöglichen, zu kolonisieren und sich einer Immunantwort des Wirtes zu entziehen (siehe Kapitel 2.2.7) [80, 81].

Die höchsten Kolonisationsraten finden sich bei Säuglingen und Kleinkindern. So sind durchschnittlich bis zu 75 % aller Kinder während ihres ersten Lebensjahres mit *M. catarrhalis* im Nasopharynx besiedelt [78, 82, 83]. Die Kolonisationsrate fällt schrittweise mit dem Alter ab. Gesunde Erwachsene sind nur noch in 1–3 % der Fälle mit *M. catarrhalis* im Respirationstrakt kolonisiert [57, 78]. Die Gründe für den inversen Zusammenhang zwischen Kolonisationsrate und Alter hängen vermutlich mit der altersabhängigen Entwicklung und Reifung des adaptiven Immunsystems mit Antikörperbildung zusammen [57, 78]. Angesichts des möglichen subepithelialen und intrazellulären Reservoirs von *M. catarrhalis* im lymphatischen Rachengewebe sind die Kolonisationsraten wahrscheinlich auch höher, als bislang berichtet wurde, da diese Kolonisationsnische durch die mikrobiologische Untersuchung von bisher üblicherweise verwendeten Atemwegssekreten oder Nasen-Rachenabstrichen nicht erfasst wird [74]. Weitere prädisponierende Faktoren, die mit einer Häufung der *M. catarrhalis*-Kolonisierung einhergehen, sind neben dem beschriebenen Säuglings- oder Kleinkind-

alter, auch ein niedriger sozioökonomischer Status, die Herbst- und Winterjahreszeit sowie eine geschwächte Immunabwehr bei chronischen Erkrankungen des Respirationstraktes wie v. a. der COPD [56, 64]. Letzteres wird damit belegt, dass erwachsene COPD-Patienten in bis zu 32 % der Fälle mit *M. catarrhalis* im Respirationstrakt kolonisiert sind und somit eine deutlich höhere Kolonisationsrate als gesunde Erwachsene aufweisen [39, 84, 85].

Die Kolonisation der Atemwege mit *M. catarrhalis* hat aber auch direkt klinisch relevante Auswirkungen für die betroffenen Kinder und COPD-Patienten. So steht bei Kindern die Häufigkeitsrate des Nachweises einer nasopharyngealen Kolonisation mit *M. catarrhalis* in direktem Zusammenhang mit der Häufigkeitsrate des Auftretens von akuten Mittelohrentzündungen [83, 86]. In Anbetracht der Pathogenese der Otitis media, die eine Migration von Erregern aus dem Nasopharynx über die Eustachische Tube in das sterile Mittelohr umfasst, erklärt sich obiger Zusammenhang [65, 87]. Eine nasopharyngeale Kolonisation mit *M. catarrhalis* in den ersten drei Lebensmonaten erhöht das Risiko für eine frühe erste Episode von Mittelohrentzündung innerhalb des ersten Lebensjahres signifikant stärker als eine frühe Besiedlung mit *S. pneumoniae* oder nicht-typisierbarem *H. influenzae* [83]. Außerdem ist die Kolonisation der Atemwege von asymptomatischen ein Monate alten Neugeborenen mit *M. catarrhalis* aber auch *S. pneumoniae* oder nicht-typisierbarem *H. influenzae* mit einem erheblich erhöhten Risiko assoziiert, im Alter von 5 Jahren an Asthma zu erkranken [88]. Bei COPD-Patienten fördert die Kolonisation des Respirationstraktes mit *M. catarrhalis* wie auch mit nicht-typisierbarem *H. influenzae* und *S. pneumoniae* in der stabilen Phase offenbar die Persistenz und Progression der entzündlichen Prozesse der COPD [36]. Dabei korreliert die bakterielle Kolonisation direkt mit klinischen Symptomen im Krankheitsverlauf der COPD. Bakteriell kolonisierte COPD-Patienten erleiden deutlich häufiger akute Exazerbationen [41] und verzeichnen in Abhängigkeit zur Konzentration der kolonisierenden Bakterien schwerere Verläufe mit stärkerer Atemwegsobstruktion als nicht kolonisierte COPD-Patienten [42-44].

### **2.2.5 *M. catarrhalis*-assoziierte Infektionskrankheiten**

Derzeitig ist *M. catarrhalis* für 15–20 % aller akuten Mittelohrentzündungen im Kindesalter verantwortlich und somit nach *S. pneumoniae* und nicht-typisierbarem *H. influenzae* der dritthäufigste bakterielle Erreger, der eine akute Otitis media bei Kindern verursacht [79, 86, 87]. Zudem können etwa 20 % der bakteriell bedingten Sinusitiden auf eine alleinige Infektion mit *M. catarrhalis* zurückgeführt werden [87]. Wohingegen bei Erwachsenen deutlich weniger, nur 2–4 %, der Sinusitiden durch *M. catarrhalis* verursacht werden [89]. Interessanterweise wird *M. catarrhalis* sogar als häufigster bakterieller Erreger von akuten Laryngitiden bei Erwachsenen diskutiert, da *M. catarrhalis* in 50–55 % der Laryngitisfälle isoliert werden kann [90].

Bei älteren Menschen ab ca. 60 Jahren und bei Erwachsenen mit zugrundeliegenden pulmonalen Veränderungen oder Erkrankungen kann *M. catarrhalis* auch die Ursache für Infektionskrankheiten des unteren Respirationstraktes wie Tracheitis, Bronchitis und Pneumonie [57, 91] sein. Insbesondere bei Patienten mit COPD spielt *M. catarrhalis* hinsichtlich der Pathogenese dieser Erkrankung und ihrer Exazerbationen eine wichtige Rolle [35, 39, 87]. *M. catarrhalis* verursacht etwa 10–15 % der akuten bakteriell induzierten Exazerbationen der COPD [35, 39]. Damit ist *M. catarrhalis* nach nicht-typisierbarem *H. influenzae* und vor *S. pneumoniae* der zweithäufigste Erreger als Auslöser für die infektexazerbierte COPD [35, 37, 87]. Wiederholte Infektexazerbationen sind laut aktuellen Untersuchungen weniger auf eine periodische Konzentrationserhöhung der chronisch die unteren Atemwege kolonisierenden Bakterien zurückzuführen [53]. Sondern vielmehr erhöht die Infektion des unteren Respirationstraktes mit einem neuen Bakterienstamm von *M. catarrhalis*, nicht-typisierbarem *H. influenzae* oder *S. pneumoniae* mit einer bisher für den Wirt unbekanntem Antigenstruktur das Risiko für die Auslösung einer akuten Exazerbation um mehr als das Doppelte [53, 54]. Dabei entwickelt nahezu die Hälfte der COPD-Patienten, die sich mit einem neuen *M. catarrhalis*-Stamm infiziert haben, klinische Symptome einer Exazerbation [39, 54, 87].

Sehr selten wird *M. catarrhalis* mit Infektionskrankheiten außerhalb des Respirationstraktes oder mit schwerwiegenden systemisch-invasiven Infektionen wie Bakteriämie, Meningitis, Endokarditis, Perikarditis, septische Arthritis oder Osteomyelitis in Verbindung gebracht [56, 57]. Gelegentlich werden auch Ausbrüche nosokomialer Infektionen mit *M. catarrhalis* beobachtet, die sich zumeist als Infektionskrankheiten des Respirationstraktes manifestieren und vorrangig auf pneumologischen Stationen und pädiatrischen Intensivstationen auftreten [64, 92].

### **2.2.6 Therapieresistenz, Therapie und Prävention von *M. catarrhalis*-assoziierten Infektionskrankheiten**

Bis Mitte der 70er Jahre ließen sich Infektionskrankheiten durch *M. catarrhalis* problemlos mit gebräuchlichen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Penicillinen behandeln. Seitdem schränkt jedoch die zunehmende Resistenzentwicklung mit Expression von  $\beta$ -Laktamasen den Einsatz von bisher gegen diesen Erreger wirksamen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ein [79, 93]. 1976 wurde in den USA der erste  $\beta$ -Laktamase-produzierende *M. catarrhalis*-Stamm isoliert [94]. Der darauf folgende weltweite rasante Anstieg in der Prävalenz von  $\beta$ -Laktamase-bildenden *M. catarrhalis*-Stämmen entspricht der schnellsten Resistenzentwicklung, die je bei einer Bakterienspezies beobachtet wurde [64, 65]. Derzeit liegt der Anteil der  $\beta$ -Laktamase-positiven *M. catarrhalis*-Stämme weltweit durchschnittlich bei über 95 % [56]. In Deutschland sind mittlerweile etwa 89,5 % der *M. catarrhalis*-Stämme  $\beta$ -Laktamase-Produzenten [95]. Die von *M. catarrhalis* exprimierten  $\beta$ -Laktamasen sind die sogenannten BRO  $\beta$ -Laktamasen [93, 94]. Der Kurzname BRO entstand aus der

Namenskombination von *Branhamella* und *Moraxella*, da diese  $\beta$ -Laktamasen bisher nur bei dem ehemals als *Branhamella catarrhalis* bezeichneten Erreger und zwei anderen *Moraxella*-Spezies (*M. nonliquefaciens* und *M. lacunata*) entdeckt wurden [94].

Mittel der Wahl für die Therapie von Infektionskrankheiten durch *M. catarrhalis* sind Kombinationen aus Penicillinen mit einem  $\beta$ -Laktamase-Inhibitor wie Sulbactam oder Clavulansäure (z. B. Ampicillin/Sulbactam oder Amoxicillin/Clavulansäure). Allerdings bleibt die Wirksamkeit einiger  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie beispielsweise der meisten Cephalosporine oder Carbapeneme trotz der BRO-Enzyme unbeeinträchtigt. Deshalb werden auch Zweit- und Drittgenerations-Cephalosporine mit erhöhter  $\beta$ -Laktamase-Stabilität (z. B. Cefuroxim-Axetil, Cefixim) aktuell für die Behandlung von *M. catarrhalis*-assoziierten Infektionskrankheiten empfohlen [87, 93, 96]. Carbapeneme (z. B. Imipenem) können zudem als Reserveantibiotika eingesetzt werden [96, 97]. Andere Antibiotikaklassen wie Makrolide (z. B. Erythromycin, Azithromycin), Tetrazykline (z. B. Doxycyclin) und Fluorchinolone (z. B. Levofloxacin, Moxifloxacin) sind ebenfalls noch gegen *M. catarrhalis* aktiv und werden alternativ zur Therapie empfohlen [56, 87, 96].

Zur zukünftigen Prävention von *M. catarrhalis*-assoziierten Infektionskrankheiten ist die Entwicklung eines Impfstoffes gegen diesen Erreger aktuell Gegenstand der Forschung. Im Fokus der Untersuchungen stehen verschiedene bekannte Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis*, die als potentielle Impfstoffantigene eine Antikörperantwort initiieren können [57, 98, 99]. Ein vollständiger Schutz vor *M. catarrhalis*-assoziierten Infektionskrankheiten durch die Immunisierung mit den identifizierten Oberflächenantigenen konnte jedoch bisher nicht ausreichend sicher *in vivo* gezeigt werden [98, 99]. Die wesentliche Ursache hierfür und insgesamt für die Schwierigkeiten in der Impfstoffentwicklung liegt in der strikten Humanpathogenität des Erregers, die das Fehlen eines geeigneten, aussagekräftigen Tiermodells für die *in vivo*-Forschung bedingt [87, 98].

### 2.2.7 Virulenzmechanismen

Das pathogene Potential entfaltet *M. catarrhalis* über ein komplexes und koordiniertes Zusammenspiel verschiedener Virulenzmechanismen, von denen nur einige beschrieben sind. Ein entscheidender initialer Virulenzmechanismus für die Kolonisation und Infektion mit *M. catarrhalis* ist die Fähigkeit des Erregers zur Adhäsion an Atemwegsepithelzellen [75, 80, 81]. Der Adhäsionsprozess stellt außerdem einen ersten Interaktionskontakt zwischen Erreger und Wirtszelle dar und trägt somit wesentlich zur Aktivierung der inflammatorischen Wirtsimmunantwort bei, deren Intensität und Effektivität auch maßgebend die Ausbildung einer symptomatischen Infektion mitbestimmt [100]. Nach erfolgter Adhäsion von *M. catarrhalis* scheinen die Fähigkeit zur Invasion in das Epithel [72-74] und zur Biofilmbildung auf der Epitheloberfläche zwei weitere Strategien von *M. catarrhalis* für die Kolonisation und Infektion zu sein [101]. Diese beiden Mechanismen schützen den Erreger darüber hinaus vermutlich einerseits vor der ausgelösten

extrazellulär vermittelten Immunabwehr des Wirtsorganismus sowie andererseits vor den Effekten einer Antibiotikatherapie und ermöglichen somit die Persistenz des Erregers im Respirationstrakt [102, 103]. *M. catarrhalis* hat allerdings noch weitere anspruchsvolle Mechanismen zur Umgehung und Modulation der Immunantwort des Wirtes entwickelt. Dazu gehören die Fähigkeit des Erregers, beispielsweise durch Bindung bestimmter Komplement- bzw. Regulatorproteine gegenüber der Komplement-vermittelten Bakteriolyse in humanem Serum resistent zu sein [104-106], das Vermögen, durch Wechselwirkung mit dem zellulären Rezeptor karzinoembryonales Antigen-verwandtes Zelladhäsionsmolekül 1 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1)) die proinflammatorische Wirtsabwehrreaktion zu reduzieren [107], sowie die Fähigkeit, durch Interaktion mit auf der B-Zelloberfläche exprimiertem IgD (IgD-B-Zellrezeptor) eine unspezifische IgM-Produktion und damit vermutlich eine von sich weggelenkte frühe adaptive Immunantwort zu aktivieren [108]. Für das Überleben und die Vermehrung von *M. catarrhalis* im Wirtsorganismus ist die Sicherung der bakteriellen Nährstoffaufnahme eine grundlegende Voraussetzung, die wiederum weitere Virulenzmechanismen bzw. Adaptationsstrategien an die wirtsbedingten Nährstoffverhältnisse erforderlich macht. Dementsprechend besitzt *M. catarrhalis* die Fähigkeit, das für das bakterielle Wachstum und viele Stoffwechselfunktionen essentielle Eisen, welches im humanen Wirtsorganismus jedoch nur in geringem Umfang ungebunden frei verfügbar ist, auch in seiner dort überwiegend vorliegenden komplexgebundenen Form aufzunehmen und zu verwerten [80, 109]. Das pathogene Potential unterstreicht *M. catarrhalis* insbesondere durch Virulenzmechanismen zur Schädigung der Wirtszelle. Dazu zählen die Fähigkeit des Erregers, durch die Interaktion mit CEACAM1 auch direkt die Apoptose der Alveolarepithelzellen zu induzieren [110], sowie die Fähigkeit, durch Neutralisation des Serinprotease-Inhibitors  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin eine gesteigerte wirtseigene proteolytische Aktivität auszulösen und dadurch indirekt eine Zellschädigung herbeizuführen [111]. All diese wichtigen Mechanismen, die die Pathogenität und Virulenz von *M. catarrhalis* charakterisieren, werden über verschiedene Virulenzfaktoren des Erregers vermittelt. Als ein unbekapselter, Exotoxin-freier, gram-negativer Erreger fungieren insbesondere Strukturelemente der äußeren Zellmembran wie zahlreiche integrale äußere Membranproteine (*outer membrane proteins* (OMPs)), Lipooligosaccharide (LOS) und Pili als Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* [56, 80, 81]. Im Folgenden wird speziell nur auf die in dieser Arbeit untersuchten drei Virulenzfaktoren ubiquitäres Oberflächenprotein (*ubiquitous surface protein* (Usp)) A1, UspA2 (Kapitel 2.2.7.1) und Lipooligosaccharid (LOS) (Kapitel 2.2.7.2) näher eingegangen.

### **2.2.7.1 Ubiquitous surface protein A1 und A2 (UspA1 und UspA2)**

Die beiden Oberflächenproteine UspA1 und UspA2 weisen ein homologes Epitop auf und bilden jeweils hochmolekulare oligomere Proteinkomplexe von über 250 kDa auf nahezu allen *M. catarrhalis*-Stämmen [64, 98, 112]. Das durch Sequenzanalyse abgeleitete

monomere Molekulargewicht beträgt von UspA1 88 kDa und von UspA2 62 kDa [112]. UspA1 und UspA2 sind zwar verwandte Proteine mit Sequenz- und Strukturähnlichkeiten, besitzen aber viele unterschiedliche biologische Funktionen für den Erreger [112, 113].

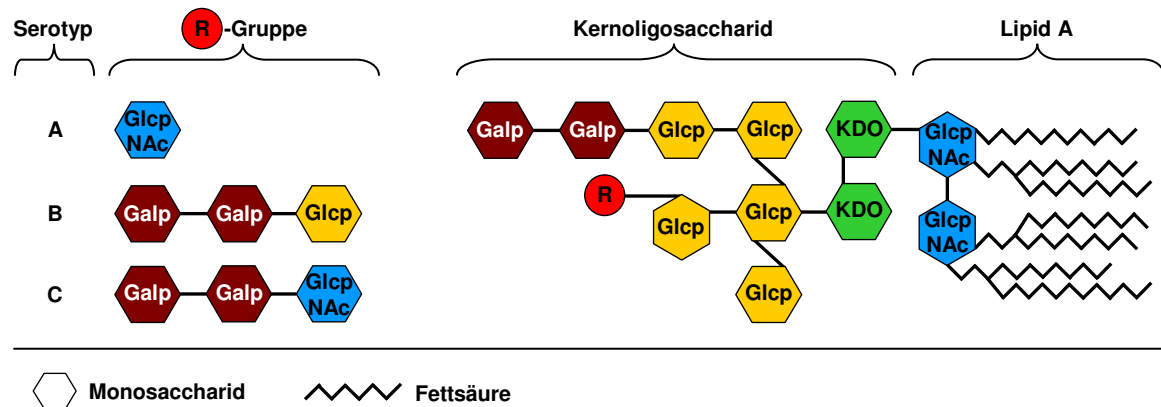
UspA1 ist ein Adhäsion und vermittelt die Anhaftung von *M. catarrhalis* an verschiedene humane Epithelzellen wie Konjunktival-, Larynx- und Alveolarepithelzellen [112, 114]. UspA1 aber auch UspA2 adhärirt zudem an die extrazellulären Matrixproteine Fibronectin [115] und Laminin [116]. Als einer der spezifischen Bindungspartner von UspA1 wurde der auf zahlreichen Epithelzellen, Endothelzellen und Leukozyten exprimierte CEACAM1 Rezeptor identifiziert [117]. Neben der Adhäsionsfunktion vermittelt die Bindung von UspA1 an CEACAM1 die Apoptose von Lungenepithelzellen [110]. Darüber hinaus führt die Interaktion von UspA1 und CEACAM1 zur Reduktion der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-vermittelten proinflammatorischen Immunantwort des Lungenepithels [107]. UspA1 ist auch für die Invasion von *M. catarrhalis* in Epithelzellen wichtig. Dabei spielt für die UspA1-vermittelte Internalisierung von *M. catarrhalis* die Interaktion zwischen UspA1 mit Zell-assoziiertem Fibronectin und mit dem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle [73]. Zudem scheint auch wieder die Bindung von UspA1 an CEACAM1 für die Invasion bedeutsam zu sein [118]. UspA1 ist außerdem an der Biofilmbildung beteiligt [119]. Sowohl UspA1 als auch UspA2 können den Serinprotease-Inhibitor  $\alpha 1$ -Antichymotrypsin binden und neutralisieren, wodurch eine für die Wirtszellen schädigende erhöhte Proteaseaktivität entsteht [111].

UspA2 bestimmt maßgeblich die Resistenz von *M. catarrhalis* gegenüber der Komplement-vermittelten Bakteriolyse in humanem Serum [112, 120]. Dazu bindet UspA2 den Komplement-Inhibitor C4b-bindendes Protein (C4BP), der bei der Bindung an die *M. catarrhalis*-Oberfläche seine inhibitorische Funktion beibehält und somit den klassischen Weg und den Lektin-Weg der Komplementaktivierung verhindert [105]. Desweiteren bindet UspA2 das Komplementprotein C3, das durch diese Oberflächenbindung absorbiert und neutralisiert wird, wodurch der alternative Aktivierungsweg der Komplementkaskade inhibiert wird [106]. Zwar kann auch UspA1 das Regulatorprotein C4BP und das Komplementprotein C3 binden, jedoch besitzt das UspA2 eine stärkere Bindungsaffinität zu diesen Proteinen und wird in höherer Dichte auf der Bakterienoberfläche exprimiert, so dass dem UspA2 eine dominantere Rolle für die Komplementresistenz zugeschrieben wird [105, 106]. Außerdem bindet UspA2 zusätzlich noch an den Komplement-Inhibitor Vitronectin, der auch an der *M. catarrhalis*-Oberfläche gebunden seine regulatorische Funktion ausübt und demzufolge die gemeinsame Endstrecke der Komplementaktivierungswege, die Bildung des Membranangriffskomplexes, inhibiert [104, 113]. Vitronectin kommt jedoch nicht nur als Komplement-Regulatorprotein im Serum, sondern auch als Adhäsionsprotein in der extrazellulären

Matrix vor, wodurch der Interaktion von UspA2 und Vitronektin zugleich eine Relevanz für die Zelladhäsion zukommt [113].

### 2.2.7.2 Lipooligosaccharid (LOS)

Das LOS ist ein hitzestabiler Hauptbestandteil der äußeren Membran von *M. catarrhalis* [64, 78, 80]. Es wird auch als Endotoxin bezeichnet, da es im Gegensatz zu bakteriellen Exotoxinen nicht aktiv sezerniert wird, sondern nur bei Zerfall, Teilung oder Wachstum der Bakterienzelle passiv aus der äußeren Membran freigesetzt wird [121]. Jedoch ist das Endotoxin LOS im engeren pharmakologischen Sinn kein Toxin, sondern löst inflammatorische Alarmreaktionen aus, die primär lediglich der Infektionsabwehr dienen [122]. Das LOS hat ein Molekulargewicht von ca. 2,5–4 kDa [87]. Die Namensgebung Lipooligosaccharid verweist auf dessen chemische Struktur. Es ist ein amphiphiles Molekül, das aus zwei strukturellen Komponenten, dem hydrophoben Lipid A und dem hydrophilen Kernoligosaccharid, besteht (Abbildung 2.4) [64, 80, 123]. Die lange variable O-spezifische Polysaccharidseitenkette mit sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten, das sogenannte O-Antigen, das für das sonst typischerweise exprimierte Lipopolysaccharid (LPS) anderer gram-negativer Bakterien charakteristisch ist, fehlt dem *M. catarrhalis*-LOS [64, 80, 123]. Das Lipid A verankert das LOS-Molekül in der äußeren Membran und ist der am höchsten konservierte sowie „toxisch“ bzw. biologisch wirksame Bestandteil des LOS [121, 123]. Das Lipid A von *M. catarrhalis*-LOS besteht aus einem Disaccharid-Grundgerüst aus N-Acetylglucosaminphosphat, an das über Ester- und Amidbindungen sieben gesättigte Fettsäuren gebunden sind [123]. Das Kernoligosaccharid setzt sich neben dem Ketodesoxyoctonsäuren-Dimer aus acht bis zehn phosphorylierten Einzelzuckern wie Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin zusammen, die in drei Verzweigungen definiert angeordnet vorliegen. Ein Zweig des LOS-Kernoligosaccharides weist allerdings strukturelle bzw. antigenetische Variationen der endständigen Zuckersequenz auf, deren differentieller Nachweis die Basis für eine Serotypisierung von *M. catarrhalis* ist [57, 123]. Die Mehrheit der *M. catarrhalis*-Stämme, 61 %, exprimiert den LOS-Serotyp A, 29 % der Stämme weisen Serotyp B und nur 5 % Serotyp C auf. Die restlichen 5 % der *M. catarrhalis*-Stämme können nicht zugeordnet werden [124].



**Abbildung 2.4: Chemische Struktur des *M. catarrhalis*-LOS und dessen drei Serotypen A, B und C**

Das LOS von *M. catarrhalis* besteht aus dem verzweigten Kernoligosaccharid und dem Lipid A. Die drei *M. catarrhalis*-LOS-Serotypen A, B und C unterscheiden sich in der Zusammensetzung einer endständigen Zuckersequenz (R-Gruppe) eines Kernoligosaccharid-Zweiges. Galp, Galactosephosphat; Glcp, Glucosephosphat; GlcpNAc, N-Acetylglucosaminphosphat; KDO, Ketodesoxyoctonsäure. Die Abbildung ist modifiziert nach De Vries et al. 2009 [80].

Das LOS bzw. Strukturbestandteile des LOS spielen eine entscheidende Rolle für die Adhäsion von *M. catarrhalis* an unterschiedliche Epithelzellen wie Konjunktival-, Zervix-, Alveolar- [125] und Pharynxepithelzellen [126]. Auch für die Invasion von *M. catarrhalis* in Epithelzellen ist das LOS bedeutsam [73]. Darüber hinaus ist das LOS für die Resistenz von *M. catarrhalis* gegenüber der Komplement-vermittelten Bakteriolyse in humanem Serum wichtig [125]. Dabei ist noch unklar, ob das LOS direkt an der Adhäsion, Invasion und Komplementresistenz beteiligt ist oder eher indirekt auf all diese Mechanismen wirkt. Für letzteres spricht, dass die LOS-Struktur in der *M. catarrhalis*-Membran vermutlich das Expressionsprofil der OMPs, einschließlich der Adhäsions- und Invasionsmoleküle sowie der Komplementresistenz-vermittelnden Faktoren, beeinflusst [73, 125].

## 2.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem von Lebewesen, das diese zur Bewahrung ihrer Unversehrtheit gegen unterschiedliche eindringende Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten sowie gegen entartete endogene Zellen und Schadstoffe schützt [127, 128]. Dabei umfasst das Immunsystem die Gesamtheit eines komplex interagierenden Netzwerkes, das aus mehreren Organen, Zellarten und Molekülen besteht, um die Abwehrprozesse einzuleiten, zu koordinieren und erfolgreich abzuschließen. Die Voraussetzung für das Einsetzen der Abwehrprozesse liegt in der Fähigkeit des Immunsystems, „selbst“ und „nicht-selbst“ sowie „ungefährlich“ und „gefährlich“ voneinander zu unterscheiden [128-130]. Bei den höher entwickelten Vertebraten bildeten sich im Zuge der Evolution zwei eng miteinander wechselwirkende Abwehrsysteme aus. So wird bei Vertebraten zum einen das angeborene Immunsystem und zum anderen das vom angeborenen abhängige erworbene Immunsystem



differenziert [131]. Das phylogenetisch sehr alte angeborene Immunsystem ist in allen mehrzelligen Organismen vorzufinden und bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Individualentwicklung des Organismus voll funktionsfähig. Es besitzt als primäre Abwehrform eine kurze Reaktionszeit bis zur Einleitung der Effektormechanismen sowie eine geringe Spezifität [129, 131, 132]. Das phylogenetisch jüngere erworbene bzw. adaptive Immunsystem entstand vor ca. 500 Millionen Jahren nur in den Vertebraten zusätzlich neben dem angeborenen Immunsystem und wird von letzterem aktiviert. Im Laufe des Lebens eines Wirbeltierorganismus bildet sich das erworbene Immunsystem individuell und hochspezifisch als Anpassung an Auseinandersetzungen mit definierten Antigenen aus. Dabei entwickelt es zugleich auch ein spezifisches immunologisches Gedächtnis für diese Antigene, das bei Zweitkontakt mit den gleichen Antigenen schnellere und effizientere adaptive, spezifische Immunreaktionen ermöglicht [131, 133]. Im weiteren Verlauf wird auf die Mechanismen des angeborenen Immunsystems und anschließend auf die für diese Arbeit wesentlichen Bestandteile der angeborenen Immunabwehr fokussiert.

### 2.3.1 Angeborenes Immunsystem

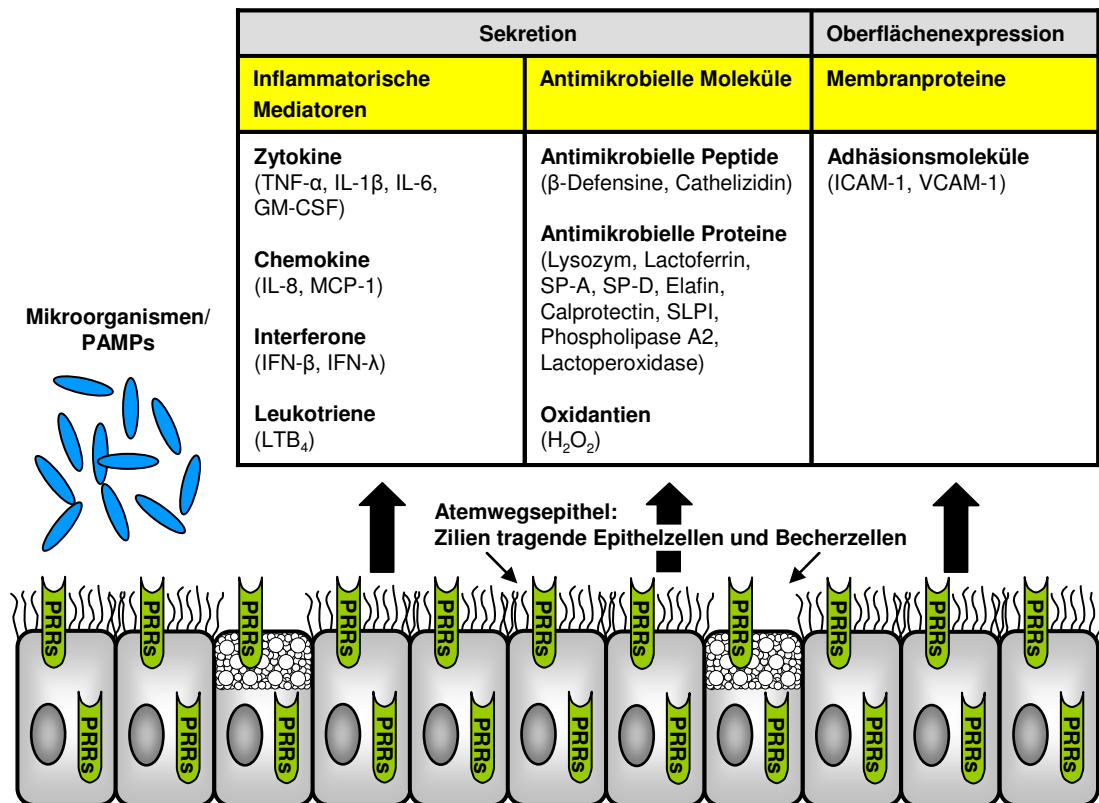
Das angeborene Immunsystem stellt die erste sofortige Abwehrfront gegen invadierende Mikroorganismen dar. Dabei umfassen die angeborenen Abwehrfunktionen im Allgemeinen (I) die initiale Pathogenerkennung, (II) die erste inflammatorische und antimikrobielle Immunreaktion sowie (III) nachfolgend die Aktivierung einer adäquat angepassten spezifischen, erworbenen Immunantwort [129, 134]. Die angeborene Pathogendetektion basiert auf der Erkennung nahezu unveränderlicher, hoch konservierter, mikrobieller Moleküle, sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*pathogen-associated molecular pattern* (PAMP)), durch eine begrenzte Anzahl keimbahnkodierter, mustererkennender Rezeptoren (*pattern recognition receptor* (PRR)) [129, 134, 135]. Mehrere verschiedene Rezeptortypen der PRRs, die unterschiedliche PAMPs binden, sind konstitutiv zugleich membranständig und zytosolisch in Phagozyten, Endothel- sowie Epithelzellen exprimiert und liegen außerdem auch löslich im Blutplasma und in der Interstitialflüssigkeit vor (näheres siehe Kapitel 2.3.3). Somit wird eine große Bandbreite eindringender Mikroorganismen bereits an der Oberfläche der Epithel-/Endothelbarriere oder nach Überwindung bzw. Invasion der Epithel-/Endothelbarriere schnell detektiert [129, 134, 135]. Unmittelbar durch die PAMPs bzw. ihre Erkennung via PRRs werden angeborene Immunreaktionen aktiviert. Zur Bekämpfung extrazellulärer Mikroorganismen werden eine gesteigerte Phagozytoseaktivität sowie eine Komplementaktivierung initiiert [129, 136]. Darüber hinaus werden antimikrobielle Peptide und inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Interferone aus den Phagozyten, Epithel- und Endothelzellen freigesetzt. Diese Mediatoren steuern wiederum die Rekrutierung und Sekretionsaktivität weiterer Immuneffektorzellen [129, 134, 137]. Intrazelluläre Erreger, die vielen Abwehrreaktionen der angeborenen Immunantwort

entgehen können, werden nach Pathogenerkennung durch einsetzende zellautonome angeborene intrazelluläre Resistenzmechanismen wie beispielsweise Autophagie, Produktion von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmetaboliten sowie phagolysosomale Degradation bekämpft [138]. Die sofortigen angeborenen Immunreaktionen genügen zumeist, um die Infektionsausbreitung zu verhindern. Ansonsten aktiviert die angeborene Immunantwort zusätzlich eine passende erworbene Immunantwort [129, 139, 140]. Eine Schlüsselrolle hierfür spielen die Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten. Insbesondere die dendritischen Zellen generieren durch die Präsentation von Antigenen phagozytierter Pathogene auf Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex* (MHC))-Molekülen, durch eine PAMP-induzierte Expression kostimulierender Moleküle (CD80, CD86) auf der Zelloberfläche sowie durch die Sekretion bestimmter Zytokine die für die Aktivierung, Selektion, Differenzierung und Proliferation der T-Lymphozyten essentiellen Signale. Auf diese Weise wird die durch T-Lymphozyten-vermittelte zelluläre Immunität direkt stimuliert und darüber indirekt die humorale Immunität mit Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern aus B-Lymphozyten initiiert [129, 139, 140].

### **2.3.2 Die Rolle des respiratorischen Epithels in der angeborenen Immunabwehr**

Das Atemwegs- und Alveolarepithel kleidet die ca. 150 m<sup>2</sup> große innere Oberfläche des Respirationstraktes aus und bildet daher eine riesige Grenzfläche zwischen innerem Milieu des Wirtsorganismus und externer Umgebung. Damit steht das Atemwegsepithel ständig in Kontakt mit aerogen übertragbaren potentiell pathogenen Erregern und stellt eine erste wichtige sofortige Verteidigungslinie der angeborenen Immunabwehr des Respirationstraktes dar [141, 142]. Im Abwehrsystem des Respirationstraktes fungiert das respiratorische Epithel einerseits durch den strukturell kontinuierlichen, über *tight junctions* verankerten Zellverband als physikalische Barriere gegen die externe Umwelt [143]. Andererseits stellt die Zellkombination aus Mukus sezernierenden Becherzellen und Zilien tragenden Zellen im tracheobronchialen Epithel der zentralen Atemwege die mukoziliäre Reinigungsfunktion sicher. So bleiben viele inhalierte Mikroorganismen in der dem Epithel aufliegenden viskösen Mukusschicht hängen und werden via Sekretfluss durch den rachenwärts gerichteten Zilienschlag aus dem Respirationstrakt befördert [143, 144]. Zusätzlich sezerniert das Atemwegsepithel und das den Alveolarraum der Lunge auskleidende Alveolarepithel kontinuierlich antimikrobielle Faktoren in das Atemwegs- bzw. Alveolarsekret, so dass dieses eine chemische Barriere gegen invadierende Pathogene bildet [143]. Da diese Mechanismen konstitutiv aktiv vorhanden sind, wurde dem respiratorischen Epithel lange Zeit lediglich nur eine passive Barrierefunktion in der angeborenen Immunabwehr zugeschrieben. Diese enge Sichtweise musste durch zahlreiche neuere Untersuchungen revidiert werden. Nunmehr steht fest, dass die Atemwegs- und Alveolarepithelzellen auch induzierbare Effektormechanismen der

angeborenen Immunantwort generieren [143-145]. Wie die klassischen Immunzellen (z. B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten) sind die Atemwegs- und Alveolarepithelzellen mit vielen unterschiedlichen PRRs ausgestattet und daher zur schnellen Erkennung hoch konservierter, mikrobieller Bestandteile (PAMPs) fähig (siehe Kapitel 2.3.3) [141, 143-145]. Die Pathogendetektion induziert die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Interferonen und antimikrobiellen Peptiden aus den Atemwegs- bzw. Alveolarepithelzellen sowie eine gesteigerte Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf den Epithelzellen (siehe Abbildung 2.5). Durch Sekretion bzw. Expression dieser löslichen und Membran-assoziierten Mediatormoleküle sind die Atemwegsepithelzellen in der Lage weitere Entzündungszellen zu rekrutieren und zu aktivieren sowie Pathogene abzutöten [141, 143-145]. Zudem werden die Epithelzellen auch selbst durch ihre oder von aktivierten Immunzellen freigesetzten Zytokine zur weiteren Sekretion von Mediatorsubstanzen stimuliert [144, 145]. Über komplexe Rückkopplungsmechanismen reguliert können aktivierte Epithelzellen jedoch eine überschießende inflammatorische Immunreaktion durch die Freisetzung von antiinflammatorisch wirksamen Molekülen eindämmen [142, 146]. Somit wird insgesamt deutlich, dass die Atemwegs- bzw. Alveolarepithelzellen eine zentrale, aktive Rolle bei der Induktion, Regulation und Koordination der lokalen Inflammation und angeborenen Immunantwort des Respirationstraktes spielen [141, 144, 146].



**Abbildung 2.5: Induzierbare angeborene Immunantwort des Atemwegsepithels**

Die Atemwegsepithelzellen exprimieren zellmembranständige und intrazelluläre PRRs, mit denen sie die PAMPs bei einer Infektion mit Mikroorganismen detektieren können. Diese direkte Pathogenerkennung aktiviert die Epithelzellen und induziert die Sekretion von zahlreichen inflammatorischen Mediatoren und antimikrobiellen Molekülen aus den Atemwegsepithelzellen sowie eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Epithelzellen. Die Abbildung fokussiert hierbei auf lösliche und Membran-assoziierte Effektormoleküle, die vor allem die angeborene Immunantwort vermitteln und verstärken. GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Wasserstoffperoxid; ICAM, *intercellular adhesion molecule*; IFN, *Interferon*; IL, *Interleukin*; LT, *Leukotrien*; MCP, *monocyte chemotactic protein*; PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*; PRRs, *pattern recognition receptors*; SLPI, *secretory leukocyte proteinase inhibitor*; SP, *Surfactantprotein*; TNF, *Tumornekrosefaktor*; VCAM, *vascular cell adhesion molecule*. Die Abbildung ist modifiziert nach Kato & Schleimer 2007 und Bals & Hiemstra 2004 [141, 146].

### 2.3.3 Mustererkennende Rezeptoren (*Pattern recognition receptors* (PRRs))

Die Voraussetzung zur Initiation der Immunantwort ist die Fähigkeit zur Erkennung der Pathogene und damit verbunden die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ [129]. Dabei beruht die Pathogendetektion des angeborenen Immunsystems hauptsächlich auf einer limitierten Anzahl keimbahnkodierter, mustererkennender Rezeptoren (*pattern recognition receptors* (PRRs)), die nach dem von Charles Janeway formulierten Modell Pathogen-assoziierte molekulare Musterstrukturen (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)) erkennen bzw. binden [129, 135]. Diese PAMPs

sind in ihrer chemischen Struktur sehr unterschiedlich. Sie besitzen aber im Wesentlichen drei identische Charakteristika, die sie zu idealen Zielmolekülen machen, anhand derer die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ sowie die Erkennung einer Vielzahl heterogener Mikroorganismen durch verhältnismäßig wenige, genetisch festgelegte PRRs realisierbar ist: (I) Sie werden nur von den Mikroorganismen und nicht vom Wirtsorganismus gebildet. (II) PAMPs kommen evolutionär hoch konserviert in einer Vielzahl der Mikroorganismen vor und sind für gewisse Klassen von Mikroorganismen (z. B. gram-negative, gram-positive Bakterien, Mykobakterien, Pilze) sogar kennzeichnend. (III) Sie sind für das Überleben der Mikroorganismen essenziell, wodurch eine Mutation oder ein Verlust der PAMPs nur eingeschränkt möglich ist und häufig zum Tod oder zu einer extrem reduzierten Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen führt [140]. Zu den PAMPs zählen u. a. bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS, Lipoteichonsäuren, Peptidoglykane und Lipoproteine, Flagellin sowie bakterielle oder virale Nukleinsäuren [134, 140]. Neben den PAMPs werden von PRRs auch endogene Moleküle erkannt, die bei Zellstress oder Zellschädigung von der Wirtszelle freigesetzt werden und als sogenannte Gefahr- (oder Schaden-) assoziierte molekulare Muster (*danger- (or damage-) associated molecular patterns* (DAMPs)) bezeichnet werden. Zu diesen DAMPs gehören z. B. endogene Nukleinsäuren, Hitzeschockproteine, *high mobility group box 1 protein* (HMGB1), S100-Proteine, Hyaluronsäure, Adenosintriphosphat (ATP) und Harnsäurekristalle [130, 145].

Die PRRs werden konstitutiv von einer Vielzahl von verschiedenen Wirtszellen sowohl in der Zell- und Endosomenmembran als auch im Zytoplasma exprimiert. Auf diese Weise können extra- und intrazelluläre Krankheitserreger gleichzeitig von vielen unterschiedlichen Zellen erkannt und damit auch parallel verschiedenen zellspezifischen Immunantworten ausgesetzt werden. Außerdem werden PRRs auch konstitutiv von einigen Wirtszellen in die Körperflüssigkeiten (Blut, Gewebsflüssigkeit) sezerniert. Gemäß ihrer Lokalisation erfolgt demnach eine Einteilung in (I) lösliche, (II) membranständige und (III) zytoplasmatische PRRs [129, 136]. Zu den löslichen PRRs gehören z. B. Lipidtransferasen, Pentraxine, Komplementfaktoren und lösliche *C-type lectin* Rezeptoren (CLRs). Membranständige PRRs umfassen die Toll-*like* Rezeptoren (TLRs) (siehe Kapitel 2.3.3.1), die transmembranen *C-type lectin* Rezeptoren (CLRs) und die *Scavenger* Rezeptoren (SRs). Zu den zytoplasmatischen PRRs zählen die *Nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like* Rezeptoren (NLRs), die *Retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-I)-*like* Rezeptoren (RLRs) sowie zytosolische DNA-erkennende Rezeptoren [129, 135, 136].

Nach Ligandenbindung regulieren die PRRs unterschiedliche Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems. Lösliche PRRs vermitteln die Opsonierung von PAMPs und damit eine erleichterte PAMP-Erkennung durch membranständige PRRs sowie den Transfer von PAMPs zu weiteren PRRs und die Aktivierung der Komplementkaskade

[129, 136]. Der Großteil der membranständigen PRRs induziert die Phagozytose von Pathogenen sowie zum Teil von apoptotischen Zellen [147-149]. Darüber hinaus aktivieren viele membranständige sowie auch zytoplasmatische PRRs verschiedene Signalkaskaden, die nachfolgend transkriptionell die Expression der inflammatorischen Zytokine, Chemokine, Interferone, kostimulatorischen Oberflächenmoleküle, Adhäsionsmoleküle und antimikrobiellen Moleküle steuern. Zusätzlich initiieren einige zytoplasmatische PRRs Signalkaskaden, die auch post-translationell die Prozessierung von bestimmten Zytokinen regulieren. Im Einzelnen unterscheiden sich die jeweiligen Rezeptortypen der membranständigen und zytoplasmatischen PRRs in den von ihnen ausgehenden Signalkaskaden [134, 135]. Zunehmend wird auch einigen membranständigen und zytosolischen PRRs eine wesentliche Rolle für die Regulation des programmierten Zelltodes, der Antigenprozessierung und -präsentation sowie der zellautonomen, angeborenen Mechanismen zur Abwehr von intrazellulären Erregern wie der Phagolysosomen-Reifung und Autophagie zugeschrieben [147, 150-152].

### 2.3.3.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Das Toll Protein gilt als Ursprungprotein der Toll-like Rezeptor Familie und wurde erstmalig 1985 als ein für die dorsoventrale Polarisation in der Embryogenese der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wichtiges Genprodukt identifiziert [153]. Darauf folgende Untersuchungen ergaben interessanterweise, dass das Toll Protein zudem für *Drosophila* eine entscheidende Funktion in der angeborenen Immunabwehr gegen Pilze [154] und gram-positive Bakterien ausübt [155]. Seitdem konnten auch in anderen mehrzelligen Organismen dem *Drosophila* Toll Protein homologe Proteine, die als Toll-like Rezeptoren klassifiziert wurden, aufgefunden und funktionell als wichtige, evolutionär hoch konservierte Bestandteile des angeborenen Immunsystems charakterisiert werden [156]. 1997 entdeckten Medzhitov et al. das erste humane Toll-Homolog, das heute als Toll-like Rezeptor 4 bekannt ist [157]. Bisher wurden insgesamt 13 Toll-Homologe in Säugetieren identifiziert, von denen TLR1 bis 10 im Menschen vorkommen [158]. TLRs sind Typ I Transmembran-Glykoproteine, die entweder die Zelloberflächenmembran oder intrazellulär die Endosomenmembran durchziehen. Sie sind gekennzeichnet durch eine extrazelluläre oder intraendosomale, N-terminale, aus Leucin-reichen Wiederholungseinheiten (*leucin rich repeats* (LRR)) bestehende Domäne für die Ligandenbindung, eine Transmembran-Domäne und eine zytoplasmatische, C-terminale, der intrazellulären Domäne des Interleukin-1-Rezeptors (IL-1R) homologe Domäne, die sogenannte Toll/IL-1R (TIR)-Domäne, für die Initiation der Signaltransduktion [134, 135]. TLRs werden von Zellen des angeborenen (z. B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen) und des erworbenen Immunsystems (z. B. B-Zellen, spezifische T-Zell-Subtypen) sowie von Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen in unterschiedlichem Ausmaß und Muster exprimiert. Ihre zelluläre Expression kann dabei als Reaktion auf Pathogene, Zytokine und andere Stimuli

schnell angepasst werden [144, 159]. TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 sind vorrangig in der Zellmembran lokalisiert, wohingegen TLR3, 7, 8 und 9 intrazellulär in der Endosomenmembran exprimiert werden [135, 158]. Unter Bildung von Homo- oder Heterodimeren oder im Komplex mit Ko-Rezeptoren und akzessorischen Molekülen erkennen die TLRs verschiedene PAMPs von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten sowie auch einige wirtseigene DAMPs [136, 158, 160]. Dabei erkennen die Zellmembranlokalisierten TLRs mit Ausnahme von TLR10, für den bisher kein Ligand ermittelt werden konnte, vor allem Bestandteile der mikrobiellen Zellwand (z. B. LPS, Lipoprotein, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Zymosan, Mannan) sowie Komponenten mikrobieller Oberflächenstrukturen (z. B. Flagellin). Demgegenüber detektieren Endosomenmembranlokalisierte TLRs insbesondere virale und bakterielle Nukleinsäuren (z. B. dsRNA, ssRNA, unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-DNA-Motive) [135, 158]. Im weiteren Verlauf werden die für diese Arbeit wichtigen TLRs, TLR2 (Kapitel 2.3.3.1.1) und TLR4 (Kapitel 2.3.3.1.2), und ihre Expression im respiratorischen Epithel näher betrachtet.

### 2.3.3.1.1 Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)

TLR2 erkennt eine Vielzahl von PAMPs unterschiedlicher Mikroorganismen. Dazu gehören beispielsweise Lipopeptide verschiedenster Erreger, Lipoteichonsäure (*lipoteichoic acid* (LTA)) von gram-positiven Bakterien, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Zymosan von Pilzen, Glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-Mucin von Trypanosomen und Hämagglutinin-Protein von Masernviren [158]. Zudem erkennt der TLR2 atypische Formen des LPS, die von *Leptospira interrogans* [161], *Porphyromonas gingivalis* [162] und *Legionella pneumophila* [163] exprimiert werden. Dabei unterscheiden sich diese atypischen LPS-Formen von den klassischen LPS-Typen enterobakterieller gram-negativer Erreger vor allem im strukturellen Aufbau ihrer Lipid A-Komponente durch längere Fettsäure-Ketten und verschiedene Substituenten der Fettsäuren [163]. Die Fähigkeit des TLR2, die vielen strukturell sehr verschiedenen Liganden unterscheiden und binden zu können, lässt sich teilweise durch dessen Heterodimerbildung mit TLR1 oder TLR6 oder durch dessen Assoziation mit anderen nicht-TLR PRRs wie dem *Scavenger* Rezeptor *cluster of differentiation* (CD)36, dem membranständigen oder löslichen Glykoprotein CD14, den membranständigen *C-type lectin* Rezeptoren Dectin-1 oder Mannose-Rezeptor sowie den Gangliosidrezeptoren asialoGM1 oder GD1a erklären [158, 164].

Die mRNA-Expression sowie die zellmembranständige Proteinexpression des TLR2 konnten in humanen primären Atemwegsepithelzellen [165-167] und humanen primären Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden [168, 169]. Gleichermäßen konnte bereits in vorherigen Untersuchungen die TLR2-Expression auf der Zelloberfläche auch für die in dieser Arbeit eingesetzten humanen primären Bronchialepithelzellen (*primary bronchial epithelial cells* (PBEC)) [107] sowie für die verwendeten Zelllinien humane

Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B [170] und humane Typ II-Alveolarepithelzelllinie A549 gezeigt werden [72, 107].

### **2.3.3.1.2 Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)**

TLR4 ist der wesentliche Rezeptor für die Erkennung des LPS, einem Hauptbestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, dessen hoch konservierte aktivierende Komponente das Lipid A darstellt [158]. Allerdings ist TLR4 nicht als einziger Rezeptor an der Erkennung von LPS beteiligt. Vielmehr benötigt TLR4 zur sensitiven LPS-Detektion die koordinierte Interaktion von akzessorischen Molekülen und Ko-Rezeptoren einschließlich löslichem LPS-bindendem Protein (LBP), membran-gebundenem oder löslichem CD14 und TLR4-assoziiertem, myeloidem Differenzierungsfaktor (MD)-2 [129, 171]. Neben der Erkennung von LPS ist TLR4 auch an der Detektion weiterer mikrobieller Bestandteile wie Mannan von Hefepilzen, Pneumolysin von Pneumokokken, viralen Hüllenproteinen aber auch endogenen Wirtskomponenten wie Hitzeschockproteinen beteiligt [158].

Im Gegensatz zur üblichen zellmembranständigen TLR4-Lokalisation bei den Immunzellen scheint bei den Atemwegs- und Alveolarepithelzellen, ein davon abweichendes zelluläres TLR4-Expressionsprofil zu existieren. So konnte interessanterweise für die humanen primären Atemwegsepithelzellen eine vorrangig intrazelluläre [172] und eine auf der basolateralen Membran lokalisierte TLR4-Expression nachgewiesen werden [167]. Gleichsam konnte auch für die humanen primären Alveolarepithelzellen die TLR4-Expression in intrazellulären Zellkompartimenten, aber auch zusätzlich auf der Zelloberfläche gezeigt werden [173]. Für die in dieser Arbeit verwendete humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B konnte der TLR4 bisher ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert nachgewiesen werden [172]. Während für die eingesetzte humane Typ II-Alveolarepithelzelllinie A549 sowohl eine intrazelluläre [172, 174] als auch eine auf der Zelloberfläche orientierte TLR4-Expression ermittelt werden konnte [174]. Darüber hinaus werden die TLR4-Ko-Rezeptoren MD-2 und membranständiges CD14 von den humanen primären Atemwegs- und Lungenepithelzellen als auch von den humanen BEAS-2B- und A549-Zelllinien nur in geringem Umfang konstitutiv oder teilweise auch gar nicht exprimiert [170, 172, 173, 175]. Somit besitzt das Atemwegsepithel vermutlich ein dem Umstand, ständig aerogener Erreger ausgesetzt zu sein, angepasstes organspezifisches TLR- und Ko-Rezeptoren-Expressionsprofil, um möglicherweise einer chronischen Entzündungsreaktion der Atemwege und Lunge vorzubeugen [143, 172, 175]. Damit einhergehend konnte für Atemwegsepithelzellen *in vitro* eine LPS-Hyporesponsivität beobachtet werden, wobei nur hohe LPS-Konzentrationen das Atemwegsepithel zu aktivieren vermochten [172, 175-177]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass in Atemwegs- und Alveolarepithelzellen unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen die TLR4-Expression verstärkt

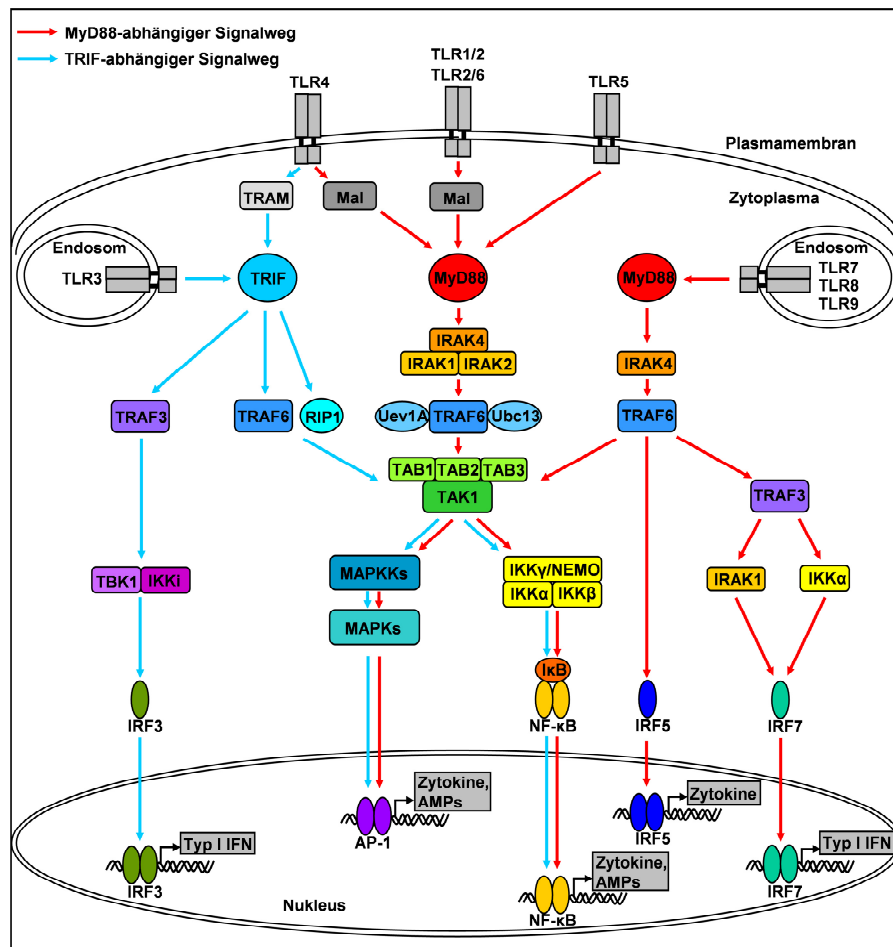


zellmembranständig lokalisiert wird und MD-2 gesteigert exprimiert wird, woraufhin eine deutliche LPS-stimulierte Immunantwort vom Atemwegs- bzw. Lungenepithel erfolgte [175, 178]. Zudem führt bei Atemwegs- und Lungenepithelzellen *in vitro* die Zugabe von Serum, in welchem die TLR4-akzessorischen Moleküle und Ko-Rezeptoren LBP, lösliches CD14 und MD-2 enthalten sind, zu einer stimulatorischen Wirkung von bereits geringen physiologisch relevanten LPS-Konzentrationen [176, 177].

### 2.3.4 Die TLR-vermittelte Signaltransduktion

Die Ligandenbindung an die extrazelluläre LRR-Domäne eines entsprechenden TLR führt zunächst zu dessen Dimerisierung [134]. Die darauffolgende Konformationsänderung der Rezeptoren ermöglicht die Rekrutierung intrazellulärer TIR-Domäne-enthaltender Adaptermoleküle an die zytoplasmatischen TIR-Domänen des TLR-Dimers. Dabei ist die differentielle Rekrutierung der vier TIR-Domäne enthaltenden Adaptermoleküle *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *MyD88-adaptor-like protein* (Mal), *TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$*  (TRIF) und *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) maßgeblich für die Aktivierung unterschiedlicher TLR-vermittelter Signaltransduktionswege verantwortlich (Abbildung 2.6) [158, 160, 179]. Alle TLRs mit Ausnahme von TLR3 aktivieren die nachfolgenden Signalwege über die Rekrutierung des Adapterproteins MyD88. TLR2/1, TLR2/6 und TLR4 nutzen zusätzlich das Adaptermolekül Mal als Bindeglied für die Rekrutierung von MyD88 [158, 179]. Im MyD88-abhängigen Signalweg erfolgt unter Zwischenschaltung von *interleukin-1-receptor-associated kinase* (IRAK)-4, IRAK-1, IRAK-2, *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6) und den *TAK1-binding proteins* (TAB) die Aktivierung der *transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1) [135, 158]. TAK1 ist eine Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), die wiederum zwei unterschiedliche Signalwege aktiviert. Einerseits aktiviert die TAK1 die Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase-Kaskade, die in die Phosphorylierung von MAP-Kinasen (MAPKs) (siehe Kapitel 2.3.4.1) mündet, welche wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren einschließlich des Aktivator Protein-1 (AP-1) (siehe Kapitel 2.3.4.2) aktivieren [135, 158]. Andererseits initiiert die TAK1 über die Phosphorylierung des *inhibitory- $\kappa$ B-kinase* (IKK)-Komplexes den kanonischen Signalweg zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (siehe Kapitel 2.3.4.3) [135, 158]. Die von TLR7, TLR8 und TLR9 ausgehenden Signalwege umfassen neben der zuvor beschriebenen Signaltransduktion zusätzlich eine von MyD88, IRAK4 und TRAF6 abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors *interferon-regulatory factor* (IRF)5 sowie eine von den Signalmolekülen MyD88, IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 und IKK $\alpha$  vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF7 [134, 158]. TLR3 aktiviert als einziger TLR über die alleinige Rekrutierung des Adapterproteins TRIF nachfolgende Signalwege. Allerdings kann auch TLR4 neben dem beschriebenen MyD88-abhängigen Signalweg einen TRIF-abhängigen Signalweg initiieren, wobei er jedoch zusätzlich das Adaptermolekül TRAM als Bindeglied zur Rekrutierung von TRIF benötigt [158, 179]. Im

TRIF-abhängigen Signalweg wird zum einen unter Beteiligung von TRAF6 und *receptor-interacting protein* (RIP)1 die TAK1 aktiviert, was wie im MyD88-abhängigen Signalweg letztlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie über die MAP-Kinase-Kaskade zur Aktivierung von AP-1 führt [134, 158]. Zum anderen mündet der TRIF-abhängige Signalweg über TRAF3, TRAF family *member-associated* NF- $\kappa$ B *activator-binding kinase* (TBK)1 und IKKi in die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 [134, 158]. Zusätzlich ist für einige TLR-aktivierten Signalwege eine Stimulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [180, 181] und des Fas-*associated death domain protein* (FADD)/Caspase 8-Komplexes nachgewiesen worden [182] sowie auf verschiedenen Ebenen der TLR-stimulierten Signalwege eine regulatorische Beteiligung unterschiedlicher aktivierter Proteinkinase C (PKC)-Isoenzyme beschrieben worden [183] (nicht gezeigt in Abbildung 2.6). Insgesamt führen die hier dargestellten von den jeweiligen TLRs ausgehenden Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung entsprechender Transkriptionsfaktoren, die die Transkription verschiedener Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems wie z. B. inflammatorischer Zytokine, Interferone und antimikrobieller Peptide regulieren (Abbildung 2.6) [134, 135, 158]. Im Folgenden wird auf die im TLR-aktivierten Signalweg beteiligten MAPKs (Kapitel 2.3.4.1) sowie den Transkriptionsfaktoren AP-1 (Kapitel 2.3.4.2) und NF- $\kappa$ B (Kapitel 2.3.4.3) fokussiert.



**Abbildung 2.6: TLR-vermittelte Signalwege**

Nach Bindung der Liganden an die jeweiligen TLRs wird entsprechend der rekrutierten Adaptermoleküle entweder der MyD88- oder der TRIF-abhängige Signalweg induziert, was letztlich in die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, AP-1 oder verschiedenen IRFs zur Regulation der Genexpression von z. B. proinflammatorischen Zytokinen, Typ I Interferonen und antimikrobiellen Peptiden mündet. AMP, antimikrobielles Peptid; AP-1, Aktivator Protein-1; IFN, Interferon; IκB, inhibitory-κB; IKK, inhibitory-κB-kinase; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, interferon-regulatory factor; Mal, MyD88-adaptor-like protein; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MAPKK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NEMO, NF-κB essential modulator; NF-κB, nukleärer Transkriptionsfaktor-κB; RIP, receptor-interacting protein; TAB, TAK1-binding protein; TAK, transforming growth factor β-activated kinase; TBK, TRAF family member-associated NF-κB activator-binding kinase; TIR, Toll/Interleukin-1-Rezeptor; TLR, Toll-like Rezeptor; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor; TRAM, TRIF-related adapter molecule; TRIF, TIR domain-containing adapter inducing IFN-β; Ubc, ubiquitin-conjugating enzyme; Uev, ubiquitin-conjugating enzyme variant. Die Abbildung ist modifiziert nach Kawai & Akira 2010 und Takeuchi & Akira 2010 [135, 158].

### 2.3.4.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind in allen eukaryotischen Zellen vorkommende, hoch konservierte, Signal-transduzierende Enzyme. Sie bilden die untere Stufe einer sequentiell agierenden, dreistufigen Phosphorylierungskaskade, der sogenannten MAP-Kinase-Kaskade, welche Rezeptor-detektierte extrazelluläre Signale

sowie auch chemische und physikalische Reize in das Zellinnere weiterleitet [184]. Diese MAP-Kinase-Kaskade umfasst die Signalübertragung über die Aktivierung von MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK), die ihrerseits durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK) stimulieren, welche wiederum durch duale Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten die MAP-Kinasen (MAPK) aktivieren [184]. Die aktivierten MAPKs phosphorylieren daraufhin in ihrer Funktion als Serin-Threonin-Kinasen viele zytosolische Substrate wie weitere stromabwärts gelegene Proteinkinasen, verschiedene Zytoskelettproteine und Phospholipasen. Zudem translozieren sie nach ihrer Aktivierung in den Zellkern, wo sie zahlreiche Transkriptionsfaktoren einschließlich AP-1 (Kapitel 2.3.4.2) phosphorylieren und stimulieren [185, 186]. Auf diese Weise beeinflussen die MAPKs die Regulation der Genexpression sowie viele wichtige Zellprozesse und setzen damit insgesamt eine passende zelluläre Antwort auf die einwirkenden Reize um [184-186].

Im Wesentlichen besteht die Familie der MAPKs beim Menschen aus den drei MAPK-Subfamilien: (I) *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2 oder p44/p42), (II) *c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase* (JNK) und (III) p38 MAPK. Demzufolge können auch drei unterschiedliche Signalkaskaden charakterisiert werden, die jeweils nach dem oben beschriebenen Phosphorylierungsschema zur Aktivierung einer entsprechenden MAPK-Subfamilie führen, aber auch über viele Interaktionen auf verschiedenen Ebenen miteinander vernetzt sind [184, 186, 187]. Innerhalb der TLR-abhängigen Signalwege werden ERK1/2, JNK und p38 MAPK durch verschiedene TLR-Liganden (PAMPs, DAMPs) aktiviert und vermitteln über die transkriptionelle Kontrolle zahlreicher inflammatorischer und antimikrobieller Moleküle wichtige angeborene Immunantworten [158, 188]. Darüber hinaus wird ERK1/2 auch durch mitogene Signale wie Wachstumsfaktoren oder Hormone stimuliert und nimmt dabei hauptsächlich Einfluss auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung [185-187]. JNK und p38 MAPK gelten zusätzlich als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK), da sie insbesondere durch Stressfaktoren wie UV-Strahlung, Hitzeschock, Zytokine, oxidativen oder osmotischen Stress aktiviert werden, und regulieren vornehmlich Apoptose und Inflamationsreaktionen der Zellen [185-187].

### **2.3.4.2 Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1 (AP-1)**

Der Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1 (AP-1) wurde ursprünglich als ein induzierbares Protein beschrieben, das an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion des humanen Metallothionein II<sub>A</sub>-Gens und des Simian Virus 40-Genoms bindet und deren Transkription stimuliert [189, 190]. Inzwischen wurden allerdings viele weitere eukaryotische und virale Gene identifiziert, deren Transkription von AP-1 reguliert wird [191]. AP-1 liegt als Homo- oder Heterodimer vor, das aus den Mitgliedern der Proteinfamilien Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), *activating*

*transcription factor* (ATF2, ATF3, ATFa, B-ATF), *jun-dimerization protein* (JDP1, JDP2) und *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (v-Maf, c-Maf, MafB, MafG, MafK, MafF, Nrl-Maf) besteht. Alle Proteine dieser Familien besitzen als gemeinsames, charakteristisches Motiv eine *basic leucine zipper* (bZIP)-Domäne, die über ihre Leucinezipper-Region die Dimerisierung der Proteine und über ihre basische Region die Sequenz-spezifische DNA-Bindung vermittelt [191-193]. Viele AP-1-Monomere enthalten zudem eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die für eine effektive Transkriptionsaktivierung der Zielgene notwendig ist [194]. Während die Fos-Proteine ausschließlich nur Heterodimere bilden, setzen sich die Jun-, ATF-, JDP- und Maf-Proteine sowohl zu Homo- als auch zu Heterodimeren zusammen. Insgesamt werden vorrangig Heterodimere mit Jun-Proteinen gebildet. Die vielen Kombinationsmöglichkeiten führen zu verschiedenen AP-1-Dimeren, die sich in ihrer Stabilität, ihrer Sequenzspezifität sowie ihrem Transaktivierungspotential unterscheiden [191-193]. Das am häufigsten vorliegende und die Transkription am stärksten aktivierende AP-1-Dimer stellt das c-Jun/c-Fos-Heterodimer dar [191, 194].

AP-1 wird durch viele physiologische und pathologische Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle oder virale PAMPs, Neurotransmitter, Phorbolester, UV-Strahlung und andere zelluläre Stressfaktoren je nach Signal Rezeptor-vermittelt oder nicht Rezeptor-vermittelt aktiviert [191, 192, 195]. Eine bedeutende regulatorische Rolle in der Signaltransduktion zur AP-1-Aktivierung spielen die MAPKs. MAPKs können hierbei über die Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren die Expression der einzelnen AP-1-Monomere steigern und damit indirekt auf transkriptioneller Ebene die AP-1-Aktivität regulieren. Die wesentliche direkte AP-1-Aktivierung erfolgt jedoch durch MAPKs auf posttranslationaler Ebene über die Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threonin-aminosäuren der bereits bestehenden AP-1-Dimere [194, 195]. Nach Aktivierung können die vielen unterschiedlich zusammengesetzten AP-1-Dimere entsprechend ihrer jeweiligen Sequenzspezifität an verschiedene AP-1-Konsensussequenzen in der Promotorregion der verschiedensten Zielgene binden und deren Transkription in Abhängigkeit ihres Transaktivierungspotentials und der Interaktion mit Kofaktoren aktivieren oder reprimieren [191, 193, 194]. AP-1 steuert diesbezüglich die Transkription von Genen, die z. B. für Zytokine, Chemokine, Kollagenasen, Metalloproteinasen, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, antimikrobielle Peptide und apoptotische Regulatoren kodieren. Demzufolge ist der Transkriptionsfaktor AP-1 an der Kontrolle einer Reihe zellulärer Prozesse wie Inflammation, Immunantwort, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Karzinogenese und Apoptose beteiligt [191, 192].

### **2.3.4.3 Nukleärer Transkriptionsfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

Der nukleäre Transkriptionsfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) wurde erstmals 1986 von Sen und Baltimore in aktivierten reifen B-Zellen als induzierbares Regulatorprotein für die Transkription des  $\kappa$ -Immunglobulin-Leichtketten-Gens identifiziert [196]. Mittlerweile

konnte jedoch die Expression von NF- $\kappa$ B in den meisten eukaryotischen Zelltypen sowie seine Bedeutung für die Transkriptionskontrolle von außerordentlich zahlreichen weiteren Genen nachgewiesen werden [197]. NF- $\kappa$ B ist strukturell ein Homo- oder Heterodimer, das sich aus Mitgliedern der NF- $\kappa$ B/Rel-Proteinfamilie zusammensetzt. In Säugetieren sind bislang die fünf NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine RelB, c-Rel, p65 (RelA), p50 (NF- $\kappa$ B1) und p52 (NF- $\kappa$ B2) bekannt, welche nahezu beliebig miteinander assoziieren können. Alle NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine besitzen eine N-terminale hoch konservierte Rel-Homologie-Domäne (RHD), die die Dimerisierung der Monomere, die Interaktion mit *inhibitory*- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-Proteinen, die nukleäre Translokation über die in ihr enthaltene Kernlokalisationssequenz und die DNA-Bindung vermittelt [197, 198]. Allerdings besitzen nur RelB, c-Rel und p65 eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD). Folglich können p50 und p52, denen die TAD fehlt, nur im Komplex mit den TAD-enthaltenden NF- $\kappa$ B/Rel-Proteinen die Transkription initiieren. Wohingegen einzig aus p50 und p52 bestehende Dimere die Transkription vielmehr zu reprimieren vermögen [198]. Das am häufigsten vorkommende und stark Transkriptions-aktivierende NF- $\kappa$ B-Dimer ist das p50/p65-Heterodimer [198].

NF- $\kappa$ B wird durch eine Vielzahl inflammatorischer und Stress-abhängiger Stimuli aktiviert. Dabei erfolgt die NF- $\kappa$ B-Stimulation einerseits Rezeptor-vermittelt z. B. durch mikrobielle Bestandteile (PAMPs) über PRRs oder durch Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) über entsprechende Zytokinrezeptoren sowie andererseits nicht Rezeptor-vermittelt z. B. durch UV-Strahlung oder oxidativen Stress [197, 198]. Die zentralen regulatorischen Komponenten in der kanonischen Signaltransduktion zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind die *inhibitory*- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-Proteine und der I $\kappa$ B-Kinase-(IKK)-Komplex, der aus der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ , bzw. auch NF- $\kappa$ B *essential modulator* (NEMO) genannt, und den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  besteht [198]. Im ruhenden Zellzustand wird das NF- $\kappa$ B-Dimer durch die Bindung an I $\kappa$ B-Proteine inaktiv im Zytosol zurückgehalten, indem die I $\kappa$ B-Proteine dessen Kernlokalisationssequenz maskieren [197, 198]. Nach Signal-abhängiger Zellstimulation katalysiert der aktivierte IKK-Komplex die Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine, woraufhin deren Ubiquitinierung und proteasomale Degradation erfolgt [197, 198]. Folglich wird die Kernlokalisationssequenz freigelegt und das NF- $\kappa$ B-Dimer kann in den Zellkern translozieren, wo es an die NF- $\kappa$ B-Konsensus-Sequenz im Promotorbereich unterschiedlicher Gene bindet und deren Transkription einleitet [197, 198]. Dabei reguliert NF- $\kappa$ B die Transkription von vielen Zielgenen, die für Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Akute-Phase-Proteine, Wachstumsfaktoren, antimikrobielle Peptide, pro- und antiapoptotische Moleküle kodieren. Auf diese Weise spielt NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle in der Steuerung von Immunantworten, Entzündungsreaktionen, Zellproliferation, Zellüberleben und Apoptose [197, 198].

### 2.3.5 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind evolutionär sehr ursprüngliche und wichtige Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems [199]. Bisher konnten insgesamt über 1200 antimikrobielle Peptide aus den verschiedensten Zellen, Geweben und Flüssigkeiten der unterschiedlichsten Organismen wie Pflanzen, Prokaryoten, Pilze, Invertebraten und Vertebraten, einschließlich des Menschen, identifiziert werden [137, 200]. Die AMP stellen eine sehr heterogene Gruppe aus niedermolekularen und definitionsgemäß weniger als 100 Aminosäuren bestehenden Oligo- oder Polypeptiden dar, die imstande sind, Erreger effektiv abzutöten oder deren Wachstum zu hemmen. Ihre antimikrobielle Aktivität richten sie dabei gegen ein breites Erregerspektrum, zu dem zahlreiche Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten gehören [137, 199]. Die Information zur Biosynthese von AMP ist genkodiert. Die Gene, die für strukturell ähnliche AMP kodieren, liegen im Genom häufig in Clustern angeordnet vor. In Eukaryoten weisen die AMP-kodierenden Gene eine Intron-Exon-Struktur mit regulatorischen Promotorregionen auf und werden durch typische Prozessierungsmechanismen zur Proteinsynthese herangezogen [201]. Das primäre Translationsprodukt ist ein Präpropeptid, das aus einer N-terminalen Signalsequenz, einem mittleren Prosegment und einem C-terminalen reifen Peptid besteht. Letzteres wird nach posttranslationaler Prozessierung abgespalten und besitzt die eigentliche antimikrobielle Eigenschaft [201]. Die für die proteolytische Prozessierung zum bioaktiven, reifen Peptid notwendigen Enzyme sind weitgehend noch unbekannt. AMP können in Form von inaktiven Propeptiden oder von aktiven, reifen Peptiden in intrazellulären Vesikeln gespeichert werden [201].

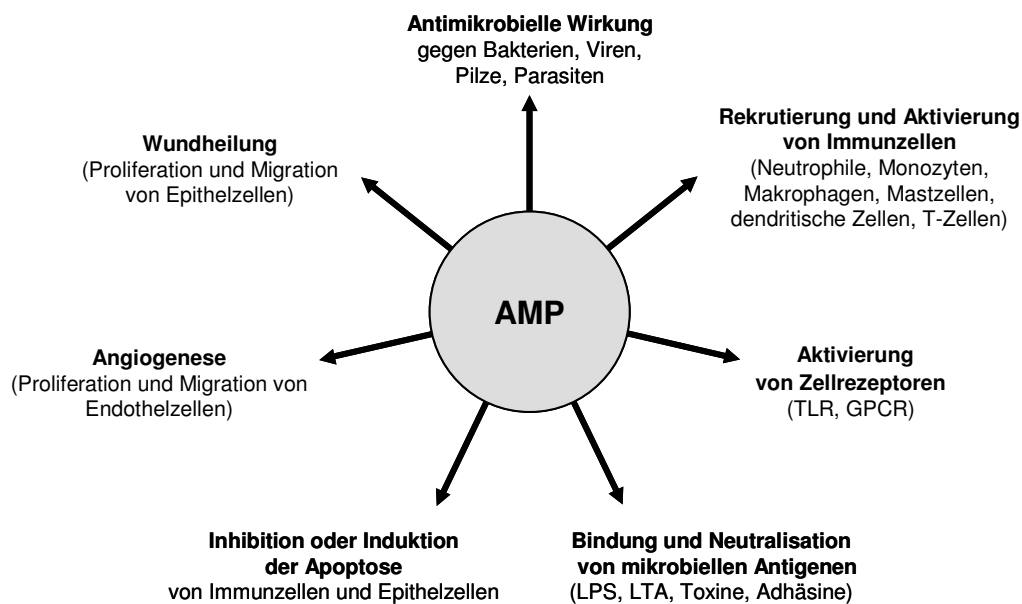
Die meisten AMP sind aufgrund ihres hohen Gehalts an Arginin- und Lysinaminosäuren kationisch und besitzen daher bei neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung. Zudem bilden sie in ihrer dreidimensionalen Struktur eine räumlich voneinander getrennte hydrophobe und hydrophile Region aus und sind somit amphipatisch. Diese physikalisch-chemischen Charakteristika schaffen die wesentlichen Voraussetzungen für die antimikrobielle Aktivität der Peptide [202]. Das allgemein angenommene antimikrobielle Wirkprinzip der AMP beruht hauptsächlich auf einer Interaktion mit bakteriellen Zellmembranen, was zu deren Permeabilisierung führt, woraufhin der Zusammenbruch des Membranpotentials und letztlich die Lyse der Bakterien erfolgt [200, 202, 203]. Die initiale Bindung von AMP an die Bakterienzelle kommt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen AMP und den negativ geladenen Komponenten der Bakterienmembran zustande [200, 202, 203]. Der weitere exakte Mechanismus, wie die AMP die Permeabilisierung der Bakterienmembran bewirken, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine verbreitete Theorie beschreibt, dass sich die Peptide aufgrund ihrer amphipatischen Struktur in die zytoplasmatische Phospholipid-Doppelmembran der Bakterien einlagern und in Komplexen mit mehreren Peptiden entweder nach dem *barrel-stave*-Modell Fassdauben-ähnliche Kanäle oder nach

dem *toroidal-pore*-Modell Wurmloch- bzw. Torus-ähnliche Poren bilden, die für Ionen, andere gelöste Substanzen und Wasser durchlässig sind [200, 204, 205]. Eine weitere Theorie, die auf dem *carpet*-Modell basiert, geht davon aus, dass die AMP die Bakterienmembran großflächig wie einen Teppich bedecken und bei Erreichen einer Schwellenkonzentration ungeordnet in die Membran eindringen, woraufhin sie vorübergehend Poren formen können und schließlich die Membranintegrität unter Ausbildung von Mizellen völlig zerstören [200, 206]. Die Selektivität der AMP für prokaryotische Zellen liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Zusammensetzung von prokaryotischen und eukaryotischen Zellmembranen. So erfolgen die ladungsabhängigen Interaktionen der positiv geladenen AMP vorrangig mit bakteriellen Zellmembranen, da diese im Allgemeinen durch die anionischen Membranbestandteile Cardiolipin, Phosphatidylglycerol, LPS (gram-negative Bakterien) und LTA (gram-positive Bakterien) negativ geladen sind, während die Membranen der Eukaryoten bestehend aus den zwitterionischen Molekülen Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sowie dem ungeladenen Cholesterol elektrisch neutral sind. Zudem scheint Cholesterol, das in den prokaryotischen Zellmembranen fehlt, aber in den eukaryotischen Membranen reichlich enthalten ist, einen membranstabilisierenden Effekt zu vermitteln und demnach die eukaryotischen Zellen vor dem membranaktiven Mechanismus der AMP zu schützen [137, 203]. Neben der Wechselwirkung mit der mikrobiellen Zellmembran wird für einige AMP als alternative antimikrobielle Wirkungsweise die Interaktion mit intrazellulären Proteinen oder Nukleinsäuren (DNA, RNA) der Zielzelle diskutiert, die mit einer Hemmung essentieller Zellstoffwechselprozesse einhergeht [200, 203]. Die minimalen, inhibitorischen Konzentrationen der AMP liegen im Bereich von 0,1–10 µg/ml [207].

Allerdings besitzen die AMP in der angeborenen Immunantwort zusätzlich zu ihrer namensgebenden antimikrobiellen Wirkung noch eine Vielzahl weiterer, sehr vielseitiger Funktionen und Aktivitäten (Abbildung 2.7). So verfügen sie über eine chemotaktische Wirkung auf verschiedene Immunzellen [137, 202]. Zudem können sie die Immunzellen und einige Epithelzellen zur Sekretion von verschiedenen inflammatorischen Mediatoren (z. B. Chemokine, Zytokine) sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen und kostimulierenden Molekülen aktivieren [137, 202, 208]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die AMP einige TLR und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktivieren, um manche ihrer immunstimulierenden Funktionen umzusetzen [137, 209]. Neben ihren proinflammatorischen Aktivitäten können die AMP auch antiinflammatorische Funktionen ausüben. Beispielsweise binden und neutralisieren sie proinflammatorisch wirksame, mikrobielle Antigene wie LPS, LTA, Toxine oder Adhäsine und wirken somit einer überschießenden Immunreaktion entgegen [137, 210]. Außerdem können die AMP die Apoptose von einigen Immunzellen und Epithelzellen sowohl inhibieren [211-213] als auch induzieren [211, 214, 215]. Insgesamt repräsentieren die AMP essentielle Immunmodulatoren, die allerdings nicht nur eine entscheidende Schlüsselstellung in der Regulation der angeborenen Immunantwort einnehmen, sondern aufgrund ihres direkten



und indirekten Einflusses auf die Rekrutierung, Aktivierung und Reifung von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen auch als wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort fungieren [137, 202, 208]. Abgesehen von den zahlreichen immunmodulatorischen Wirkungen sind die AMP durch die Förderung der Proliferation und Migration von Epithel- und Endothelzellen auch an der Regulation der Wundheilung und Angiogenese beteiligt [137, 202, 208].



**Abbildung 2.7: Wichtige Funktionen von AMP**

Außer ihrer antimikrobiellen Wirkung entfalten die AMP zahlreiche immunmodulatorische Funktionen. Zu diesen gehören Rezeptor-vermittelte, proinflammatorische Prozesse wie die Chemotaxis von Immunzellen und deren Aktivierung zur Sekretion von inflammatorischen Mediatoren, aber auch antiinflammatorische Aktivitäten wie die Neutralisation von proinflammatorischen Substanzen sowie pro- und antiapoptotische Wirkungen auf unterschiedliche Zelltypen. Darüber hinaus regulieren die AMP Mechanismen der Wundheilung und Angiogenese. AMP, antimikrobielle Peptide; GPCR, G-protein coupled receptor; LPS, Lipopolysaccharid; LTA, lipoteichoic acid; TLR, Toll-like Rezeptor. Die Abbildung ist modifiziert nach Lai & Gallo 2009 [137].

### 2.3.5.1 Antimikrobielle Peptide des Menschen

Auf der Basis struktureller Homologien können die meisten AMP des Menschen in die drei Familien (I) Defensine, (II) Cathelizidine und (III) Histatine eingeordnet werden (Tabelle 2.1) [201, 203, 216]. Die Defensine können wiederum beim Menschen aufgrund der Anordnung der Cysteine und der Position der Disulfidbrücken in der  $\beta$ -Faltblattstruktur in die zwei Subfamilien  $\alpha$ -Defensine und  $\beta$ -Defensine unterschieden werden [201, 217]. Bislang sind sechs humane  $\alpha$ -Defensine, vier humane  $\beta$ -Defensine, ein einziges humanes Cathelizidin und zwölf Histatine identifiziert worden [203, 217, 218].

**Tabelle 2.1: Humane kationische antimikrobielle Peptide**

Die Tabelle listet die drei wichtigen AMP-Familien des Menschen mit ihren jeweiligen Mitgliedern und deren entsprechendem Syntheseort bzw. zellulärem Vorkommen auf. hBD, humanes β-Defensin; hCAP18, human cationic antimicrobial peptide of 18 kDa; HD, humanes Defensin; HNP, humanes neutrophiles Peptid. Die Tabelle ist modifiziert nach Harder et al. 2007 und Oppenheim et al. 2003 [203, 216].

Familie	Subfamilie	Mitglieder	Syntheseort/zelluläres Vorkommen
Defensine	α-Defensine	HNP-1 bis -4	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen, CD8-T-Zellen, B-Zellen
		HD-5, HD-6	Paneth-Zellen (Dünndarm), Epithelzellen (Urogenital-, Respirationstrakt)
	β-Defensine	hBD-1 bis -4	Epithelzellen (Haut, Respirations-, Gastrointestinal-, Urogenitaltrakt), Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen
Cathelizidine		hCAP18/LL-37	Epithelzellen (Haut, Respirations-, Gastrointestinal-, Urogenitaltrakt), Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Natürliche Killerzellen, T-Zellen, B-Zellen
Histatine		Histatin-1 bis -12	Speicheldrüsen, Speichel, Mund-Rachenraum

Die humanen α-Defensine 1 bis 4 kommen insbesondere in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten vor und werden daher auch als humane neutrophile Peptide (HNP)-1 bis -4 bezeichnet [203, 216, 217]. Die humanen α-Defensine (HD)-5 und HD-6 sind dagegen epithelialen Ursprungs und werden von den Paneth-Zellen des Dünndarmes [219] sowie den Epithelzellen des Urogenitaltraktes [220, 221] und des Respirationstraktes exprimiert [222]. Im humanen Genom wurde bisher nur ein einziges Cathelizidin-antimikrobielles-Peptid (*CAMP*)-Gen identifiziert, das für ein Präpropeptid kodiert, aus dem das inaktive 18 kDa große Propeptid *human cationic antimicrobial peptide* (hCAP18) prozessiert wird. Am C-terminalen Ende von hCAP18 wird das einzige im Menschen bekannte, antimikrobiell aktive Cathelizidin LL-37 proteolytisch abgespalten. LL-37 wird nach seiner Peptidsequenz benannt, die mit zwei Leucin-Resten beginnt und aus 37 Aminosäuren besteht [137, 217]. hCAP18/LL-37 wird von zahlreichen Leukozyten einschließlich neutrophiler Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten aber auch von Epithelzellen der Haut, des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltraktes exprimiert [137, 203, 217]. Im menschlichen Speichel konnten zwölf Histatine isoliert werden, von denen Histatin-1, -3 und -5 den größten Anteil bilden und funktionell am bedeutsamsten sind [217, 218]. Nur Histatin-1 und Histatin-3 sind die primären Syntheseprodukte der Histatingene. Alle anderen Histatine werden dagegen aus diesen Primärprodukten durch post-translationale Proteolyse prozessiert [201, 217, 218]. Die Histatine werden konstitutiv von den Speicheldrüsen (Glandulae parotidaeae, submandibulares und sublinguales) produziert und mit dem Speichel in den Mund-Rachenraum sezerniert. Im weiteren Verlauf wird der Fokus allgemein auf die humanen β-Defensine (Kapitel 2.3.5.1.1) und im Speziellen auf das in dieser Arbeit untersuchte humane β-Defensin-3 (hBD-3) (Kapitel 2.3.5.1.1.1) gelegt.

### 2.3.5.1.1 Humane $\beta$ -Defensine

Die humanen  $\beta$ -Defensine sind kationische, Arginin-reiche Peptide mit einem Molekulargewicht von 4–6 kDa. Sie sind mit 36–45 Aminosäuren etwas länger als die  $\alpha$ -Defensine und enthalten ihre drei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen C<sub>1</sub>–C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>–C<sub>4</sub> sowie C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub> [217]. Bis jetzt konnten beim Menschen nur die vier humanen  $\beta$ -Defensine (hBD)-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4 auf Proteinebene isoliert werden. Ihre kodierenden Gene sind benachbart zu denen der  $\alpha$ -Defensine in einem Cluster auf Chromosom 8p23 lokalisiert und bestehen aus 2 Exons [199]. Durch Computer-basierte Datenbankrecherche des humanen Genoms wurden jedoch bis zu 28 weitere humane  $\beta$ -Defensin-Gene mit dem typischen Cysteinmotiv auf den Chromosomen 6 und 20 identifiziert, deren Expression allerdings auf Proteinebene im Menschen noch nicht nachgewiesen werden konnte [223, 224]. Die hBD-1 bis -4 werden hauptsächlich von den Epithelzellen der Haut, des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes sowie des Urogenitaltraktes gebildet und sezerniert. Demnach werden die  $\beta$ -Defensine insgesamt in sämtlichen Epithelzellen exprimiert, die in direktem Kontakt zur externen Umgebung oder der mikrobiellen Flora stehen [202, 203, 217]. Alle bisher identifizierten humanen  $\beta$ -Defensine konnten zudem von den Atemwegsepithelzellen abgegeben im Atemwegsekret isoliert werden [225, 226]. Von den Epithelzellen wird hBD-1 konstitutiv exprimiert, während die Expression des hBD-2, -3 und -4 durch verschiedene inflammatorische und infektiöse Stimuli induzierbar ist [202, 207, 216, 225]. Einige humane  $\beta$ -Defensine werden auch von verschiedenen Leukozyten wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen konstitutiv oder nach Induktion durch inflammatorische oder infektiöse Reize gebildet [227]. Die Defensine verfügen neben ihrer direkten antimikrobiellen Wirkungsweise gegen ein breites Erregerspektrum über die verschiedensten immunmodulatorischen Funktionen und bilden dabei eine Schnittstelle von angeborenem und erworbenem Immunsystem [202, 216]. Zudem sind sie auch an Mechanismen der Wundheilung und Angiogenese beteiligt [228, 229].

#### 2.3.5.1.1.1 Humanes $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3)

Das humane  $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) wurde erstmals 2001 in Peptidform aus Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis isoliert [230]. Nahezu zeitgleich wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander durch Computer-gestützte Genomanalyse das *hBD-3*-Gen auf Chromosom 8p23 identifiziert und dessen Expression auf RNA-Ebene in unterschiedlichen Epithelien sowie einigen nicht-epithelialen Geweben nachgewiesen [231, 232]. Mittlerweile konnte die hBD-3-Expression jedoch auch auf Peptidebene nicht nur in den Epithelzellen der Haut, sondern auch des Respiration-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes [233-235] sowie in bestimmten nicht-epithelialen Zellen wie den Knorpel- und Knochenzellen gezeigt werden [236, 237]. Das hBD-3 ist ein ca. 5 kDa großes und aus 45 Aminosäuren bestehendes Peptid. Es ist aufgrund von 7 Arginin- und 6 Lysin-Aminosäuren sehr basisch und stellt mit einer Nettoladung von +11 bei neutralem

pH-Wert das bisher am stärksten kationische  $\beta$ -Defensin dar [230, 238, 239]. In Lösung bilden die hBD-3-Peptide bereits in geringer Konzentration symmetrische und stabile Homodimere [239]. Die Fähigkeit zur Bildung dieser stabilen amphipathischen Dimer-Struktur und die hohe positive Nettoladung scheinen für die im Gegensatz zu den anderen  $\beta$ -Defensinen salzunempfindliche und für die von allen  $\beta$ -Defensinen am potentesten aktive antimikrobielle Wirkung des hBD-3 verantwortlich zu sein [223, 239]. Die antimikrobielle Aktivität des hBD-3 richtet sich gegen ein außerordentlich breites Erregerspektrum, das zahlreiche gram-positive und gram-negative Bakterien einschließlich nosokomialer multi-resistenter *Staphylococcus aureus*-, *Enterococcus faecium*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme sowie auch Pilze wie verschiedene *Candida*-Spezies umfasst [230, 238, 240, 241]. Zudem inhibiert hBD-3 die Replikation des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) [242, 243] sowie den Wirtszelleintritt des Influenza-Virus [244], des Herpes-simplex-Virus (HSV) [245] und des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) [246], wodurch dem hBD-3 auch eine wichtige Bedeutung in der Abwehr viraler Infektionen zukommt.

Neben den antibakteriellen, antifungalen und antiviralen Aktivitäten übt hBD-3 allerdings auch zahlreiche immunmodulatorische Funktionen aus. Dabei ist hBD-3 vermutlich über eine Wechselwirkung mit Chemokin-Rezeptoren chemotaktisch für unreife dendritische Zellen, CD4+-T-Gedächtniszellen, Monozyten und Makrophagen [231, 247, 248]. Zudem rekrutiert hBD-3 Mastzellen und aktiviert diese zur Degranulation sowie Sekretion von vielen inflammatorischen und pruritogenen Mediatoren [249, 250]. HBD-3 interagiert auch mit TLR1/2 auf Monozyten und dendritischen Zellen und induziert auf diese Weise MyD88-abhängig die Expression von kostimulatorischen Molekülen [209]. Zusätzlich stimuliert hBD-3 Monozyten sowie unreife dendritische Zellen zur Freisetzung von Zytokinen [248, 251]. Über die beschriebene Rekrutierung und Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen fungiert hBD-3 zugleich als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort sowie als Regulator der erworbenen Immunantwort [137]. Abgesehen von der Stimulation von Immunzellen aktiviert hBD-3 auch Keratinozyten (Hautepithelzellen) zur Produktion zahlreicher Zytokine und Chemokine [229, 252]. Außerdem hemmt hBD-3 die Apoptose von neutrophilen Granulozyten und verstärkt wahrscheinlich durch deren verlängerte Lebensdauer zusätzlich die phagozytäre Immunabwehr [213]. Allerdings vermittelt hBD-3 auch antiinflammatorische Aktivitäten zur Unterdrückung übersteigter Immunreaktionen. So verringert hBD-3 die durch das Hämagglutinin B von *Porphyromonas gingivalis* induzierte Zytokin-Freisetzung aus dendritischen Zellen [253] und inhibiert die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion aus humanen und murinen Makrophagen [254].

Außer in der Immunantwort und Inflammation ist hBD-3 auch in Mechanismen der Gewebeneubildung und -umbildung involviert. Beispielsweise stimuliert hBD-3 die Migration und Proliferation von Keratinozyten und fördert somit die Wundheilung [229].

Zusätzlich unterstützt hBD-3 auch die Differenzierung und Mineralisation von Osteoblasten-ähnlichen Zellen und beeinflusst damit anscheinend positiv die Knochengeweberegeneration [236]. In Knorpelzellen induziert hBD-3 allerdings eine gesteigerte Bildung von degradierenden Matrix-Metalloproteasen, während es zugleich die Produktion ihrer endogenen Inhibitoren reduziert, so dass hBD-3 auch an Abbauprozessen des Knorpelgewebes beteiligt und vermutlich für die Pathogenese von Osteoarthritis bedeutsam ist [237]. Darüber hinaus scheint hBD-3 auch eine Rolle in der Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zu spielen, da hBD-3 antiapoptotisch [255] und proliferativ auf die Plattenepithelkarzinomzellen in diesem Bereich wirkt [256], ihre lymphatische Metastasierung steigert [257] und Tumor-assoziierte Makrophagen zu ihren Tumorherden rekrutiert [247, 258].

### 2.3.5.1.1.2 Regulation der Expression von hBD-3

Das hBD-3 wird in gesunden Epithelien und einigen gesunden nicht-epithelialen Geweben nur gering basal oder zum Teil auch gar nicht exprimiert. Dagegen ist die hBD-3-Produktion in vielen entzündlichen oder infektiösen Läsionen der Epithelien verschiedener Organsysteme und nicht-epithelialer Gewebe [230, 237, 259] sowie in sterilen Wunden des Hautepithels [260], aber auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion [247, 257, 258, 261] sowie der Vulva deutlich gesteigert [262]. Insgesamt wird die Expression von hBD-3 in den epithelialen und bestimmten nicht-epithelialen Zellen durch zahlreiche inflammatorische Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-22) [237, 263], Wachstumsfaktoren (z. B. *transforming growth factor* (TGF)- $\alpha$ , *epidermal growth factor* (EGF), *heparin-binding* (HB)-EGF, Amphiregulin) [264] und andere mitogene Faktoren (z. B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)) [263] sowie durch diverse Bakterien, Viren oder Pilze bzw. ihre Bestandteile (z. B. LPS, LTA) induziert [230, 235, 242, 265, 266]. Zusätzlich konnte in Keratinozyten gezeigt werden, dass die hBD-3-Expression durch die Kalzium-induzierte Zelldifferenzierung verstärkt wird und somit vom Status ihrer Zelldifferenzierung abhängt [263].

Die genauen Regulationsmechanismen, die in die hBD-3-Bildung involviert sind, sind bisher nur unvollständig geklärt, scheinen allerdings stimulus- und zellabhängig abzulaufen. In einigen bakteriellen Infektionen wurde für die Induktion der hBD-3-Expression die Aktivierung von PRR-abhängigen, insbesondere TLR-abhängigen Signalwegen, mit Beteiligung verschiedener MAPKs beschrieben. So erfolgt die durch *Staphylococcus aureus* und die durch dessen wesentlichen Zellwandbestandteil LTA induzierte hBD-3-Bildung in Keratinozyten über eine TLR2- p38 MAPK- AP-1-vermittelte Signalkaskade [235]. *Legionella pneumophila*-infizierte Lungenepithelzellen produzieren hBD-3 über einen TLR2-, TLR5- und TLR9- JNK- c-Jun/AP-1-abhängigen Signalweg [267]. *Streptococcus pneumoniae* induziert die hBD-3-Sekretion von Lungenepithelzellen via einer TLR2- JNK- AP-1-vermittelten Signaltransduktion [268]. Allerdings konnte für

bestimmte Erreger die Induktion der hBD-3-Produktion auch über die Aktivierung von NOD1- oder von NACHT-LRR- *and pyrin domain-containing protein 2* (NALP2), beides Mitglieder der NLR-Familie der zytosolischen PRRs, nachgewiesen werden [269, 270]. Neben der Stimulation der beschriebenen PRRs belegen mehrere Studien, dass zudem die Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) für die Induktion der hBD-3-Expression eine wichtige Rolle spielt [233, 258, 260, 264, 266, 271]. Außerdem sind in der Induktion der hBD-3-Expression über die EGFR-abhängigen Signalwege zum Teil die gleichen Signalmoleküle involviert wie über die TLR-aktivierten Signalkaskaden. So induziert der EGFR-Ligand EGF die hBD-3-Produktion in oralen Epithelzellen über die Aktivierung von MAPKK MEK1/2 (Stimulator der MAPK ERK1/2), p38 MAPK, PKC und PI3K [258]. In Magenepithelzellen ist die *Helicobacter pylori*-induzierte hBD-3-Expression von der EGFR-Transaktivierung sowie der nachfolgenden Stimulation der MAPKs ERK und JNK abhängig [233]. Die hBD-3-Bildung von Speiseröhrenepithelzellen nach Infektion mit *Candida albicans* unter Beteiligung polymorphkerniger Leukozyten erfolgt über die von *a disintegrin and metalloprotease 17* (ADAM17)-vermittelte Abspaltung des EGFR-Agonisten TGF- $\alpha$  und der anschließenden Transaktivierung der EGFR- MAPKs (p38 MAPK, JNK und ERK)- AP-1-abhängigen Signalkaskade [266, 271]. Die Promotorregion des *hBD-3*-Gens weist mehrere Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, *nuclear factor for interleukin-6 expression* (NF-IL-6) [232, 235] und *signal transducers and activators of transcription* (STAT) [231, 272] sowie eine NF- $\kappa$ B-Konsensussequenz auf [272]. In den bisherigen *in vitro* Infektionsmodellen mit unterschiedlichen Zellen und verschiedenen pathogenen Erregern konnte wie bereits oben beschrieben zumeist eine vom Transkriptionsfaktor AP-1 abhängige Regulation der hBD-3-Expression nachgewiesen werden [235, 266-268, 271]. Bei der in Keratinozyten durch verschiedene inflammatorische Mediatoren induzierten hBD-3-Bildung scheinen jedoch stimulusabhängig unterschiedliche Transkriptionsfaktoren beteiligt zu sein [272-274].

Über die Botenstoffe und Regulationsmechanismen, die zur Herabregulation oder Hemmung der hBD-3-Expression führen, ist wenig bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Retinsäure, ein Modulator des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, die durch Kalzium, PMA, Bakterien oder durch proinflammatorische Zytokine induzierte hBD-3-Expression in Keratinozyten inhibiert [263]. Zudem unterdrücken die Zytokine der Typ 2-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Zellen), IL-4 und IL-13, die TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -stimulierte hBD-3-Produktion in Keratinozyten [272, 275]. Um sich offenbar der antimikrobiellen Wirkung von hBD-3 zu entziehen, scheinen auch einige Erreger bzw. bakterielle Bestandteile die hBD-3-Expression negativ regulieren zu können. So inhibiert der bekapselte Wildtypstamm von *Klebsiella pneumoniae* im Gegensatz zur unbekapselten Mutante durch sein Kapselpolysaccharid die Induktion der hBD-3-Expression in Atemwegsepithelzellen vermutlich infolge der Umgehung seiner NOD1-abhängigen Erkennung [270]. *Shigella flexneri* supprimiert hingegen über MxiE-Transkriptionsaktivator-regulierte Virulenzfaktoren die Induktion der hBD-3-Expression in Darmepithelzellen [276]. Auch die

Typ I-, II- und III-*Toxoplasma gondii*-Stämme hemmen jeweils die Induktion der hBD-3-Expression in den intestinalen Epithelzellen [277].

### 2.3.5.2 Die Rolle von AMP in der Pathogenese von Krankheiten

Inzwischen weisen mehrere Untersuchungen darauf hin, dass Veränderungen und Störungen der Expression oder der Aktivität von AMP mit der Pathogenese einiger humaner Erkrankungen assoziiert zu sein scheinen. Bei Morbus Kostmann, einer kongenitalen Neutropenie, die mit häufigen, schweren parodontalen und gingivalen bakteriellen Infektionen einhergeht, konnte ein Fehlen von LL-37 sowohl in den neutrophilen Granulozyten als auch im Speichel sowie eine stark verminderte Konzentration der  $\alpha$ -Defensine HNP-1 bis -3 in den neutrophilen Granulozyten gezeigt werden [278]. Die pathogenetische Rolle und der therapeutische Nutzen von LL-37 für das Kostmann-Syndrom wurden erstmals dadurch deutlich, als ein Patient nach einer Knochenmarkstransplantation nahezu normale Konzentrationen von LL-37 aufwies und zugleich die sonstigen folgenschweren Parodontitiden oder Gingivitiden bei ihm ausblieben [278]. Eine reduzierte Expression von hBD-2, hBD-3 und LL-37 wurde auch in den Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis nachgewiesen und scheint für die rezidivierenden bakteriellen, viralen oder fungalen Infektionen der betroffenen Hautareale mitverantwortlich zu sein [275, 279]. Mögliche Ursachen für den Mangel von hBD-2, hBD-3 und LL-37 bei atopischer Dermatitis umfassen einen Defizit an wichtigen Stimulatoren wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in den entzündlichen Hautbereichen sowie eine Inhibition ihrer inflammatorisch induzierten Expression durch die erhöhte Menge der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-13 in den atopischen Hautläsionen [272, 275, 280]. Demgegenüber ist die Expression von hBD-2, hBD-3 und LL-37 in den Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis vermutlich durch das in der Psoriasis-Haut vorherrschende stimulierende T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil (z. B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) deutlich erhöht, was auch erklären könnte, warum die psoriatischen Hauteffloreszenzen seltener Infektionen aufweisen [275, 279]. Allerdings scheint jedoch insbesondere das überexprimierte LL-37 die Pathogenese der Psoriasis zu fördern, indem es mit körpereigener DNA von geschädigten oder apoptotischen Keratinozyten Komplexe bildet, wodurch autoimmune Entzündungsreaktionen der Haut aktiviert werden [281]. Abnormal gesteigerte Konzentrationen von LL-37 wurden auch in der betroffenen Gesichtshaut von Patienten mit Rosazea gefunden und sind mit der dermalen Inflammation sowie den vaskulären Veränderungen im Rahmen dieser Hauterkrankung assoziiert [282]. Bei Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, die bevorzugt das terminale Ileum und/oder Kolon befällt, wird ein Verlust der Toleranz gegenüber der physiologischen Darmflora als Folge einer Abwehrschwäche der Darmmukosa gegenüber potentiell pathogenen oder invasiven Kommensalen für die anhaltende Inflammation mitverantwortlich gemacht [283]. Im Zusammenhang mit der antibakteriellen Barrierestörung konnte spezifisch für den Morbus Crohn des Ileums eine deutlich reduzierte Expression der  $\alpha$ -Defensine HD-5 und HD-6 in

den Paneth-Zellen des Dünndarms nachgewiesen werden [284, 285]. Untersuchungen zur Ursache des Mangels an HD-5 und HD-6 bei dem ilealen Morbus Crohn deckten eine Verbindung zu Mutationen im NOD2-Gen, die mit einem Funktionsverlust von NOD2 einhergehen [284, 286], sowie eine verminderte Expression von *T-cell-specific transcription factor 4* (TCF4) auf [287], einem Regulator für die Differenzierung und Reifung von Paneth-Zellen sowie für die Expression der intestinalen  $\alpha$ -Defensine [288]. Kürzlich wurden auch Polymorphismen in der Promotorregion des TCF4-Gens bei Patienten mit ilealem Morbus Crohn nachgewiesen, die möglicherweise die genetische Grundlage für die verminderte TCF4-Expression und konsekutiv für die reduzierte HD-5 und HD-6-Bildung darstellen [289]. Bei dem Morbus Crohn des Kolons wurde eine deutlich eingeschränkte Induktion für die Expression von hBD-2, hBD-3, hBD-4 und LL-37 in der Kolonschleimhaut gefunden [259, 290, 291]. Interessanterweise konnte die unzureichende Induktion der hBD-2-Expression auf einen Genkopien-Zahl-Polymorphismus zurückgeführt werden, da Patienten mit Morbus Crohn des Kolons im Durchschnitt eine hBD-2-Genkopie weniger besitzen als die Kontrollpatienten [292]. Bei der Colitis ulcerosa, einer anderen chronisch entzündlichen Darmerkrankung, die nur das Rektum und Kolon befällt sowie offenbar auch auf einer Immunreaktion gegenüber der kommensalen Darmflora basiert, konnte im Gegensatz zum kolonischen Morbus Crohn eine erhöhte hBD-2-, hBD-3-, hBD-4- und LL-37-Expression in der Kolonschleimhaut gemessen werden [259, 290, 291]. Die Zystische Fibrose (*cystic fibrosis* (CF)), eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, bei der aufgrund einer Mutation im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Gen defekte Chloridkanäle synthetisiert werden, ist durch wiederkehrende und chronische Infektionen der Lunge mit Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cenocepacia* gekennzeichnet, die über anhaltende Entzündungsreaktionen die progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion verursachen [207, 293]. Die gestörte Chloridkanalfunktion führt unter anderem zur Bildung eines zähflüssigen und salzreichen Atemwegssekretes, das eine verminderte antimikrobielle Aktivität besitzt [293, 294]. Dieser Abwehrdefekt kann zum Teil damit erklärt werden, dass die hohe NaCl-Konzentration im Atemwegssekret von CF-Patienten die antimikrobielle Wirkung vieler AMP, die zumeist (außer bei hBD-3) salzempfindlich ist, inhibiert [293, 294]. Zudem ist im fortgeschrittenen Stadium der CF bei stark eingeschränkter Lungenfunktion die Konzentration von humanen  $\beta$ -Defensinen im Atemwegssekret deutlich erniedrigt [295]. Dies kann nicht nur auf eine beeinträchtigte  $\beta$ -Defensin-Expression bei chronisch entzündeter und geschädigter CF-Lunge [293, 295], sondern auch auf eine gesteigerte proteolytische Degradation der  $\beta$ -Defensine durch die im Atemwegssekret von CF-Patienten übermäßig vorhandenen Cathepsine zurückgeführt werden [296]. Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen der neutrophilen  $\alpha$ -Defensine HNP-1 bis -3 sowie des Cathelizidins LL-37 im Atemwegssekret von CF-Patienten mit schwerer Lungenfunktionsstörung deutlich erhöht, was mit der persistierenden Inflammation und der zunehmenden Ateminsuffizienz assoziiert ist [295, 297]. Allerdings



zeigte ein Xenograftmodell der CF, dass eine durch viralen Gentransfer vermittelte Überexpression von LL-37 die antimikrobielle Aktivität des Atemwegssekretes wiederherstellen konnte [298]. Epidemiologisch-genetische Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen bestimmten Einzelnukleotid-Polymorphismen im *hBD-1*-Gen und dem Auftreten von COPD [299, 300]. Jedoch sind die Auswirkungen dieser Polymorphismen auf die Expression und Aktivität der AMP bei der COPD bisher noch unbekannt [202]. Unabhängig von diesen genetischen Variationen wurde auf RNA-Ebene eine erhöhte *hBD-1*-Expression im Bronchialepithel von COPD-Patienten nachgewiesen, die mit der Abnahme der Lungenfunktion assoziiert ist [301]. Interessanterweise wurde zudem gezeigt, dass das Rauchen, der Hauptrisikofaktor für die Entstehung der COPD, die Induktion der Expression von *hBD-2* im Atemwegsepithel bei respiratorischen Infektionen supprimiert [302]. Damit einhergehend wurden bei aktuellen aber auch ehemaligen Rauchern mit einer akuten Pneumonie nur geringe Konzentrationen von *hBD-2* im Rachenspülwasser und Sputum gemessen [302]. Diese durch das Rauchen verursachte Hemmung einer Erreger-induzierten AMP-Expression spielt womöglich auch bei aktuell oder ehemals rauchenden COPD-Patienten eine Rolle und könnte teilweise den Abwehrdefekt erklären, der die Betroffenen für die chronisch bakterielle Besiedlung der Lunge und für die akuten Infektexazerbationen der COPD prädisponiert [302, 303]. Tatsächlich wurde erst kürzlich entdeckt, dass rauchende COPD-Patienten bereits eine erniedrigte basale *hBD-2*-Expression in den Epithelzellen der zentralen Atemwege aufweisen, die mit der Zunahme der Atemwegsobstruktion und der Anzahlhöhe der Zigaretten-Packungsjahre zusammenhängt sowie möglicherweise eine mikrobielle Absiedlung in die distalen Atemwege und Lunge begünstigen kann [304]. Eine signifikante Herunterregulation der *hBD-1*-Expression konnte in klarzelligen Nierenkarzinomen, Prostatakarzinomen [305] und oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden [306], was offenbar die Progression der verschiedenen Tumorerkrankungen fördert, da *hBD-1* bei sonst entsprechender Expression aufgrund seiner antiproliferativen und apoptotischen Wirkung auf Tumorzellen die Karzinogenese hemmen kann [256, 307]. Demgegenüber konnte in oralen Plattenepithelkarzinomen eine Überexpression von *hBD-2* und *hBD-3* [261, 308] sowie in Ovarial-, Mamma- und Lungenkarzinomen eine gesteigerte Expression von LL-37 gezeigt werden [309-311], was aufgrund zellaktivierender und wachstumsfördernder Funktionen dieser überexprimierten AMP die Karzinogenese der jeweiligen Tumorentitäten zu begünstigen scheint [256].

### 3 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist weltweit die vierthäufigste Todesursache und eine der Hauptursachen für globale chronische Morbidität und Mortalität, die bei stetig zunehmender Prävalenz eine außerordentliche Herausforderung für die Gesundheitsversorgung darstellt. Im Zentrum der Pathogenese der COPD steht eine chronische Entzündungsreaktion in den unteren Atemwegen als enorm übersteigerte Immunantwort auf Inhalationsnoxen wie vorwiegend das Zigarettenrauchen, welche mit einer nicht vollständig reversiblen Atemflussbehinderung und progredienten Abnahme der Lungenfunktion einhergeht. Bei bis zu 32 % der COPD-Patienten konnte eine Besiedlung der unteren Atemwege mit dem humanpathogenen Bakterium *Moraxella catarrhalis* nachgewiesen werden, von der angenommen wird, dass sie die persistierende chronische Inflammation verstärkt und damit zur Progression der COPD beiträgt. Zudem wird der Krankheitsverlauf der COPD typischerweise durch rezidivierende bakteriell bedingte Exazerbationen erschwert, von denen etwa 15 % durch akute untere Atemwegsinfektionen mit *M. catarrhalis* verursacht werden. Um die Rolle von Atemwegsinfektionen mit *M. catarrhalis* für die Pathogenese der COPD und ihrer Exazerbationen besser zu verstehen und somit gerade auch in Anbetracht der steigenden Antibiotikaresistenz von *M. catarrhalis* neue Therapiemethoden zu entwickeln, von denen COPD-Patienten profitieren können, ist es erforderlich, die komplexen molekularen Interaktionen dieses COPD-assoziierten Erregers und den humanen respiratorischen Epithelzellen intensiv zu untersuchen.

Die Epithelzellen der Atemwege und Lunge sind erste Zielzellen für Infektionen mit *M. catarrhalis*. Dabei fungieren die respiratorischen Epithelzellen nicht nur als passive, physikalische Barriere, sondern zugleich auch als wichtige aktive Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr des Respirationstraktes. Ausgestattet mit mehreren unterschiedlichen keimbahnkodierten, mustererkennenden Rezeptoren (PRRs) sind die Epithelzellen in der Lage hoch konservierte, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) zu erkennen. Diese Pathogendetektion aktiviert PRR-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden, welche die Epithelzellen mitunter zur Produktion und Sekretion von verschiedenen inflammatorischen Mediatoren und antimikrobiellen Peptiden veranlassen. Auf diese Weise unterstützen die respiratorischen Epithelzellen die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen sowie die Beseitigung von pathogenen Erregern bei Atemwegsinfektionen.

Die antimikrobiellen Peptide (AMP) sind evolutionär sehr ursprüngliche und bedeutsame Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems. Sie wirken als körpereigene Antibiotika, die in der ersten Abwehrfront eine Vielzahl unterschiedlichster Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten abtöten oder deren Wachstum hemmen können. Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung üben sie allerdings auch vielfältige immunmodulatorische Funktionen aus und bilden dabei eine Schnittstelle in der Interaktion zwischen dem

### 3 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

---

angeborenen und erworbenen Immunsystem. Unterschiedliche *in vitro* oder *in vivo* Stimulationsversuche konnten in verschiedenen, u. a. respiratorischen Epithelzellen als Vertreter der humanen AMP die Induktion der Expression des humanen Cathelizidins LL-37 und der humanen  $\beta$ -Defensine hBD-2, hBD-3 und hBD-4 sowie die konstitutive Expression von hBD-1 nachweisen. Dabei nimmt das humane  $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) eine besonders wichtige Rolle in der epithelialen Immunabwehr ein, da hBD-3 von den humanen  $\beta$ -Defensinen die stärkste antimikrobielle Wirkung gegen ein außerordentlich breites Erregerspektrum besitzt und im Gegensatz zu den anderen AMP auch unabhängig von der Salzkonzentration antimikrobiell aktiv ist. Über die molekularen Regulationsmechanismen der hBD-3-Expression im Allgemeinen und speziell in den Epithelzellen der Atemwege und Lungenalveolen ist bislang wenig bekannt. Insbesondere die Bedeutung des hBD-3 in Bezug auf untere Atemwegsinfektionen mit *M. catarrhalis* ist bisher nicht untersucht worden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen adressiert werden:

- 1.) Ist hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis* antimikrobiell wirksam?
- 2.) Induziert *M. catarrhalis* die Expression von hBD-3 in humanen bronchialen und alveolaren Epithelzellen?
- 3.) Welche *M. catarrhalis*-Virulenzfaktoren sind für die Induktion der hBD-3-Expression in humanen respiratorischen Epithelzellen wichtig?
- 4.) Welche Rezeptoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren sind an der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Expression in humanen respiratorischen Epithelzellen beteiligt?

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Material**

Die in Laboratorien standardmäßig verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und ähnliches werden hier nicht extra aufgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen analytischem Reinheitsgrad.

#### **4.1.1 Zelllinien und Zellen**

##### **4.1.1.1 Humane primäre Bronchialepithelzellen (*primary bronchial epithelial cells* (PBEC))**

Die humanen primären Bronchialepithelzellen wurden im Rahmen einer Bronchoskopie mit Hilfe einer Bronchialbürste von gesunden freiwilligen Spendern in der Klinik für Infektiologie m. S. Pneumologie, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin gewonnen. Alle Probanden haben zuvor ihre schriftliche Einwilligung zu der Bronchoskopie und der Materialgewinnung gegeben. Die Durchführung dieser Methode ist von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Die Zellen wurden zwischen Passage 1 und 3 eingesetzt.

##### **4.1.1.2 Humane Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B)**

Die BEAS-2B-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Curtis C. Harris, NIH, Bethesda, MD zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei ihnen um eine humane Bronchialepithelzelllinie. Die Ursprungszellen wurden per Biopsie aus einer gesunden Spenderlunge gewonnen, durch Transfektion mit einem Adenovirus hybrid 12-SV40 (Ad12SV40) immortalisiert und im Anschluss geklont [312]. Ohne Zugabe von Serum bleiben die BEAS-2B-Zellen undifferenziert. Die Zellen wurden zwischen Passage 7 und 30 eingesetzt.

##### **4.1.1.3 Humane Typ II-Alveolarepithelzelllinie (A549)**

Die A549-Zellen wurden von American Type Culture Collection™ (ATCC, Rockville, USA; Nummer CCL-185) bezogen. Bei den A549-Zellen handelt es sich um eine humane Lungenkarzinomzelllinie, die Eigenschaften von humanen Typ II-Alveolarepithelzellen besitzt. Die Ursprungszellen wurden durch Explantatkultur von einem Lungenadenokarzinom eines 58-jährigen kaukasischen Mannes im Jahre 1972 gewonnen [313, 314]. Die Zellen wurden zwischen Passage 10 und 35 eingesetzt.

### 4.1.2 Zellkultur

Das für das Zellkulturmedium verwendete fetale Kälberserum (*fetal calf serum* (FCS)) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für eine Dauer von 30 min auf 56 °C erhitzt.

**Tabelle 4.1: Kulturmedien und Adhäsionsflüssigkeit für Primäre Bronchialepithelzellen (PBEC)**

Medien für PBEC	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Stimulationsmedium	500 ml Bronchial Epithelial Cell Basal Medium (BEBM) 0,5 ml Hydrocortison (0,5 µg/ml) 0,5 ml Epidermal Growth Factor (EGF) (0,5 ng/ml) 0,5 ml Epinephrin (0,5 µg/ml) 0,5 ml Transferrin (10 µg/ml) 0,5 ml Insulin (5 µg/ml) 0,5 ml All trans Retinolsäure (0,1 ng/ml) 0,5 ml Tri-Jodthyronin (6,5 ng/ml) 2 ml Bovine pituitary extract (52 µg/ml)	Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza Clonetics, Lonza
Zellkulturmedium	100 ml Stimulationsmedium 0,5 ml GA-1000 (= Gentamycin (50 µg/ml) und Amphotericin B (50 ng/ml)) 20 µl Nystatin 10 µl Ciprofloxacin	Clonetics, Lonza Sigma Sigma
Adhäsionsflüssigkeit	31,6 ml Essigsäure 400 µl Kollagen	Merck Vitrogen 100

**Tabelle 4.2: Kulturmedien, Kryomedium und Adhäsionsflüssigkeit für BEAS-2B-Zellen**

Medien für BEAS-2B-Zellen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Stimulationsmedium	500 ml Keratinocyte SFM 2,50 µg Epidermal Growth Factor (EGF) 25 mg Bovine pituitary extract 5 ml Glutamin (200 mM, 100 x) 250 µl Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml) 50 µl All trans Retinolsäure (1 mg/ml)	Gibco Gibco Gibco Gibco Sigma Sigma
Zellkulturmedium	500 ml Stimulationsmedium 200 µl Amphotericin B (500x) 7 ml Penicillin/ Streptomycin (100 x)	Roche PAA
Adhäsionsflüssigkeit	100 ml Keratinocyte SFM 1 ml Bovines Serumalbumin (BSA) (100 mg/ml) 1 ml Fibronectin (1 mg/ml) 100 µl Vitronectin (50 µg/ml)	Gibco Sigma Sigma Sigma
Kryokonservierungsmedium	10 ml Keratinocyte SFM 1% Polyvinylpyrrolidon (PVP) 7,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	Gibco Sigma Sigma

**Tabelle 4.3: Kulturmedien und Kryomedium für A549-Zellen**

Medien für A549-Zellen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Stimulationsmedium	500 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Zellkulturmedium	500 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) 10 % FCS (hitzeinaktiviert)	Gibco Gibco
Kryokonservierungsmedium	500 ml Zellkulturmedium 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

Tabelle 4.4: Materialien für die Zellkultur

Materialien für die Zellkultur	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Waschpuffer bei Zellkultivierung und -passagierung	PAA
Trypsin/EDTA (1x)	Ablösen der Zellen	Gibco
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	Trypsininhibitor bei Zellpassagierung von PBEC	Clonetics, Lonza
Erythrina trypsin inhibitor (ETI) (30 mg/ml)	Trypsininhibitor bei Zellpassagierung von BEAS-2B-Zellen	Roche
Zellkulturflaschen, -schalen und -platten	Kultivierung von Zellen	BD Falcon™
Kryokonservierungsröhrchen (1 ml)	Kryokonservierung/Einfrieren der Zelllinien	Nalgene

#### 4.1.3 Transiente Transfektion von *small interfering RNA* (siRNA) in A549-Zellen

Tabelle 4.5: Reagenzien und Materialien für siRNA-Transfektion

Reagenzien und Materialien für siRNA-Transfektion	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Cell Line Nucleofector™ Kit V	siRNA-Transfektion in eukaryotische Zellen mittels Nucleofektion	Amaxa

Tabelle 4.6: siRNA-Sequenzen

siRNA		Sequenz	Bezugsquelle
Kontrolle (c)	sense	5' - UUCUCCGAACGUGUCACGUtt	MWG Biotech AG
	antisense	5' - ACGUGACACGUUCGGAGAAtt	
TLR2	sense	5' - GCCUUGACCUGUCCAACAAtt	Ambion
	antisense	5' - UUGUUGGACAGGUCAAGGcTt	
TLR4	sense	5' - CAUUGAAGAAUUCGGAUUAtt	Ambion
	antisense	5' - UAAUCGGAUUUCUCAAUGgt	

#### 4.1.4 Stimulanzen

Tabelle 4.7: Stimulanzen

Stimulanzen	Ursprung	Bezugsquelle
IL-1β	rekombinant human	R&D Systems
TNF-α	rekombinant human	R&D Systems
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	synthetisch	Alexis
LOS	<i>M. catarrhalis</i> O35E-Wiltypt	Prof. Christoph Aebi, Universität Bern, Schweiz [73]
LPS	<i>Salmonella minnesota</i> R595	Alexis

#### 4.1.5 Chemische Inhibitoren

Tabelle 4.8: Chemische Inhibitoren

Inhibitoren	Wirkung	Bezugsquelle
SB202190	inhibiert p38 MAPK	Calbiochem
U0126	inhibiert MEK1/2 MAPKK und somit ERK1/2-Aktivierung	Calbiochem
SP600125	inhibiert JNK	Calbiochem
IKK-NBD	inhibiert IKK-Untereinheit NEMO und somit NF-κB-Aktivierung	Biomol

## 4.1.6 Bakterien

Tabelle 4.9: *Moraxella catarrhalis*-Stämme

Bakterienstamm	Merkmale	Bezugsquelle
ATCC 25238	<i>M. catarrhalis</i> Wildtyp, Serotyp A	American Type Culture Collection™ (ATCC), Manassas VA, USA
O35E	<i>M. catarrhalis</i> Wildtyp, Serotyp A	Prof. Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA
O46E	<i>M. catarrhalis</i> Wildtyp, Serotyp A	Prof. Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA
O35E.1	<i>M. catarrhalis</i> O35E-UspA1-defiziente Mutante, Kanamycin-resistent	Prof. Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA [315]
O35E.2	<i>M. catarrhalis</i> O35E-UspA2-defiziente Mutante, Kanamycin-resistent	Prof. Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA [315]
O35E.lpxA	<i>M. catarrhalis</i> O35E-LOS-defiziente Mutante, Kanamycin-resistent	Prof. Christoph Aebi, Universität Bern, Schweiz [73]

## 4.1.7 Bakterienkultur

Alle Bakterienstämme wurden für die Langzeitlagerung in Glycerolstocks bei -80 °C eingefroren. Für den kurzfristigen Gebrauch wurden entsprechende Bakterien-Glycerolstocks bei -20 °C gelagert. Das *Brain Heart Infusion* (BHI)-Nährmedium für die Bakterienkultur wurde nach Fertigstellung für 10 min bei 115 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4.10: Medien für die Kultur von *M. catarrhalis*-Stämmen

Medien für <i>M. catarrhalis</i> -Stämme	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Brain Heart Infusion (BHI)-Medium	37 g BHI-Pulver 1000 ml Aqua bidest	BD Bioscience
Brain Heart Infusion-Glycerolmedium	500 µl BHI-Medium 500 µl Glycerol (99 %ig)	Sigma
Kultivierungs-/Anzuchtplatten	Columbia Agar mit 5 % Schafsblut	BD Mikrobiologie

Tabelle 4.11: Materialien für die Bakterienkultur

Materialien für die Bakterienkultur	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Einmal Impfösen 10 µl Kanamycin (20 µg/ml)	Ausplattieren von Bakterien Selektionsantibiotikum für O35E.1, O35E.2, O35E.lpxA	Roth Sigma

### 4.1.8 Antimikrobielle Peptide (AMP)-Empfindlichkeitstest

Tabelle 4.12: Lösungen für AMP-Empfindlichkeitstest

Lösungen für AMP-Empfindlichkeitstest	Zusammensetzung	Bezugsquelle
1. AMP-Bakterien-Lösung	1 µg/ml rekombinantes humanes (rh)-BD-3 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp O35E oder 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp ATCC 25238 500 µl Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Cellsciences siehe Tabelle 4.9 PAA
2. AMP-Bakterien-Lösung	10 µg/ml rekombinantes humanes (rh)-BD-3 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp O35E oder 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp ATCC 25238 500 µl Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Cellsciences siehe Tabelle 4.9 PAA
Positivkontroll-Bakterien-Lösung	200 µg/ml Imipenem 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp O35E oder 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp ATCC 25238 500 µl Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	MSD Sharp & Dohme siehe Tabelle 4.9 PAA
Negativkontroll-Bakterien-Lösung	10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp O35E oder 10 <sup>4</sup> CFU/ml <i>M. c.</i> Wildtyp ATCC 25238 500 µl Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	siehe Tabelle 4.9 PAA

Tabelle 4.13: Sonstige Materialien für AMP-Empfindlichkeitstest

Sonstige Materialien für AMP-Empfindlichkeitstest	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Einmal-Impfösen 10 µl	Ausplattieren der Bakterien-Lösung	Roth
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut	Anzucht der Bakterien zum Aus zählen der Bakterienkolonien	BD Mikrobiologie

### 4.1.9 Reverse Transkription (RT)

Tabelle 4.14: Puffer und Mastermixe für RT

Puffer und Mastermixe für RT	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Lysepuffer für RNA-Isolierung	1 ml RLT 0,01 % β-Mercaptoethanol	Qiagen Sigma
1. Mastermix RT für je 1 µg RNA-Probe	1 µl Random Hexamer-Primer (0,2 µg/µl) 1 µl dNTPs (10 mM) Aqua bidest. variabel bis 10 µl Gesamtvolumen	Promega Promega
2. Mastermix RT für je 1 µg RNA-Probe	4 µl M-MLV-Puffer (5 x) 2 µl DTT (0,1 M) 1 µl RNasin Ribonuklease Inhibitor (40 U) 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega Promega Promega Invitrogen

Tabelle 4.15: Sonstige Reagenzien und Materialien für RT

Sonstige Reagenzien und Materialien für RT	Verwendungszweck	Bezugsquelle
QIAshredder™	Homogenisierung des Zelllysats	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	RNA-Isolierung und-Aufreinigung	Qiagen
Quarzglasküvetten Typ 105.200	RNA-Messung	Hellma
PCR Tubes (0,5 ml, thin walled)	hitze stabile DNase- und RNase-freie Reaktionsgefäße	Eppendorf



#### 4.1.10 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Tabelle 4.16: Puffer, Mastermix und Gel für PCR

Puffer, Mastermix und Gel für PCR	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Mastermix PCR für je 5 µl cDNA- bzw. Promotor-DNA-Probe	2,5 µl Red Taq-Puffer (10 x) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,25 µl Vorwärts-Primer (0,5 µg/µl) 0,25 µl Rückwärts-Primer (0,5 µg/ml) 0,5 µl Red Taq DNA-Polymerase (1 U/µl) 16 µl Aqua bidest.	Sigma Promega Tib Molbiol Tib Molbiol Sigma
TAE Puffer (pH 8,0) für DNA-Gelelektrophorese	4,84 g Tris Base 1,14 ml Eisessig (100 %ig) 2 ml EDTA (0,5 M) 1000 ml Aqua bidest.	Sigma Merck Roth
Gel 2 %ig für DNA-Gelelektrophorese	100 ml TAE Puffer 2 g Agarose 4 µl Ethidiumbromid (0,04 µl/ml)	Promega Invitrogen

Tabelle 4.17: Sonstige Reagenzien und Materialien für PCR

Sonstige Reagenzien und Materialien für PCR	Verwendungszweck	Bezugsquelle
PCR Tubes (0,5 ml, thin walled)	hitzestabile DNase- und RNase-freie Reaktionsgefäße	Eppendorf
100 bp DNA Step Ladder	Hilfe bei der Detektion der gesuchten DNA-Bande	Promega

Tabelle 4.18: Primer-Sequenzen für semiquantitative PCR

Gen		Sequenz	Annealing-temperatur	Zyklen	Bezugsquelle
hBD-3	vorwärts	5'- TCTCAgCgTggggTgAAgC	69 °C	32	Tib Molbiol
	rückwärts	5'- CggCCgCCTCTgACTCTg			
TLR2	vorwärts	5'- gCCAAAgTCTTgATTgATTgg	63 °C	28	Tib Molbiol
	rückwärts	5'- TTgAAgTTCTCCAgCTCCTg			
GAPDH	vorwärts	5'- CCACCCATggCAAATTCCATggCA	60 °C	22	Tib Molbiol
	rückwärts	5'- TCTAgACggCAggTCAGgTCCACC			
hBD-3-Promotor	vorwärts	5'- TCCCAGAActAACACACCCTT	65 °C	32	Tib Molbiol
	rückwärts	5'- TTCCAGCCACAGCTGCAATT			

#### 4.1.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Tabelle 4.19: Reagenzien und Materialien für hBD-3-ELISA

Reagenzien und Materialien für hBD-3-ELISA	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Human β-Defensin-3 ELISA Kit	Quantifizierung von sezerniertem hBD-3 im Zellüberstand	Phoenix Pharmaceuticals

## 4.1.12 Western Blot

Tabelle 4.20: Puffer, Lösungen und Gele für Western Blot

Puffer, Lösungen und Gele für Western Blot	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Phosphoproteinwaschpuffer	5 ml Natriumorthovanadat (98 %ig, 200 mM) 50 ml Natriumphosphat (150 nM) 50 ml Natriumfluorid (99 %ig, 1 M) 500 ml Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (1 x)	Sigma Sigma Sigma PAA
Lysepuffer zur Gesamtproteinextraktion	100 µl Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) 1 µl EDTA (250 mM) 50 µl Nonidet TM P-40 10 µl PMSF (1 mM) je 5 µl Antipain, Leupeptin, Pepstatin (10 µg/ml) 833 µl Phosphoproteinwaschpuffer	Sigma Roth Sigma Sigma Sigma
Bradford Reagenz	20 % Bio-Rad Protein Assay-Lösung 80 % Aqua bidest.	Bio-Rad
Gelladepuffer (4 x) nach Lämmli	1 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) 800 µl Glycerol 1,6 ml SDS (10 % w/v) 400 µl Bromphenolblau (1 % w/v) 400 µl β-Mercaptoethanol (1 % w/v) 950 µl Aqua bidest.	Sigma Sigma Serva Pharmacia Biotech Sigma
Gelelektrophorese-Laufpuffer	3 g Tris-Base 14,4 g Glycin 1 g SDS (10 % w/v) 1000 ml Aqua bidest.	Sigma Merck Serva
Blotpuffer	3 g Tris-Base 14,4 g Glycin 20 % Methanol 1000 ml Aqua bidest.	Sigma Merck Merck
Blockpuffer	50 % Odyssey Blocking Buffer 50 % Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (1 x)	LI-COR PAA
Ponceau S-Proteinfärbelösung	1 g Ponceau S 50 ml Essigsäure (100 %ig) 1000 ml Aqua bidest.	Sigma Merck
Waschpuffer	5 l Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (1 x) 5 ml Tween 20	PAA Sigma
Sammelgel	2,5 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) 100 µl SDS (10 % w/v) 1,33 ml Bis-Acrylamid (40 % w/v) 10 µl TEMED 3,35 ml APS (10 % w/v) 6 ml Aqua bidest.	Sigma Serva Serva R&D Systems Serva
Trenngel 10 %ig	2,5 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) 100 µl SDS (10 % w/v) 2,5 ml Bis-Acrylamid (40 % w/v) 5 µl TEMED 50 µl APS (10 % w/v) 4,85 ml Aqua bidest.	Sigma Serva Serva R&D Systems Serva
Trenngel 7 %ig	2,5 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) 100 µl SDS (10 % w/v) 1,65 ml Bis-Acrylamid (40 % w/v) 5 µl TEMED 50 µl APS (10 % w/v) 5,7 ml Aqua bidest.	Sigma Serva Serva R&D Systems Serva

Tabelle 4.21: Sonstige Reagenzien und Materialien für Western Blot

Sonstige Reagenzien und Materialien für Western Blot	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Kaleidoscope™ Protein Standard	Hilfe bei der Detektion der gesuchten Protein-Bande	Bio-Rad
Nitrocellulose Hybond-ECL-Membran	Proteintransfer	Amersham
Whatman Filterpapier	Proteintransfer	Whatman
Kunststoffküvetten	Proteinmessung im Photometer	Serva

Tabelle 4.22: Primäre Antikörper für Western Blot

Primäre Antikörper	Spezies	in Blockpuffer verdünnte Konzentration	Bezugsquelle
ERK 1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
p-ERK 1/2	Maus	1:1000	Santa Cruz
JNK	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
p-JNK	Maus	1:1000	Santa Cruz
p38	Maus	1:1000	Santa Cruz
p-p38	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
TLR4	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Akt	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling

Tabelle 4.23: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Sekundäre Antikörper	Spezies	in Blockpuffer verdünnte Konzentration	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an IRDye800	1:2000	LI-COR
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	1:2000	LI-COR
Anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	1:2000	LI-COR

#### 4.1.13 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Tabelle 4.24: Puffer und Lösungen für ChIP

Puffer und Lösungen für ChIP	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Fixierlösung	1 % Formaldehyd (37 %ig) 40 ml Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Sigma
Neutralisationslösung	4,69 g Glycin 500 ml Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Serva PAA
RIPA-Puffer	10 mM Tris (pH 7,5) 150 mM Natriumchlorid 1 % Nonidet® P-40 (99 %ig) 1 % Desoxycholat (97 %ig) 0,1 % SDS (10 % w/v) 1 mM EDTA 1 % Aprotinin	Sigma Merck Fluka Sigma Serva Roth Sigma
High Salt Puffer	10 mM Tris (pH 7,5) 2 M Natriumchlorid 1 % Nonidet® P-40 (99 %ig) 0,5 % Desoxycholat (97 %ig) 1 mM EDTA	Sigma Merck Fluka Sigma Roth
TE-Puffer	10 mM Tris (pH 7,5) 1 mM EDTA	Sigma Roth
Eluierungspuffer	TE-Puffer 1 % SDS (10 % w/v)	Serva

Tabelle 4.25: Sonstige Reagenzien und Materialien für ChIP

Sonstige Reagenzien und Materialien für ChIP	Verwendungszweck	Bezugsquelle
PCR Purification Kit	ChIP-DNA Aufreinigung	Qiagen
Protein Agarose A und G	Immunpräzipitation	Upstate
RNAse A	RNA-Abbau	Sigma
Proteinase K	Protein-Abbau	Merck

Tabelle 4.26: Antikörper für ChIP

Antikörper	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
Polymerase II (Pol II)	Kaninchen	1:50	Santa Cruz
c-Jun	Kaninchen	1:50	Santa Cruz

#### 4.1.14 Geräte

Die in Laboratorien standardmäßig eingesetzten Geräte wie Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Inkubatoren, Schüttler, Zentrifugen, Eismaschinen usw. werden hier nicht extra gelistet. Sie entsprechen alle den gängigen Standards und wurden regelmäßig gewartet.

Tabelle 4.27: Geräte

Produkte	Verwendungszweck/Methode	Bezugsquelle
BioPhotometer, Spektralphotometer	RNA-Konzentrationsmessung	Eppendorf
Bio-Mate 3 Spektralphotometer	Protein-Konzentrationsmessung und Bakterien-Konzentrationsmessung	Thermo Electron Corporation
CAMEDIA C-4040 200M Digitalkamera	Fotodokumentation der DNA-Banden	Olympus
Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für CAMEDIA C-4040 200M Digitalkamera	Life Technologies™
Mikroskop BX 60	Lichtmikroskopische Begutachtung der Zellen	Olympus
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Western Blot)	Bio-Rad
Mini Trans-Blot Cell	Proteintransfer (Western Blot)	Bio-Rad
MR5000 Microplate Reader	Auslesen der ELISA-Mikrotiterplatten	Dynatech
Nucleofector™	siRNA-Transfektion	Amaxa
Odyssey Infrared Imaging System	Scan-Dokumentation der Protein-Banden (Western Blot)	LI-COR
Power Shot A620 Digitalkamera	Fotodokumentation und Auswertung des AMP-Empfindlichkeitstests	Canon
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Durchführung der RT-PCR	MJ Research
Sub-Cell System Elektrophoresekammer	DNA-Gelelektrophorese (PCR)	Bio-Rad
TFX-20M GIBCO BRL UV-Transilluminator	Darstellung der DNA-Banden	Life Technologies™
Thermomixer Comfort	Erhitzen von Proben	Eppendorf
Ultraschallgerät, Sonde Bandelin Sonoplus	Sonifizierung	Bandelin

### 4.1.15 Analysesoftware

Tabelle 4.28: Analysesoftware

Software	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Bio-Imaging-Control, argus X1, Version 2.0	Programm zur Fotodokumentation der DNA-Banden	Biostep GmbH
BioLinX, Version 2.21	Programm zur Messung der ELISA-Mikrotiterplatten	Dynatech Laboratories
Infrared Odyssey Imaging System Application Software, Version 2.0	Programm zur Scan-Dokumentation der Protein-Banden (Western Blot)	LI-COR
GraphPad PRISM, Version 5.0	Programm zur statistischen Auswertung der ELISA-Daten	GraphPad Software Inc.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Alle Zellkulturmedien und -lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Unsterile Medien bzw. Materialien wurden zuvor autoklaviert, heißluftsterilisiert oder sterilfiltriert. Die Werkbanken und Geräte wurden vor und nach Gebrauch mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

#### 4.2.1.1 Kultivierung und Passagierung von primären Bronchialepithelzellen (PBEC)

Die Kultivierung der PBEC erfolgte in T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen. Das Zellkulturmedium wurde alle 4 Tage gewechselt. Vor Aussaat nach Zellgewinnung und vor Passagierung der PBEC wurde der Gefäßboden der Zellkulturgefäße mit ausreichend Adhäsionsflüssigkeit für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die restliche Adhäsionsflüssigkeit wieder abgenommen. Die per Bronchialbürste frisch isolierten Bronchialepithelzellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur und 800 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in die mit Adhäsionsflüssigkeit vorbehandelten T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen überführt. Die Passagierung der PBEC erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens in der T<sub>25</sub>-Zellkulturflasche. Für die Passagierung wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C. Nach einigen Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche vom Flaschenboden gelöst. Die Trypsinreaktion wurde anschließend sofort mit 1,5 ml *Trypsin Neutralization Solution* (TNS) gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml PBS

aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in ca. 25 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und bis zu einem Verhältnis von 1:5 schließlich in die neuen zuvor mit Adhäsionsflüssigkeit inkubierten Zellkulturflaschen oder Lochplatten verteilt. Da es sich bei diesen Zellen um primäre Zellen handelt, konnte die Passagierung maximal dreimal erfolgen.

### 4.2.1.2 Kultivierung und Passagierung von BEAS-2B-Zellen

Die Kultivierung der BEAS-2B-Zellen erfolgte in T<sub>75</sub>-Zellkulturflaschen. Alle 2 Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Vor Aussaat nach dem Auftauen der BEAS-2B-Zellen (siehe Kapitel 4.2.1.4) und vor der Passagierung wurde der Boden der neuen Zellkulturgefäße mit ausreichend Adhäsionsflüssigkeit für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die restliche Flüssigkeit wieder abgenommen. Die Passagierung der BEAS-2B-Zellen erfolgte nach Ausbildung eines Monolayers in den T<sub>75</sub>-Zellkulturflaschen. Für die Passagierung wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde je T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung eingesetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche vom Flaschenboden gelöst, in 10 ml PBS aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 200 µl Trypsin-Inhibitor resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 30 ml frisches Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 auf die neuen zuvor mit Adhäsionsflüssigkeit inkubierten Zellkulturflaschen oder Lochplatten ausgesät.

### 4.2.1.3 Kultivierung und Passagierung von A549-Zellen

Die Kultivierung der A549-Zellen erfolgte in T<sub>75</sub>-Zellkulturflaschen. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die Passagierung der A549-Zellen erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens in der T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung je T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche und Inkubation für 5 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche vom Flaschenboden gelöst, in 10 ml frisches Zellkulturmedium aufgenommen, dessen FCS-Gehalt das Trypsin inaktiviert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 40 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 auf neue Zellkulturflaschen oder Lochplatten verteilt.

#### 4.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von BEAS-2B- und A549-Zellen

Zur Kryokonservierung von BEAS-2B- und A549-Zellen wurde zunächst wie bei der Passagierung der Zelllinien einer 100 %ig konfluenten T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche beschrieben vorgegangen. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 3 ml der jeweiligen Zelllinie entsprechendem Kryokonservierungsmedium suspendiert und je 1 ml in Kryokonservierungsröhrchen verteilt. Um schädigende Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden, wurden die Kryokonservierungsröhrchen in einer Ethanol-Kryobox zunächst für 5 Stunden auf -20 °C und anschließend für 15 Stunden auf -80 °C heruntergekühlt, bevor die Umlagerung zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196 °C) erfolgte.

Zum Auftauen wurde das Kryokonservierungsröhrchen aus dem Stickstofftank in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml jeweiligem Zellkulturmedium suspendiert und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

#### 4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zunächst wie bei der Passagierung beschrieben behandelt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium suspendiert und 20 µl dieser Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellzahlen innerhalb zweier Großquadrate der Zählkammer gezählt. Aus dem Mittelwert der Zellzahl aus 2 Großquadraten und der Kammerkonstanten 10<sup>4</sup> wurde anhand nachfolgender Formel die Zellzahl pro ml Suspension berechnet:  $\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl aus 2 Großquadraten})/2 \times \text{Kammerkonstante } 10^4$ .

#### 4.2.1.6 Transiente Transfektion von *small interfering RNA* (siRNA) in A549-Zellen

Die transiente (ohne Selektionsdruck) Transfektion von siRNA in A549-Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung des Nucleofector™ und des Cell Line Nucleofector™ Kit V (Amaya). Bei diesem Transfektionsverfahren wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls kurzzeitig für die siRNA permeabel gemacht. Die eingedrungene siRNA interferiert mit der mRNA des Zielproteins, was deren Abbau bewirkt und somit letztlich durch Verhinderung der Translation zum Ausschalten des gewünschten Zielproteins führt. Für die Transfektion von 2 µg siRNA wurden 1 x 10<sup>6</sup> A549-Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl Nucleofector™-Solution V resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µg siRNA wurde der Ansatz in eine Nucleofector™-Küvette pipettiert und diese in den Nucleofector™ gestellt. Durch Starten des vom Hersteller vorgegebenem Programms G16 für A549-Zellen wurde die

siRNA per Elektroporation in die Zellen transfiziert. Nach der Transfektion wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem Zellmedium überführt und anschließend die benötigte Zellmenge auf mit ausreichend Zellmedium vorgelegten Zellkulturplatten verteilt.

### 4.2.1.7 Einsatz von Stimulanzen, Inhibitoren und Kontrollen

Für den Einsatz von Stimulanzen oder chemischen Inhibitoren wurden die Zellen in die benötigten Lochplatten passagiert und bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers kultiviert. Am Vortag der Stimulation mit den Reagenzien wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Stimulationsmedium versetzt. Am Stimulationstag wurde die gewünschte Konzentration der Stimulanzen durch Verdünnung in frischem Stimulationsmedium eingestellt und für die entsprechende Stimulationsdauer auf die Zellen gegeben. Die Zellstimulation mit *M. catarrhalis* O35E-spezifischem-LOS und *Salmonella minnesota* R595-LPS erfolgte in Anwesenheit von 2 % FCS zur Bereitstellung von TLR4-akzessorischen Molekülen und Ko-Rezeptoren [176, 177]. Alle verwendeten chemischen Inhibitoren wurden eine Stunde vor der jeweiligen Zellstimulation mit *M. catarrhalis* (siehe Kapitel 4.2.2.4) in den entsprechenden Konzentrationen vorinkubiert und zu Stimulationsbeginn nach Mediumwechsel bzw. Wechsel auf den Bakterien-Stimulationsansatz erneut hinzugefügt. In allen Versuchen wurde parallel als Negativkontrolle nur das entsprechende Stimulationsmedium für die gleiche Versuchsdauer eingesetzt. Die nach dem Einsatz der Reagenzien durchgeführte Probengewinnung wird bei den jeweiligen molekularbiologischen und biochemischen Methoden beschrieben.

### 4.2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Bakterienkultivierung erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> 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 (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert. Wurden Zellen mit Bakterien stimuliert, erfolgte die Stimulation und Inkubation unter den Bedingungen der Bakterienkultur. Mit Bakterien kontaminierte Abfälle wurden autoklaviert.

#### 4.2.2.1 Kultivierung von *Moraxella catarrhalis*-Stämmen

Zur Anzucht der verschiedenen *M. catarrhalis*-Stämme wurde eine Impföse aus den entsprechenden bei -20 °C gelagerten Glycerolstocks entnommen und auf jeweilige Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen. Bei der Anzucht der *M. catarrhalis*-Mutanten O35E.1, O35E.2 und O35E.lpxA wurde vor Beimpfung zusätzlich



40 µl Kanamycin als Selektionsantibiotikum auf die Columbia-Agarplatten aufgetragen. Die mit *M. catarrhalis* beimpften Columbia-Agarplatten wurden dann für 8–12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden einige einzeln wachsende Bakterienkolonien mit einer Impföse abgestrichen und in 25 ml BHI-Medium suspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen unter Schütteln bei 37 °C für ca. 2 Stunden inkubiert. Auf diese Weise erreichen die Moraxellen eine mittlere logarithmische Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen. Danach wurde die Bakterienkultur im Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet in für die Zellstimulation entsprechendem Stimulationsmedium oder PBS aufgenommen. Die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Eine OD<sub>405</sub> von 0,3 entspricht einer *M. catarrhalis*-Konzentration von  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFU)/ml.

### 4.2.2.2 Anlegen der Glycerolstocks von *Moraxella catarrhalis*-Stämmen

Zum Anlegen eines Glycerolstocks wurden die *M. catarrhalis*-Stämme wie bei der Kultivierung beschrieben (siehe Kapitel 4.2.2.1) angezüchtet. Nach der Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 1 ml BHI-Glycerol-Kryomedium suspendiert und in ein 1 ml Kryokonservierungsröhrchen überführt. Für die Langzeitlagerung wurden die angelegten *M. catarrhalis*-Glycerolstocks bei -80 °C eingefroren. Die *M. catarrhalis*-Glycerolstocks für die tägliche Kultivierung wurden jeden Monat neu nach dem beschriebenen Verfahren aus den -80 °C-Glycerolstocks angelegt und bei -20 °C gelagert.

### 4.2.2.3 Hitzeinaktivierung von *Moraxella catarrhalis*

Zur Hitzeinaktivierung wurde *M. catarrhalis* wie bei der Kultivierung beschrieben (siehe Kapitel 4.2.2.1) angezüchtet und eine in PBS suspendierte Bakterienlösung mit einer Konzentration von  $10^7$  CFU/ml eingestellt. Anschließend wurde die eingestellte Bakteriensuspension auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 30 Minuten bei 95 °C im Wärmeblock inkubiert. Nach Abkühlung wurde die  $10^7$  CFU/ml konzentrierte, hitzeinaktivierte Bakteriensuspension weiter im Stimulationsmedium auf die für die Versuche benötigte Konzentration verdünnt und für die Zellstimulation eingesetzt. Zur Kontrolle der Inaktivierung der Moraxellen durch Hitzeinwirkung wurde nach Abkühlung parallel eine Impföse der erhitzten Bakteriensuspension entnommen, auf eine Columbia-Agarplatte mit 5 % Schafsblut ausgestrichen und für 8–12 Stunden im Brutschrank inkubiert. Sofern nach der Inkubation keine Bakterienkolonien wuchsen, konnte von einer erfolgreichen Hitzeinaktivierung ausgegangen werden.

#### 4.2.2.4 Zellstimulation mit *Moraxella catarrhalis*-Stämmen

Vorbereitend für die Zellstimulation mit *M. catarrhalis*-Stämmen wurden die Zellen in benötigten Lochplatten passagiert und bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens kultiviert. Am Vortag der Infektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Stimulationsmedium versetzt. Ebenfalls am Vortag der Infektion wurden die *M. catarrhalis*-Stämme auf Columbia-Agarplatten ausgestrichen und für 8–12 Stunden bis zum Stimulationstag bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank wie bei der Kultivierung beschrieben (Kapitel 4.2.2.1) inkubiert. Am Stimulationstag wurde nach weiterer Kultivierung und Zentrifugation das Bakterienpellet in dem der jeweiligen Zelllinie entsprechenden Stimulationsmedium suspendiert und die OD<sub>405</sub> der Bakterien-suspension spektralphotometrisch ermittelt. Durch entsprechende Verdünnungen im Stimulationsmedium wurde die für die Infektion notwendige Bakterienkonzentration eingestellt. Anschließend wurde das auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und durch gleiches Volumen an eingestellter Bakteriensuspension ersetzt. Die infizierten Zellen wurden für die jeweilige Stimulationsdauer bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die nach der Infektion mit *M. catarrhalis* durchgeführte Probengewinnung wird bei den jeweiligen molekularbiologischen und biochemischen Methoden beschrieben.

#### 4.2.2.5 Antimikrobielle Peptide (AMP)-Empfindlichkeitstest

Für den AMP-Empfindlichkeitstest wurden die *M. catarrhalis*-Wiltypstämme O35E und ATCC 25238 wie bei der Kultivierung beschrieben (siehe Kapitel 4.2.2.1) angezüchtet. Anschließend wurde für jeden Bakterienstamm jeweils eine in PBS angesetzte Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 10<sup>4</sup> CFU/ml eingestellt. Bei PBS handelt es sich um eine bakteriostatische und zugleich physiologische Pufferlösung, so dass bei den Versuchsansätzen in PBS zum einen ein durch mögliches Bakterienwachstum [316] und zum anderen ein durch mögliche pH-abhängige Wirkung von hBD-3 [238] beeinflusstes Versuchsergebnis ausgeschlossen wird. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden als Versuchsansätze 500 µl der jeweiligen 10<sup>4</sup> CFU/ml konzentrierten Bakterienstammsuspension mit 10 µg/ml rhBD-3 bzw. mit 1 µg/ml rhBD-3 in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrollen wurden für jeden Untersuchungszeitpunkt 500 µl der jeweiligen 10<sup>4</sup> CFU/ml konzentrierten Bakterienstammsuspension mit 200 µg/ml Imipenem in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrollen wurden für jeden Untersuchungszeitpunkt 500 µl der jeweiligen 10<sup>4</sup> CFU/ml konzentrierten Bakterienstammsuspension ohne weitere Zusätze in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten (0, 0,5, 1 und 2 Stunden) wurden jeweils von den Versuchsansätzen, Positivkontrollen und Negativkontrollen 100 µl Probenlösung entnommen und auf einzelne Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen. Nach einer Inkubation der Agarplatten von ca. 12 Stunden im Brutschrank wurden die gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt. Zur Dokumentation des Ergebnisses wurden

die Agarplatten mit der Canon Power Shot A620 Digitalkamera fotografiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden nach folgender Berechnung dargestellt:  $CFU [\%] = (CFU \text{ zum Zeitpunkt } X \text{ Stunden}) \times 100 / (CFU \text{ zum Zeitpunkt } 0 \text{ Stunden})$ .

### **4.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

##### **4.2.3.1.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA**

Nach der Zellstimulation wurde der Stimulationsüberstand abgenommen und die Zellen je Vertiefung einer 12-Lochplatte mit 175  $\mu$ l Lysepuffer lysiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit QIAshredder und RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die RNA-Konzentration wurde über die Messung der optischen Dichte einer 1:100 verdünnten RNA-Probe (2  $\mu$ l RNA-Isolat + 198  $\mu$ l Aqua bidest.) in einer Quarzküvette mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht bei einer 1:100 Verdünnung einer RNA-Konzentration von 4  $\mu$ g/ $\mu$ l. Die RNA-Konzentration wurde daher wie folgt berechnet:  $RNA [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \times 4$ . Eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis  $OD_{260}$  (Absorptionsmaximum RNA) und  $OD_{280}$  (Absorptionsmaximum Proteine) ermittelt werden, wobei der Quotient bei reiner RNA zwischen 1,7 und 1,9 liegt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

##### **4.2.3.1.2 Reverse Transkription (RT)**

Die Pipettierarbeiten zur Fertigstellung der RT-Reaktionsgemische erfolgten wegen der Instabilität der Substanzen stets auf Eis. Pro Ansatz wurde 1  $\mu$ g RNA eingesetzt und mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 10  $\mu$ l verdünnt. Die Proben wurden nach Zugabe des 1. Mastermix der RT für 5 Minuten bei 65 °C im Thermal Cycler denaturiert und für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt und jedem Denaturierungsansatz der 2. Mastermix der RT hinzugefügt. Die Reverse Transkriptase-Reaktion mit Umschreibung der RNA zu cDNA wurde daraufhin im Thermal Cycler für 50 Minuten bei 37 °C gestartet und durch Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten und darauffolgende Herunterkühlung auf 4 °C beendet. Die cDNA wurde mit 80  $\mu$ l Aqua bidest. verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

##### **4.2.3.1.3 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Pipettierarbeiten zur Fertigstellung der PCR-Reaktionsgemische erfolgten wegen der Instabilität der Substanzen stets auf Eis. Für die Amplifizierung der DNA wurde je Probe 5  $\mu$ l cDNA eingesetzt und mit dem Mastermix der PCR in dünnwandigen Reaktionsgefäßen vermischt. Im Thermal Cycler erfolgte zunächst für 3 Minuten eine initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C. Daran schloss sich der PCR-Zyklus an, der entsprechend des linearen Amplifikationsbereiches der DNA-Sequenz 20-

bis 35-mal unter folgenden Konditionen wiederholt wurde: 1 Minute Denaturierung bei 94 °C, 1 Minute Hybridisierung der Primer an die DNA-Einzelstränge bei Primer-spezifischer Annealing-/Hybridisierungstemperatur und 1 Minute Elongation der entsprechenden DNA-Sequenz bei 72 °C mittels Taq-Polymerase. Nach den entsprechenden Wiederholungen dieses PCR-Zyklus erfolgte für 5 Minuten die finale Extension bei 72 °C und der Ansatz wurde auf 4 °C heruntergekühlt. Zur Kontrolle einer gleichmäßig eingesetzten cDNA-Konzentration wurde mit allen Ansätzen eine PCR mit den Primern für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Dieses Gen wird in eukaryoten Zellen konstant exprimiert und dient somit als geeignete Ladungskontrolle.

### 4.2.3.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente wurden die PCR-Produkte in einem 2 %igen Agarosegel in TAE-Puffer aufgetrennt. Hierfür wurde Agarosepulver mit TAE-Puffer vermischt, in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzt und zur späteren Sichtbarmachung der DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid versetzt. Die flüssige Agaroselösung wurde in eine Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nachdem das Agarosegel nach ca. 20–30 Minuten fest auspolymerisiert war, wurden die Proben einschließlich eines 100 bp DNA-Längenstandards in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in der Gelelektrophoresekammer (Sub-Cell System Elektrophoresekammer) bei einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 30 Minuten. Zur Dokumentation des Ergebnisses wurden die Gele unter UV-Licht mit der Olympus CAMEDIA C-4040 200M Digitalkamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter fotografiert.

## 4.2.4 Biochemische Methoden

### 4.2.4.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Zur Bestimmung der Konzentration von sezerniertem hBD-3 in den Zellkulturüberständen nach Zellstimulation wurde das Humane  $\beta$ -Defensin-3 ELISA Kit (Phoenix Pharmaceuticals) verwendet. Die Kulturüberstände wurden zuerst mit einer Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit mit Ultracel-3 membrane (Millipore) nach Herstellerangaben 10-fach aufkonzentriert. Im ELISA erfolgte die Quantifizierung von hBD-3 der aufkonzentrierten Proben im Vergleich mit unkonzentrierten Proben und einem 1:10 verdünnten hBD-3-Standard. Die Messung ergab quantitativ vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für die Versuche dieser Arbeit der hBD-3-ELISA-Standard 1:10 vorverdünnt und die Proben unkonzentriert eingesetzt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach dem Herstellerprotokoll und wird hier nicht weiter beschrieben. Die ELISA-Platten wurden bei 450 nm im MR5000 Microplate Reader ausgelesen. Die Messwerte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM 5.0 ausgewertet.

#### **4.2.4.2 Western Blot**

##### **4.2.4.2.1 Isolierung von Gesamtprotein**

Die Gesamtproteinextraktion erfolgte auf Eis. Nach der Zellstimulation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Nach sorgfältigem Absaugen des Waschpuffers wurden die Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte mit 50 µl Lysepuffer versetzt und mit einem Plastikschaber vom Plattenboden abgekratzt. Anschließend wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 U/min zentrifugiert. Die das Gesamtprotein enthaltenden Lysatüberstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysatproben bei -20 °C gelagert.

##### **4.2.4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Konzentration des in den Lysatproben vorhandenen Gesamtproteins wurde mit dem Bio-Rad Protein-Assay nach Bradford bestimmt. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verlagert, wenn er basische und aromatische Aminosäuren bindet. Zunächst wurde das Bradford-Reagenz durch eine 1:5-Verdünnung der Bio-Rad Assay-Lösung bestehend aus *Coomassie Brilliant Blue* mit Aqua bidest. hergestellt. Anschließend wurden jeweils 5 µl Lysatprobe mit 995 µl Bradford-Reagenz in einer Kunststoffküvette vermischt und für 5 Minuten inkubiert. Die optische Dichte des Ansatzes wurde photometrisch bei 595 nm im Abgleich zum reinen Bradford-Reagenz ohne Lysatproteinprobe gemessen. Anhand der erhaltenen Messwerte und einer für das Photometer festgelegten Albumin-Eichkurve wurden die genauen Proteinkonzentrationen berechnet.

##### **4.2.4.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Die Lysatproteinproben wurden im Verhältnis von 1:4 mit Lämmli-Gelladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C unter Schütteln im Wärmeblock denaturiert. Zur Vorbereitung für die Proteinauftrennung wurde zwischen zwei Glasplatten in einer Gelgießvorrichtung je nach Größe des zu untersuchenden Proteins ein 7 %iges- oder 10 %iges-Trenngel gegossen und zum luftdichten Abschluss mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol gründlich mit Aqua bidest. heruntergewaschen und darüber das Sammelgel gegossen, in welches Kämme zur späteren Probenbeladung eingeführt wurden. Nach Polymerisierung des Sammelgels wurden die Glasplatten mit den Gelen in eine Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System) eingespannt und diese mit ausreichend Laufpuffer gefüllt. In je eine Geltasche wurde 80 µg Proteinprobe aufgetragen. Zur späteren Größenordnung der Proteine nach Auftrennung wurde parallel der Proteinmarker Kaleidoscope™ Protein Standard in eine Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese im

Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Nach dem Übertritt der Proben in das Trenngel erfolgte die Proteinauftrennung bzw. weitere Elektrophorese für ca. 90 Minuten bei einer konstanten Spannung von 130 V.

### 4.2.4.2.4 Protein-Immunoblot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit den nach Größe aufgetrennten Proteinen auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran gelegt. Um dieses Trenngel-Membran-System wurde ein Sandwich gebildet, wobei je Seite 2 puffergetränkte Lagen Whatman-Filterpapier, 1 Blotschwamm und die Blotvorrichtung gemäß Herstellerangaben verwendet wurden. Zum Proteintransfer wurde das Sandwich mit einem Kühllakkumulator in eine Blotkammer (Mini Trans-Blot Cell) eingesetzt, mit eiskaltem Blotpuffer gefüllt und auf einem Magnetrührer für 1 Stunde bei 4 °C und einer Spannung von 100 V geblottet. Nach dem Blotprozess wurden zur orientierenden Beurteilung des Transfererfolges die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S reversibel angefärbt. Das Ponceau-S wurde daraufhin wieder vollständig mit Aqua bidest. von der Membran ausgewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit Blockpuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit Waschpuffer für jeweils 5 Minuten. Daraufhin wurde die Membran mit einem gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper in Blockpuffer für 1 Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit Waschpuffer und ein abschließender Waschschriff mit PBS für jeweils 5 Minuten. Die auf der Membran am primären Antikörper gebundenen mit IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit einem lasergestützten Scansystem (Odyssey Infrared Imaging System) bei 800 nm (für IRDye800) oder 700 nm (für Cy5.5) Kanal detektiert. Die Auswertung der Scans erfolgte mit der Software Odyssey Version 2.0.

### 4.2.4.3 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mit der Methode der Chromatin-Immunpräzipitation wird untersucht, ob bestimmte Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Promotorregionen binden. Hierzu wurde nach entsprechender Stimulationszeit der Zellüberstand von in T<sub>75</sub>-Kulturflaschen stimulierten Zellen abgesaugt und die Zellen mit 10 ml warmer Fixierlösung für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise wird der Transkriptionsvorgang gestoppt und die zu diesem Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen fixiert. Die nachfolgenden Arbeiten erfolgten zum Schutz der Proteine auf Eis und mit 4 °C kalten Substanzen. Nach Inkubation wurde die Fixierlösung wieder abgesaugt und die Zellen mit 10 ml kalter Neutralisationslösung gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml kaltem PBS mit einem Plastikschaber mechanisch vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in ein 15 ml

Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 4 °C und 1200 U/min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet erneut in 10 ml kaltem PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 4 °C und 1200 U/min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml RIPA-Puffer unter frischer Zugabe von 20 µl Aprotinin zur Zellyse resuspendiert. Vorbereitend für die Immunpräzipitation wurde die DNA des Zellysates fragmentiert. Hierzu wurde das Zellysat auf Eis 4-mal jeweils für 1 Minute mit der Sonde Bandelin Sonoplus bei 50 % Power sonifiziert, wobei nach jedem Sonifizierungsschritt 1 Minute pausiert wurde. Zur Entfernung verbleibender Zelltrümmer wurde das sonifizierte Zellysat für 20 Minuten bei 4 °C und 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Immunpräzipitation zu 250 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße bzw. für die Input-Kontrolle zu 50 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und nicht benötigte Aliquots einschließlich derer für die Input-Kontrolle bei -80 °C weggefroren. Für die Immunpräzipitation wurde der gegen das zu untersuchende Protein gerichtete Antikörper in entsprechender Konzentration zu 250 µl Lysat hinzugegeben und im Drehinkubator über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde dem Lysat zur Bindung des Antikörper-Proteinkomplexes je 20 µl Protein A und G Agarose suspendiert in 60 µl RIPA-Puffer hinzugegeben und im Drehinkubator für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Agarose mit den an sie gebundenen Immunkomplexen (Antikörper-Protein-DNA-Komplexe) durch Zentrifugation für 1 Minute bei 4 °C und 13000 U/min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Daraufhin folgten in der Reihenfolge zwei Waschschriffe mit je 1 ml kaltem RIPA-Puffer, ein Waschschrift mit 1 ml kaltem High-Salt-Puffer, ein Waschschrift mit 1 ml kaltem RIPA-Puffer und ein Waschschrift mit 1 ml raumtemperiertem TE-Puffer. Nach jedem Waschschrift außer nach dem letzten wurden die Agarose-Immunkomplexe für 1 Minute bei 4 °C und 13000 U/min herunterzentrifugiert und nachfolgend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach dem letzten Waschschrift mit TE-Puffer erfolgte die Zentrifugation für 1 Minute bei Raumtemperatur und 13000 U/min und der Überstand wurde dann abgesaugt. Durch den Wechsel der Salzkonzentrationen in den Waschpuffern wurde ein Großteil der Verunreinigungen und unspezifischen Bindungen entfernt. Durch Zugabe von 55 µl Eluierungspuffer und Erwärmung im Heizschüttler für 15 Minuten bei 30 °C und 1200 U/min sowie nachfolgender Abzentrifugation für 1 Minute bei Raumtemperatur und 13000 U/min wurden die Immunkomplexe wieder von der Agarose abgelöst. Im Anschluss wurden 50 µl des Überstandes, das die Immunkomplexe enthält, abgenommen und mit 150 µl TE-Puffer versetzt. Die bisher unbehandelten 50 µl Lysate für die Input-Kontrolle wurden ebenfalls mit 150 µl TE-Puffer und zusätzlich 5 µl 10%igem SDS versetzt. Zur Isolierung der DNA wurde das Eluat mit den Immunkomplexen und die Lysate für die Input-Kontrolle mit 1 µl RNase A für 30 Minuten bei 37 °C und nach Zugabe von 5 µl Proteinase K für mindestens weitere 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Ein vollständiger Verdau erfolgte anschließend im Thermal Cycler für 6 Stunden bei 65 °C. Nach dem RNA- und Proteinverdau wurde die DNA mit Hilfe des

PCR Purification Kits (Qiagen) gemäß Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die auf diese Weise isolierte DNA wurde mit entsprechenden Promotor-Primern durch semiquantitative PCR (siehe Kapitel 4.2.3.1.3) amplifiziert und per Gelelektrophorese (siehe Kapitel 4.2.3.1.4) aufgetrennt bzw. nachgewiesen.

### 4.2.4.4 Statistik

Die gezeigten Daten wurden als Mittelwert ( $\pm$  *standard error of the mean* (SEM)) von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des *One way analysis of variance* (ANOVA)- und des *Newman Keuls post-Tests*. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ( $p < 0,05$ ), 1 % ( $p < 0,01$ ) und 0,1 % ( $p < 0,001$ ) als signifikant betrachtet und die Signifikanzen  $p < 0,05$  mit einem Stern (\*),  $p < 0,01$  mit zwei Sternen (\*\*) und  $p < 0,001$  mit drei Sternen (\*\*\*) markiert. Zur Erstellung der Diagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde das Programm GraphPad PRISM 5.0 verwendet. Für die Abbildungen von Western Blot-, semiquantitativer PCR- und ChIP-Analysen wurden jeweils repräsentative Gele aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit gleichem Ergebnis gewählt.



## 5 ERGEBNISSE

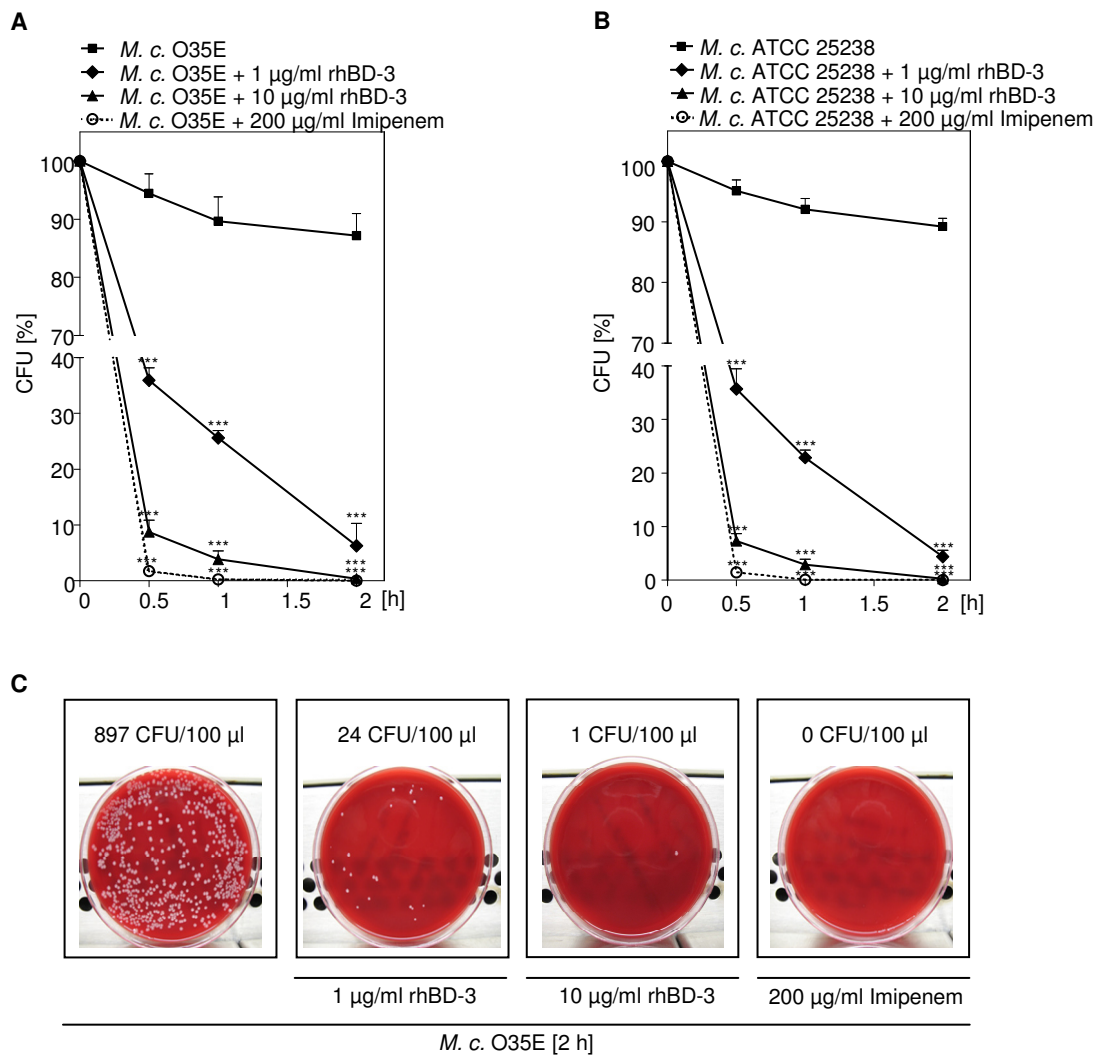
Das humane  $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) gehört zu den AMP des Menschen, welches in der Familie der humanen  $\beta$ -Defensine die stärkste antimikrobielle Wirkung gegen ein breites Erregerspektrum besitzt und verglichen mit anderen humanen AMP auch unabhängig von der Salzkonzentration antimikrobiell aktiv ist [223, 230]. Die Epithelzellen der Atemwege und Lunge sind nach inflammatorischer oder infektiöser Aktivierung in der Lage hBD-3 freizusetzen, was einen ersten möglichen Abwehrmechanismus des Wirtes darzustellen scheint [234]. Bislang ist über die Expression und Funktion von hBD-3 bei der Infektion von respiratorischem Epithel mit *M. catarrhalis* nichts bekannt und wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

### 5.1 Humanes $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) zeigt antimikrobielle Aktivität gegenüber *M. catarrhalis*

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis* wurden die Wildtypstämme *M. catarrhalis* O35E und *M. catarrhalis* ATCC 25238 jeweils mit steigender Konzentration (1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) von rekombinantem hBD-3 inkubiert. Nach 0,5, 1 und 2 Stunden wurden die Moraxellen ausplattiert und ihre gewachsenen Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) nach ca. 12 Stunden beurteilt. Als Positivkontrolle wurde parallel 200  $\mu\text{g/ml}$  Imipenem eingesetzt, das als Reserveantibiotikum eine nachgewiesene potente antimikrobielle Wirkung gegenüber *M. catarrhalis* besitzt [96, 97]. Die Inkubation der Versuchsansätze im AMP-Empfindlichkeitstest erfolgte in PBS, um einerseits in diesem bakteriostatischen Medium ein durch mögliches Wachstum der Bakterien verändertes Ergebnis auszuschließen [316] und andererseits in dieser physiologischen (isotonischen) Pufferlösung mögliche pH-abhängige Aktivitäten von hBD-3 zu vermeiden [238].

Wie die Abbildungen 5.1A–C zeigen, hatte die Zugabe von rekombinantem hBD-3 (rhBD-3) eine deutliche Reduktion der Moraxellen-Bakterienkolonienzahl zur Folge. Bereits die Gabe von 1  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantem hBD-3 (rhBD-3) führte bei beiden Moraxellen-Wildtypstämmen schon nach 0,5 Stunden zur signifikanten Reduktion ( $p < 0,001$ ) der Bakterienkolonienzahl von um mehr als die Hälfte des Ausgangswertes des gleichen Zeitpunktes (Abbildung 5.1A und 5.1B). Auch nach 1 und 2 Stunden Inkubationszeit mit 1  $\mu\text{g/ml}$  rhBD-3 verringerte sich die Bakterienkolonienzahl beider Wildtypstämme in ähnlichem Maße signifikant weiter ( $p < 0,001$ ) verglichen mit den entsprechenden Kontrollwerten. Die Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  rhBD-3 zeigte zu allen Messzeitpunkten eine signifikante Reduktion ( $p < 0,001$ ) der Bakterienkolonienzahl, welche nahezu gleichwertig zu der signifikanten Verminderung ( $p < 0,001$ ) der Bakterienkolonienzahl bei Inkubation mit 200  $\mu\text{g/ml}$  Imipenem verlief. Nach 2 Stunden Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  rhBD-3 sank die Bakterienkolonienzahl jeweils beider Moraxellen-

Wildtypstämme ähnlich der Inkubation mit Imipenem sogar auf Werte um 0 %. Die Abbildung 5.1C zeigt eine nach 2 Stunden Inkubationszeit mit rhBD-3 in steigenden Konzentrationen oder mit Imipenem repräsentative Auswertung der *M. catarrhalis* O35E-Kolonien auf den Agarplatten in absoluten Zahlen, welche visuell oben beschriebene Reduktion der Bakterienkolonienzahl durch rhBD-3 verdeutlicht.



**Abbildung 5.1A–C: Antimikrobielle Aktivität von hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis***

*M. catarrhalis* (*M. c.*) O35E (A und C) und *M. catarrhalis* ATCC 25238 (B) ( $10^4$  CFU/ml) wurden jeweils mit steigenden Konzentrationen (1 und 10 µg/ml) von rekombinatem hBD-3 (rhBD-3) oder mit Imipenem (200 µg/ml) in PBS für 0,5, 1 und 2 Stunden für einen AMP-Empfindlichkeitstest inkubiert, 100 µl des jeweiligen Versuchsansatzes ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) ausgezählt. Die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 5.1A und B repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der CFU in [%] von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu den Kontrollwerten ohne rhBD-3 bzw. Imipenem sind mit drei Sternen gekennzeichnet. In der Abbildung 5.1C ist ein repräsentatives Ergebnis des AMP-Empfindlichkeitstests mit *M. c.* O35E-Wildtypstamm nach 2 Stunden in absoluten Zahlen aus vier unabhängigen Experimenten gezeigt.

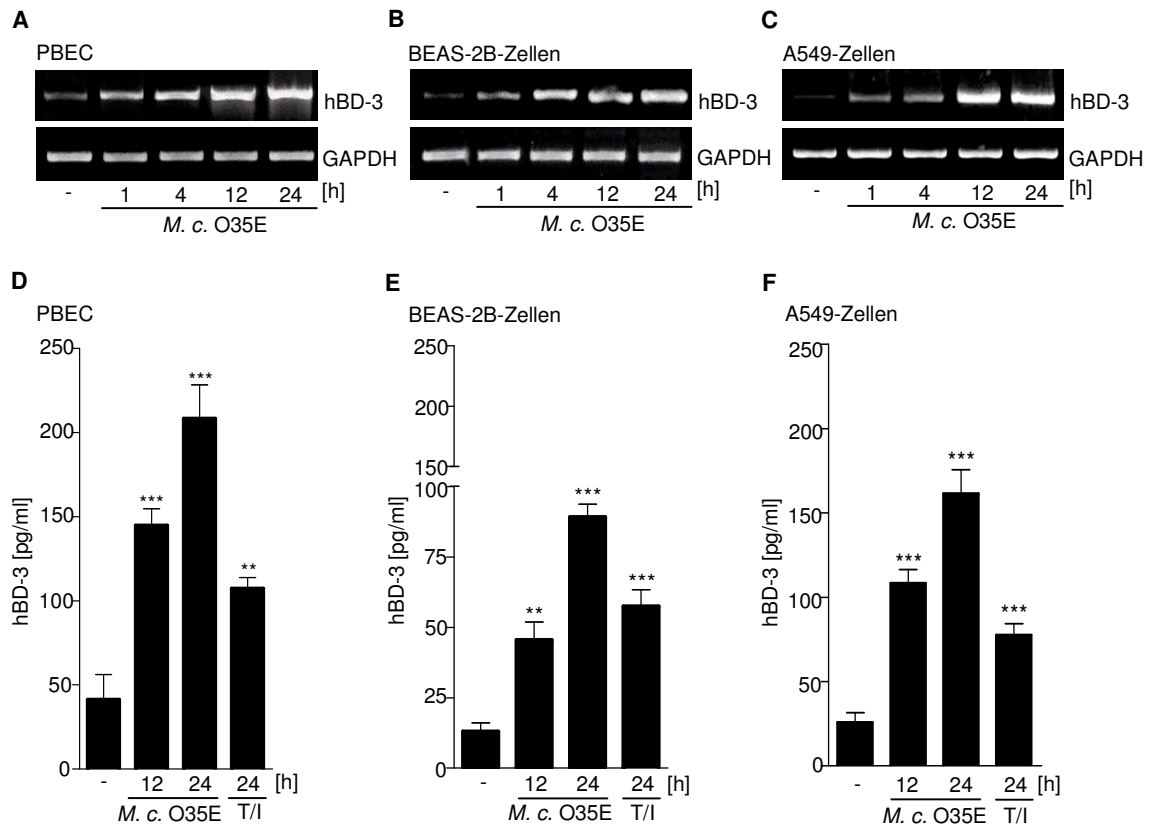
## 5.2 *M. catarrhalis* induziert zeit- und dosisabhängig die hBD-3-Expression in humanen respiratorischen Epithelzellen

Um zu bestimmen, ob *M. catarrhalis* eine zeitabhängige hBD-3-Expression in respiratorischem Epithel induziert, wurden primäre Bronchialepithelzellen (PBEC) sowie die Epithelzelllinien BEAS-2B und A549 für die spätere Untersuchung mittels RT-PCR 1, 4, 12 und 24 Stunden bzw. für die weitere Untersuchung mittels ELISA 12 und 24 Stunden mit dem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E in einer Konzentration von  $10^6$  CFU/ml stimuliert. Als Positivkontrolle für die Sekretion von hBD-3 erfolgte eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) [263] für 24 Stunden zum späteren Nachweis per ELISA. Nach der Zellinfektion mit *M. catarrhalis* wurde die Expression des *hBD-3*-Gens auf mRNA-Ebene mit spezifischen Primern semiquantitativ in der RT-PCR nachgewiesen. Als Kontrolle für den gleichmäßigen Einsatz der mRNA-Gesamtmenge in allen Reaktionen wurde parallel das konstant exprimierte *GAPDH*-Gen auf mRNA-Ebene mit spezifischen Primern detektiert. Auf Proteinebene wurde die Sekretion des hBD-3 in den Zellkulturüberständen mittels spezifischem ELISA quantifiziert.

Die Abbildungen 5.2A–C zeigen eine zeitabhängige Expression der hBD-3-mRNA in PBEC (Abbildung 5.2A), BEAS-2B- (Abbildung 5.2B) und A549-Zellen (Abbildung 5.2C) nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E. Bereits 1 Stunde nach Stimulation aller drei Zelllinien mit  $10^6$  CFU/ml *M. catarrhalis* O35E war im Vergleich zu den unstimulierten Zellen jeweiliger Zelllinien eine Zunahme der hBD-3-Expression auf mRNA-Ebene zu beobachten, die bis zum zuletzt gemessenen Zeitpunkt von 24 Stunden kontinuierlich anstieg.

Die Abbildungen 5.2D–F zeigen die deutliche zeitabhängige Proteinsekretion von hBD-3 in PBEC (Abbildung 5.2D), BEAS-2B- (Abbildung 5.2E) und A549-Zellen (Abbildung 5.2F) nach Infektion mit  $10^6$  CFU/ml *M. catarrhalis* O35E. Eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,001$ ) der hBD-3-Sekretion war in PBEC (Abbildung 5.2D) und A549-Zellen (Abbildung 5.2F) nach 12 Stunden Moraxelleninfektion im Vergleich zu der jeweils geringen Basalsekretion sichtbar und steigerte sich nach 24 Stunden Infektionszeit nochmals deutlich. In BEAS-2B-Zellen war ebenfalls nach 12 Stunden Infektion mit *M. catarrhalis* eine signifikante Induktion ( $p < 0,01$ ) der hBD-3-Produktion verglichen zur niedrigen Basalsekretion erkennbar, die sich nach 24 Stunden Moraxelleninfektion sogar noch weiter in der Signifikanz ( $p < 0,001$ ) erhöhte (Abbildung 5.2E). Die Menge der hBD-3-Sekretion nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  war in allen drei Zelltypen ungefähr vergleichbar mit der hBD-3-Produktionsmenge nach 12-stündiger Moraxelleninfektion der jeweiligen Zelllinien. Die zeitabhängige Zunahme der hBD-3-Sekretion nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E war zwar in allen drei Zelltypen qualitativ vergleichbar, jedoch zeigte sich ein deutlicher quantitativer Unterschied innerhalb der Zelllinien. Hierbei wiesen die PBEC (Abbildung 5.2D) eine ca. 2,5-fach höhere hBD-3-Sekretion nach Infektion verglichen mit BEAS-2B-Zellen (Abbildung 5.2E) und eine ca. 1,3-fach höhere hBD-3-

Produktion im Vergleich zu A549-Zellen (Abbildung 5.2F) auf. Auch die Basalsekretion von hBD-3 fiel bei PBEC höher aus als in den BEAS-2B- und A549-Zellen. Die BEAS-2B-Zellen (Abbildung 5.2E) zeigten die quantitativ niedrigste zeitabhängige hBD-3-Produktion nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E.



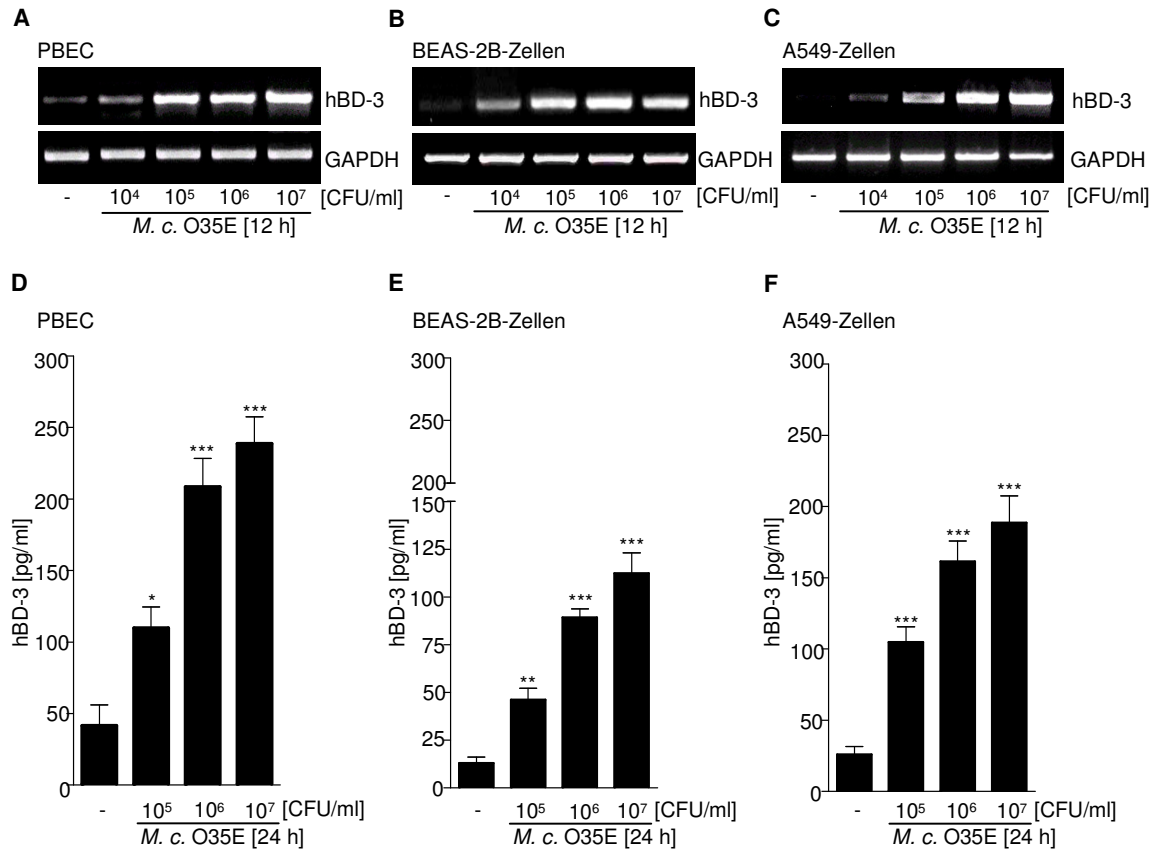
**Abbildung 5.2A–F:** *M. catarrhalis* induziert zeitabhängig die hBD-3-Expression in respiratorischen Epithelzellen

Primäre Bronchialepithelzellen (PBEC) (A und D), BEAS-2B-Zellen (B und E) sowie A549-Zellen (C und F) wurden mit *M. catarrhalis* (*M. c.*)-Wildtyp O35E ( $10^6$  CFU/ml) zeitabhängig infiziert. Als Positivkontrolle wurde für 24 Stunden mit TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) (T/I) (D–F) inkubiert. Nach 1, 4, 12 und 24 Stunden wurde einerseits die hBD-3-Expression auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR mit spezifischen Primern analysiert (A–C). Als Nachweis gleich eingesetzter mRNA-Gesamtmenge diente die parallele Analyse der konstant exprimierten GAPDH-mRNA mittels RT-PCR. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse (A–C) sind repräsentativ für jeweils insgesamt drei unabhängige Experimente mit gleichem Ergebnis. Andererseits wurde nach 12 und 24 Stunden die hBD-3-Produktion auf Proteinebene in den Zellüberständen mittels spezifischem ELISA quantifiziert (D–F). Die Auswertung der gezeigten ELISA-Ergebnisse (D–F) stellt Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikat angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum unstimulierten Leerwert sind mit zwei Sternen ( $p < 0,01$ ) bzw. mit drei Sternen ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

Des Weiteren sollte die konzentrationsabhängige Wirkung auf die Induktion der hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel untersucht werden. Dazu wurden PBEC, BEAS-2B- und A549-Zellen zur späteren RT-PCR-Analyse mit *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E in den steigenden Konzentrationen  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  CFU/ml für 12 Stunden bzw. zur Analyse mittels ELISA in den Konzentration  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  CFU/ml für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ per RT-PCR untersucht. Zur Überprüfung der gleichmäßig eingesetzten Gesamtmenge an mRNA in den verschiedenen RT-PCR-Ansätzen wurde parallel eine PCR zum Nachweis des konstant exprimierten Gens GAPDH durchgeführt. Die hBD-3-Proteinsekretion wurde in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines spezifischen ELISA analysiert.

Die Abbildungen 5.3A–C zeigen eine konzentrationsabhängige Induktion der hBD-3-mRNA-Expression in PBEC (Abbildung 5.3A), BEAS-2B- (Abbildung 5.3B) und A549-Zellen (Abbildung 5.3C) nach 12-stündiger Infektion mit *M. catarrhalis* O35E. In allen drei Zelllinien reichte eine Konzentration von  $10^4$  CFU/ml *M. catarrhalis* O35E aus, um die Expression von hBD-3-mRNA zu induzieren, welche mit steigender Infektionskonzentration ( $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  CFU/ml) auch weiter stetig zunahm.

Die Abbildungen 5.3D–F dokumentieren die konzentrationsabhängige Produktion des hBD-3-Proteins in PBEC (Abbildung 5.3D), BEAS-2B- (Abbildung 5.3E) und A549-Zellen (Abbildung 5.3F) nach 24-stündiger *M. catarrhalis* O35E-Infektion. Die Infektion mit  $10^5$  CFU/ml *M. catarrhalis* O35E führte in PBEC (Abbildung 5.3D), BEAS-2B- (Abbildung 5.3E) und A549-Zellen (Abbildung 5.3F) jeweils zu einer signifikanten Induktion der hBD-3-Sekretion verglichen zur niedrigen Basalsekretion der jeweiligen Zelllinien, welche sich jedoch in der Ausprägung ihrer Signifikanz ( $p < 0,5$ ,  $p < 0,01$  oder  $p < 0,001$ ) unter den drei Zelllinien unterschied. Diese durch  $10^5$  CFU/ml *M. catarrhalis* O35E-induzierte hBD-3-Sekretion erhöhte sich in allen drei Zelllinien bei Infektionsdosen mit  $10^6$  und  $10^7$  CFU/ml *M. catarrhalis* O35E nochmals jeweils signifikant ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 5.3D–F). Die dosisabhängige Erhöhung der hBD-3-Sekretion nach 24-stündiger *M. catarrhalis* O35E-Infektion erwies sich insgesamt in allen drei Zelltypen als qualitativ vergleichbar. Allerdings zeigten die PBEC (Abbildung 5.3D) abermals eine quantitativ ca. 2,5-fach höhere hBD-3-Produktion als BEAS-2B-Zellen (Abbildung 5.3E) sowie eine ca. 1,3-fach höhere hBD-3-Sekretion als A549-Zellen (Abbildung 5.3F) nach Moraxelleninfektion. Die BEAS-2B-Zellen (Abbildung 5.3E) zeigten auch in der konzentrationsabhängigen Untersuchung der hBD-3-Sekretion nach 24-stündiger *M. catarrhalis* O35E-Infektion die quantitativ niedrigste hBD-3-Produktion verglichen mit den anderen beiden Zelltypen.



**Abbildung 5.3A–F:** *M. catarrhalis* induziert dosisabhängig die hBD-3-Expression in respiratorischen Epithelzellen

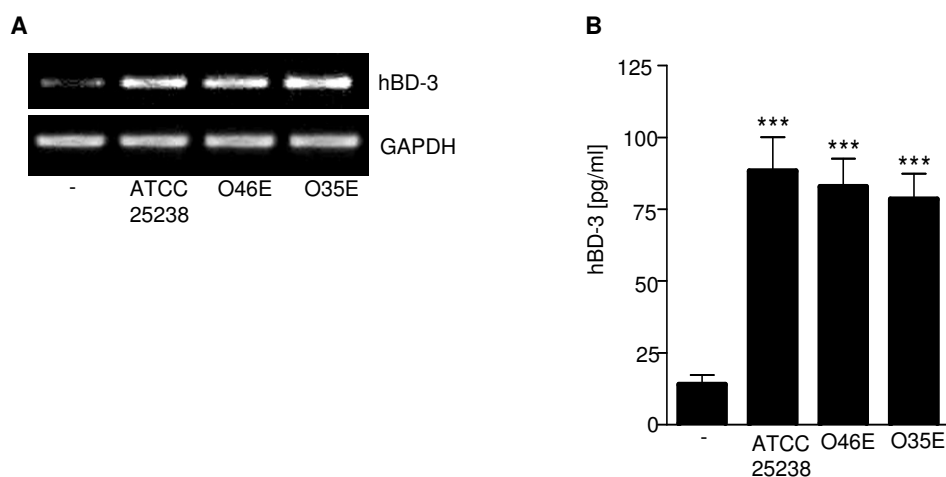
Primäre Bronchialepithelzellen (PBEC) (A und D), BEAS-2B-Zellen (B und E) sowie A549-Zellen (C und F) wurden mit *M. catarrhalis* (*M. c.*)-Wildtyp O35E dosisabhängig infiziert. Für die *M. c.* O35E-Infektionsdosen 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> und 10<sup>7</sup> CFU/ml wurde die hBD-3-mRNA-Expression nach 12 Stunden semiquantitativ durch RT-PCR mit spezifischen Primern untersucht (A–C). Als Kontrolle für den gleichmäßigen mRNA-Einsatz wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse (A–C) sind eine repräsentative Auswahl von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen mit gleichem Ergebnis. Für die *M. c.* O35E-Infektionsdosen 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> und 10<sup>7</sup> CFU/ml wurde die hBD-3-Proteinsekretion in den Zellkulturüberständen nach 24 Stunden mittels spezifischem ELISA analysiert (D–F). Die gezeigten ELISA-Ergebnisse (D–F) stellen den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten dar, deren einzelne Werte je als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle sind mit einem Stern ( $p < 0,05$ ), zwei Sternen ( $p < 0,01$ ) bzw. drei Sternen ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

### 5.3 Verschiedene *M. catarrhalis*-Wildtypstämme induzieren die hBD-3-Expression in humanen Bronchialepithelzellen

Um mögliche Stammes-spezifische Unterschiede bezüglich der hBD-3-Expression zu analysieren, wurden BEAS-2B-Zellen mit den drei verschiedenen *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen ATCC 25238, O46E und O35E jeweils in den Konzentrationen  $10^6$  CFU/ml stimuliert. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die hBD-3-Expression auf mRNA-Ebene mit spezifischen Primern semiquantitativ durch RT-PCR bestimmt. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Einsatzes der mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mittels spezifischer Primer in der RT-PCR nachgewiesen. Nach 24 Stunden Infektionszeit wurde die hBD-3-Expression auf Proteinebene mit Hilfe eines spezifischen ELISA in den Zellkulturüberständen quantifiziert.

Wie aus der Abbildung 5.4A hervorgeht, führte die Infektion mit allen drei *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen ATCC 25238, O46E und O35E zu einer deutlichen Expression der hBD-3-mRNA in den BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

Die Abbildung 5.4B zeigt, dass die Stimulationen mit den drei *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen ATCC 25238, O46E und O35E jeweils eine signifikante Induktion ( $p < 0,001$ ) der hBD-3-Proteinsekretion in den BEAS-2B-Zellen verglichen zu der Basalsekretion verursachten. Diese jeweils induzierte hBD-3-Produktion unterschied sich unter den drei *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen quantitativ nicht signifikant, sondern war für alle drei *M. catarrhalis*-Wildtypstämme vergleichbar hoch in ihrer Konzentration.



**Abbildung 5.4A und 5.4B: Vergleich der hBD-3-Expression nach Stimulation mit den *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen ATCC 25238, O46E und O35E in humanen Bronchialepithelzellen**

BEAS-2B-Zellen wurden mit den *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen ATCC 25238, O46E und O35E (je  $10^6$  CFU/ml) infiziert. Nach 12 Stunden Infektionszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ per RT-PCR untersucht (A). Als Kontrolle zum einheitlichen Einsatz der mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern durch RT-

PCR bestimmt. Das abgebildete Agarosegel zur Auswertung der RT-PCR (A) repräsentiert ein Resultat aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Infektionszeit wurde in den Zellkulturüberständen die sezernierte hBD-3-Konzentration quantitativ im ELISA gemessen (B). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (B) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Versuchen, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum unstimulierten Leerwert sind mit drei Sternen gekennzeichnet.

#### 5.4 Die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression in humanem respiratorischem Epithel ist von *M. catarrhalis*-spezifischem LOS abhängig

Als Nächstes wurde geprüft, ob die hBD-3-mRNA-Expression und hBD-3-Proteinsekretion nach Infektion von humanen Bronchialepithelzellen mit *M. catarrhalis* von bestimmten Virulenzfaktoren des Erregers abhängig war. Hierzu wurden BEAS-2B-Zellen mit dem *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E sowie mit der *M. catarrhalis* O35E-UspA1-defizienten-Mutante O35E.1, der *M. catarrhalis* O35E-UspA2-defizienten-Mutante O35E.2, der *M. catarrhalis* O35E-LOS-defizienten-Mutante O35E.lpxA und mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E jeweils in der Konzentration von  $10^6$  CFU/ml infiziert. Nach 12 Stunden Infektionszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ mittels RT-PCR untersucht. Zur Überprüfung eines einheitlichen Einsatzes der mRNA-Gesamtmenge wurde zeitgleich die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern in der RT-PCR bestimmt. Auf Proteinebene wurde die hBD-3-Produktion in den Zellkulturüberständen nach 24 Stunden Infektionszeit quantitativ mittels spezifischem ELISA gemessen.

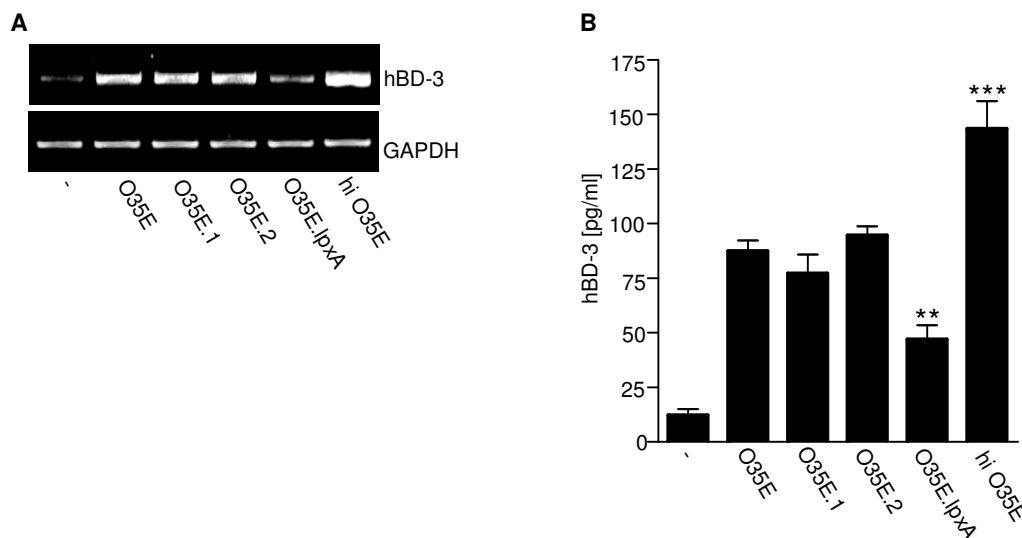
Die Abbildung 5.5A zeigt, dass die hBD-3-mRNA-Expression nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E-UspA1-defizienter-Mutante O35E.1 und mit *M. catarrhalis* O35E-UspA2-defizienter-Mutante O35E.2 vergleichbar zur hBD-3-mRNA-Expression nach Stimulation mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E ausfiel. Dagegen war die Expression der hBD-3-mRNA nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E-LOS-defizienter-Mutante O35E.lpxA im Vergleich zu der nach Infektion mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E semiquantitativ deutlich schwächer. Die hBD-3-mRNA-Expression nach Stimulation mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E war hingegen in der RT-PCR-Auswertung semiquantitativ stärker als die hBD-3-mRNA-Expression nach Stimulation mit aktivem lebendem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E.

Die Abbildung 5.5B bestätigt auf Proteinebene quantitativ die auf mRNA-Ebene semiquantitativ gewonnenen Ergebnisse. Die hBD-3-Produktion nach Stimulation mit *M. catarrhalis* O35E-UspA1-defizienter-Mutante O35E.1 und mit *M. catarrhalis* O35E-UspA2-defizienter-Mutante O35E.2 unterschied sich jeweils quantitativ nicht signifikant von der hBD-3-Sekretion nach Infektion mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E, sondern wurde gleichermaßen induziert. Die Sekretion von hBD-3 nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E-



LOS-defizienter-Mutante O35E.lpxA war allerdings signifikant niedriger ( $p < 0,01$ ) als die hBD-3-Produktion nach Stimulation mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E. Dagegen fiel die hBD-3-Produktion nach Infektion mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E signifikant höher ( $p < 0,001$ ) aus verglichen zur hBD-3-Sekretion nach Stimulation mit unbehandeltem aktivem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E.

Insgesamt demonstrierten die für die *M. catarrhalis* O35E-UspA1-defiziente-Mutante O35E.1 und für die *M. catarrhalis* O35E-UspA2-defiziente-Mutante O35E.2 gewonnenen Ergebnisse indirekt, dass die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression unabhängig von den *M. catarrhalis*-Oberflächenproteinen UspA1 und UspA2 ist. Wohingegen die für die *M. catarrhalis* O35E-LOS-defiziente-Mutante O35E.lpxA und für den hitzeinaktivierten *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E beschriebenen Beobachtungen indirekt den Hinweis dafür lieferten, dass die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression von hitzestabilem *M. catarrhalis*-spezifischem LOS abhängig ist.



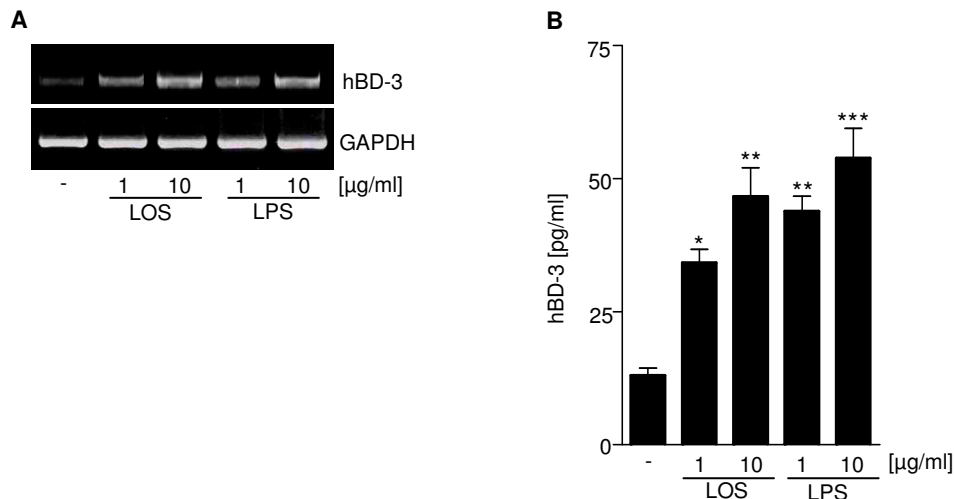
**Abbildung 5.5A und 5.5B: Vergleich der hBD-3-Expression nach Infektion mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E, seiner UspA1-, UspA2- sowie LOS-defizienten-Mutante und mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E in humanen Bronchialepithelzellen**

BEAS-2B-Zellen wurden mit dem *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E sowie mit der *M. catarrhalis* O35E-UspA1-defizienten-Mutante O35E.1, der *M. catarrhalis* O35E-UspA2-defizienten-Mutante O35E.2, der *M. catarrhalis* O35E-LOS-defizienten-Mutante O35E.lpxA und mit hitzeinaktiviertem (hi) *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E (je  $10^6$  CFU/ml) infiziert. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die Expression der hBD-3-mRNA mit spezifischen Primern semiquantitativ via RT-PCR bestimmt (A). Zur Kontrolle des gleichmäßigen Einsatzes der mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern durch RT-PCR nachgewiesen. Das dargestellte RT-PCR-Ergebnis (A) ist eine repräsentative Auswahl von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde in den zellfreien Überständen das sezernierte hBD-3-Protein mittels spezifischem ELISA quantifiziert (B). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (B) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Infektion mit *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E sind mit zwei Sternen ( $p < 0,01$ ) bzw. drei Sternen ( $p < 0,001$ ) markiert.

Um auch direkt eine mögliche zentrale Rolle von *M. catarrhalis*-spezifischem LOS für die hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel genauer zu untersuchen, wurden BEAS-2B-Zellen mit aufgereinigtem LOS vom Wildtyp O35E und zur Kontrolle mit dem TLR4-Liganden LPS von *Salmonella minnesota* R595 [265] jeweils in den aufsteigenden Konzentrationen 1 und 10 µg/ml stimuliert. Die LOS- und LPS-Zellstimulationen erfolgten dabei zur Verstärkung der Zellantwort in Anwesenheit von 2 % FCS als Quelle für TLR4-akzessorische Moleküle und Ko-Rezeptoren [176, 177]. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die Expression der hBD-3-mRNA mit spezifischen Primern semiquantitativ durch RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Einsatzes an mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern per RT-PCR nachgewiesen. Die sezernierte hBD-3-Proteinmenge wurde nach 24 Stunden Stimulationszeit im zellfreien Überstand mittels spezifischem ELISA quantitativ gemessen.

Wie aus der Abbildung 5.6A hervorgeht, führte die Inkubation mit *M. catarrhalis* O35E-LOS und *Salmonella minnesota* R595-LPS jeweils in den zwei eingesetzten Konzentrationen (1 und 10 µg/ml) zu einer deutlichen Induktion der hBD-3-mRNA-Expression in den BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

Die Abbildung 5.6B zeigt, dass die hBD-3-Proteinsekretion nach Stimulation mit 1 µg/ml *M. catarrhalis* O35E-LOS verglichen zu der geringen Basalsekretion in den BEAS-2B-Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) induziert wurde und konnte nach Stimulation mit der höheren Konzentration von 10 µg/ml *M. catarrhalis* O35E-LOS nochmals signifikant ( $p < 0,01$ ) gesteigert werden. Eine signifikante Induktion ( $p < 0,01$ ) der hBD-3-Produktion war auch nach Inkubation mit 1 µg/ml *Salmonella minnesota* R595-LPS im Vergleich zur niedrigen Basalsekretion sichtbar und wurde ebenfalls nach Stimulation mit der höheren Konzentration von 10 µg/ml *Salmonella minnesota* R595-LPS noch weiter signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht. Quantitativ war die Menge der hBD-3-Sekretion nach LOS-Stimulation mit der nach LPS-Stimulation für die jeweiligen Stimulationskonzentrationen vergleichbar.



#### Abbildung 5.6A und 5.6B: *M. catarrhalis* induziert die hBD-3-Expression LOS abhängig

BEAS-2B-Zellen wurden mit *M. catarrhalis*-spezifischem-LOS und zur Kontrolle mit *Salmonella minnesota* R595-LPS (je 1 µg/ml und 10 µg/ml) in Anwesenheit von 2 % FCS stimuliert. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt (A). Zur Kontrolle der gleichmäßig eingesetzten mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern per RT-PCR nachgewiesen. Das abgebildete Agarosegel zur Auswertung der RT-PCR (A) repräsentiert ein Resultat aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde in den Zellkulturüberständen die hBD-3-Proteinkonzentration mittels spezifischem ELISA quantifiziert (B). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (B) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum unstimulierten Basalwert sind mit einem Stern ( $p < 0,05$ ), zwei Sternen ( $p < 0,01$ ) bzw. drei Sternen ( $p < 0,001$ ) markiert.

### 5.5 *M. catarrhalis*-induzierte bzw. *M. catarrhalis*-LOS-induzierte hBD-3-Expression ist nicht vom TLR4 abhängig

Nachdem eine LOS-abhängige hBD-3-Expression bei der Infektion mit *M. catarrhalis* im respiratorischen Epithel nachgewiesen werden konnte, sollte ermittelt werden, über welche TLR das *M. catarrhalis*-spezifische LOS erkannt und die Aktivierung der respiratorischen Epithelzellen vermittelt wird. Bislang konnte einer Studie zufolge der TLR4 als Rezeptor für das *M. catarrhalis*-spezifische LOS in der Aktivierung von humanen Monozyten zur Expression von membranständigen Adhäsionsmolekülen und Zytokinen identifiziert werden [317]. Daher wurde zunächst untersucht, ob der TLR4 auch als Rezeptor für das *M. catarrhalis*-LOS in der Aktivierung von humanen respiratorischen Epithelzellen zur Produktion von hBD-3 eine Rolle spielt. Hierfür wurden A549-Zellen mit einer TLR4-spezifischen siRNA oder als Negativkontrolle mit einer Kontroll-siRNA (c-siRNA) transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten und nicht transfizierten Zellen mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E und hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E jeweils in der Konzentration von  $10^6$  CFU/ml infiziert sowie mit

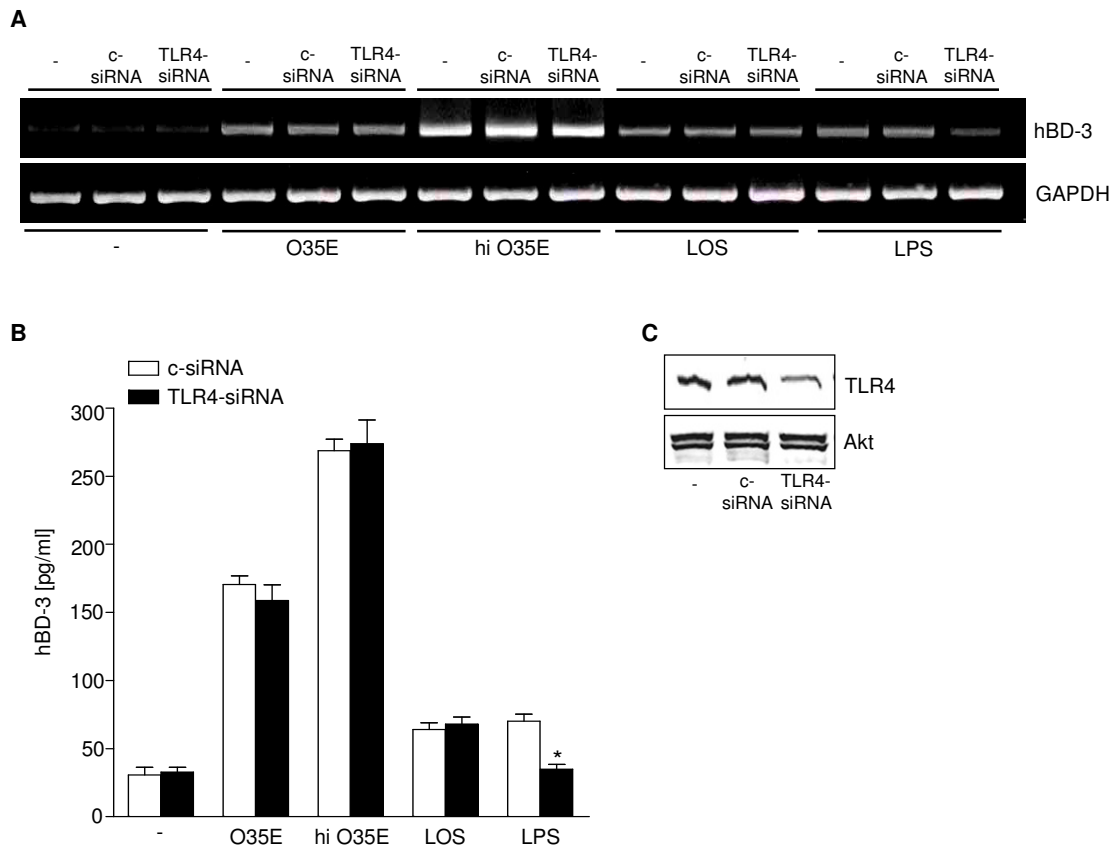
*M. catarrhalis* O35E-spezifischem LOS und als Positivkontrolle mit dem TLR4-Agonisten LPS von *Salmonella minnesota* R595 jeweils in der Konzentration von 1 µg/ml stimuliert. Die LOS- und LPS-Stimulationen erfolgten zur Verstärkung der Zellantwort in Anwesenheit von 2 % FCS als Quelle für TLR4-akzessorische Moleküle und Ko-Rezeptoren [176, 177]. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt. Zur Überprüfung des einheitlichen Einsatzes an mRNA-Gesamtmenge wurde zeitgleich die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern durch RT-PCR analysiert. Die Sekretion von hBD-3-Protein wurde nach 24 Stunden Stimulationszeit im zellfreien Überstand mit Hilfe eines spezifischen ELISA quantifiziert. Zusätzlich wurde 72 Stunden nach der Transfektion zur Kontrolle des Knockdowns die Expression von TLR4 nach Gesamtproteinextraktion mit spezifischem Antikörper im Western Blot untersucht. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung wurde parallel mit spezifischem Antikörper im Western Blot das konstant exprimierte Akt-Protein detektiert.

Der Abbildung 5.7A ist zu entnehmen, dass nur die durch LPS induzierte hBD-3-mRNA-Expression in den TLR4-siRNA-transfizierten Zellen reduziert war im Vergleich zu der in Kontroll-siRNA-transfizierten bzw. untransfizierten Zellen. Weder die durch *M. catarrhalis* O35E, durch hitzeinaktivierten *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E oder durch LOS induzierte hBD-3-mRNA-Expression wurde durch Einsatz der spezifischen siRNA gegen TLR4 beeinflusst.

Die Abbildung 5.7B zeigt, dass die LPS-induzierte hBD-3-Proteinsekretion in den TLR4-siRNA-transfizierten Zellen verglichen mit der in den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) war. Dagegen führte die Transfektion mit TLR4-siRNA zu keinem Einfluss der *M. catarrhalis* O35E-, der mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E- oder der LOS-induzierten hBD-3-Produktion verglichen zur Transfektion mit Kontroll-siRNA.

Aus der Abbildung 5.7C geht hervor, dass die Transfektion mit spezifischer siRNA gegen TLR4 in A549-Zellen nach 72 Stunden zu einer deutlichen Herunterregulation des konstitutiv exprimierten TLR4 auf Proteinebene führte, was insgesamt als Bestätigung der Funktion der eingesetzten TLR4-siRNA galt.

Zusammenfassend zeigten die Versuche, dass zwar die LPS-induzierte hBD-3-Expression vom TLR4 abhängig ist, aber dass *M. catarrhalis* bzw. *M. catarrhalis*-LOS die hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel unabhängig vom TLR4 induzieren.



**Abbildung 5.7A–C: *M. catarrhalis*-induzierte und *M. catarrhalis*-LOS-induzierte hBD-3-Expression wird nicht durch TLR4 vermittelt**

A549-Zellen wurden mit Kontroll (c)-siRNA und spezifischer TLR4-siRNA transfiziert und 72 Stunden später mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E und hitzeinaktiviertem (hi) *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E (je  $10^6$  CFU/ml) infiziert sowie mit *M. catarrhalis* O35E-spezifischem LOS und dem TLR4-Agonisten *Salmonella minnesota* R595-LPS (je 1  $\mu$ g/ml) in Anwesenheit von 2 % FCS stimuliert. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die Expression der hBD-3-mRNA mit spezifischen Primern semiquantitativ via RT-PCR bestimmt (A). Zur Kontrolle des gleichmäßigen Einsatzes der mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern durch RT-PCR nachgewiesen. Das dargestellte RT-PCR-Ergebnis (A) ist eine repräsentative Auswahl von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde in den zellfreien Überständen das sezernierte hBD-3-Protein mittels spezifischem ELISA quantifiziert (B). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (B) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum jeweilig stimulierten Kontroll-siRNA-Wert sind mit einem Stern markiert. 72 Stunden nach Transfektion wurde zur Kontrolle des Knockdowns die Expression von TLR4-Protein mit spezifischem Antikörper im Western Blot dokumentiert (C). Als Nachweis gleichmäßiger Proteinbeladung wurde parallel mit spezifischem Antikörper im Western Blot das konstant exprimierte Protein Akt detektiert. Das gezeigte Western Blot-Ergebnis (C) repräsentiert einen ausgewählten Blot aus drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis.

## 5.6 *M. catarrhalis*-induzierte bzw. *M. catarrhalis*-LOS-induzierte hBD-3-Expression ist vom TLR2 abhängig

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt gemachten Beobachtungen konnte davon ausgegangen werden, dass die *M. catarrhalis*-induzierte bzw. *M. catarrhalis*-LOS-induzierte hBD-3-Expression in respiratorischen Epithelzellen von einem anderen Rezeptor als dem TLR4 vermittelt wird. Da dem TLR2 eine bedeutende Rolle für die *M. catarrhalis*-induzierte Zytokinsekretion zugeschrieben wurde [72] und TLR2 zusätzlich im Zusammenhang mit der Induktion der hBD-3-Expression in der aktuellen Literatur beschrieben wurde [235, 267-269], erfolgten zur Charakterisierung einer möglichen Beteiligung des TLR2 in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel weitere RNA-Interferenz-Experimente.

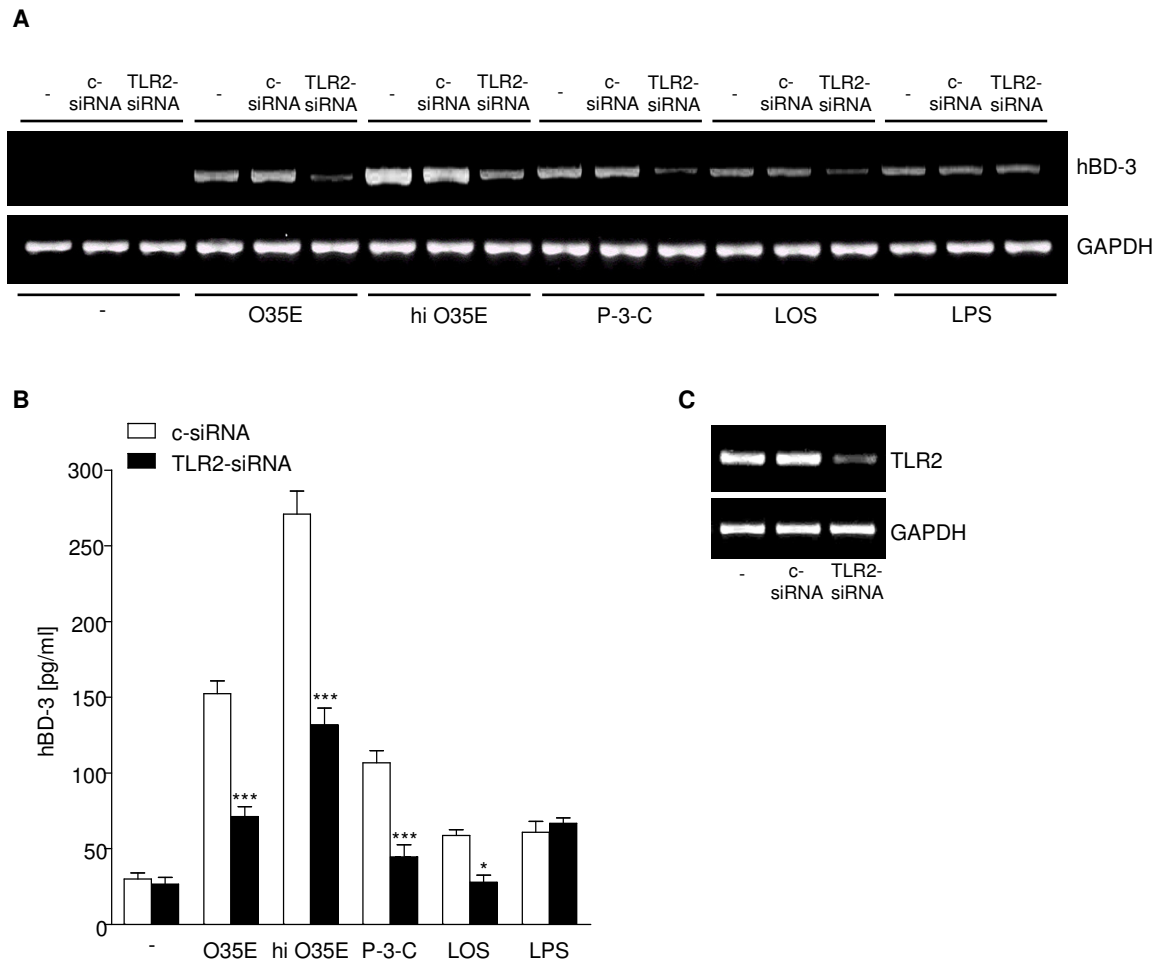
Hierfür wurden A549-Zellen mit einer TLR2-spezifischen siRNA oder als Negativkontrolle mit einer Kontroll-siRNA (c-siRNA) transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten und nicht transfizierten Zellen mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E und hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E jeweils in der Konzentration von  $10^6$  CFU/ml infiziert sowie mit *M. catarrhalis* O35E-spezifischem LOS, mit dem TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (P-3-C) als Positivkontrolle und mit dem TLR4-Agonisten *Salmonella minnesota* R595-LPS als Negativkontrolle jeweils in der Konzentration von 1 µg/ml stimuliert. Die LOS- und LPS-Stimulationen erfolgten zur Verstärkung der Zellantwort in Anwesenheit von 2 % FCS als Quelle für TLR4-akzessorische Moleküle und Ko-Rezeptoren [176, 177]. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die Expression der hBD-3-mRNA mit spezifischen Primern semiquantitativ durch RT-PCR bestimmt. Zur Kontrolle des gleichmäßigen Einsatzes an mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Sekretion von hBD-3-Protein wurde nach 24 Stunden Stimulationszeit im Zellkulturüberstand durch einen spezifischen ELISA quantitativ gemessen. Zusätzlich wurde 72 Stunden nach der Transfektion zur Kontrolle des Knockdowns die Expression von TLR2-mRNA mit spezifischen Primern mittels RT-PCR analysiert. Als Nachweis einer einheitlichen mRNA-Beladung wurde zeitgleich mit spezifischen Primern in der RT-PCR die konstant exprimierte GAPDH-mRNA bestimmt.

Der Abbildung 5.8A ist zu entnehmen, dass sowohl die durch *M. catarrhalis* Wildtyp O35E, durch hitzeinaktivierten *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E, durch *M. catarrhalis* O35E-spezifisches-LOS als auch durch die Positivkontrolle Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> induzierte hBD-3-mRNA-Expression in den TLR2-siRNA-transfizierten Zellen reduziert war im Vergleich zur jeweilig stimulierten hBD-3-Expression in den Kontroll-siRNA-transfizierten bzw. untransfizierten Zellen. Dagegen wurde die durch die Negativkontrolle LPS induzierte hBD-3-mRNA-Expression erwartungsgemäß durch den Einsatz der spezifischen siRNA gegen TLR2 nicht beeinflusst.

Die Abbildung 5.8B zeigt, dass der Einsatz spezifischer siRNA gegen TLR2 zu einer signifikanten Reduktion der durch *M. catarrhalis* Wildtyp O35E ( $p < 0,001$ ), durch hitzeinaktivierten *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E ( $p < 0,001$ ), durch *M. catarrhalis*-spezifisches-LOS ( $p < 0,05$ ) und durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> ( $p < 0,001$ ) induzierten hBD3-Proteinsekretion führte verglichen mit der jeweils stimulierten hBD-3-Produktion in den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Dagegen führte die Transfektion mit TLR2-siRNA erwartungsgemäß zu keinem Einfluss der LPS-induzierten hBD-3-Sekretion verglichen zur Transfektion mit Kontroll-siRNA.

Aus der Abbildung 5.8C geht hervor, dass die Transfektion mit spezifischer siRNA gegen TLR2 in A549-Zellen nach 72 Stunden zu einer deutlichen Herunterregulation des konstitutiv exprimierten TLR2 auf mRNA-Ebene führte, was insgesamt die Funktion der eingesetzten TLR2-siRNA bestätigte.

Zusammenfassend zeigten die Beobachtungen, dass *M. catarrhalis* bzw. *M. catarrhalis*-LOS die hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel vom TLR2 abhängig induziert.



**Abbildung 5.8A–C: *M. catarrhalis*-induzierte und *M. catarrhalis*-LOS-induzierte hBD-3-Expression wird durch TLR2 vermittelt**

A549-Zellen wurden mit Kontroll (c)-siRNA und spezifischer TLR4-siRNA transfiziert und 72 Stunden später mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E und hitzeinaktiviertem (hi) *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E (je  $10^6$  CFU/ml) infiziert sowie mit *M. catarrhalis* O35E-spezifischem LOS, dem TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (P-3-C) und dem TLR4-Agonisten *Salmonella minnesota* R595-LPS (je 1 µg/ml) stimuliert. LOS- und LPS-Stimulationen erfolgten in Anwesenheit von 2% FCS. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ via RT-PCR bestimmt (A). Zur Kontrolle des gleichmäßigen Einsatzes der mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern durch RT-PCR nachgewiesen. Das dargestellte RT-PCR-Ergebnis (A) ist eine repräsentative Auswahl von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde in den zellfreien Überständen das sezernierte hBD-3-Protein mittels spezifischem ELISA quantifiziert (B). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (B) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum jeweilig stimulierten Kontroll-siRNA-Wert sind mit einem Stern ( $p < 0,05$ ), zwei Sternen ( $p < 0,01$ ) bzw. drei Sternen ( $p < 0,001$ ) markiert. 72 Stunden nach Transfektion wurde zur Kontrolle des Knockdowns die Expression der TLR2-mRNA mit spezifischen Primern in der RT-PCR bestimmt (C). Zur Überprüfung einer gleichmäßig eingesetzten mRNA-Gesamtmenge wurde parallel mit spezifischen Primern per RT-PCR die konstant exprimierte GAPDH-mRNA nachgewiesen. Das gezeigte RT-PCR-Ergebnis (C) repräsentiert ausgewählte Agarosegele aus drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis.



## 5.7 JNK und ERK1/2 vermitteln die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Produktion

Der Aktivierung von MAPKs konnte bereits eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zytokinexpression nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit *M. catarrhalis* zugeordnet werden [318]. Außerdem wurde die regulatorische Funktion der MAPKs für die Expression von hBD-3 in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen [233, 235, 258, 266, 267]. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob an der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel die MAPK p38, ERK1/2 und JNK beteiligt sind.

Dafür wurden BEAS-2B-Zellen zeitabhängig (15, 30, 60, 120 Minuten) mit  $10^6$  CFU/ml *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E infiziert oder mit TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als Positivkontrolle für 30 Minuten stimuliert. Anschließend wurde jeweils die Phosphorylierung der p38 MAPK, ERK1/2 und JNK mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Als Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurde parallel jeweilig die konstant exprimierte nicht-phosphorylierte Form der MAPK mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Nachfolgend wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der *M. catarrhalis*-bedingten MAPK-Aktivierung und der hBD-3-Expression vorliegt. Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen vor der Infektion mit dem p38 MAPK-spezifischen Inhibitor SB202190, dem MEK1/2-spezifischen Inhibitor U0126 als potenten Inhibitor von ERK1/2 und dem JNK-spezifischen-Inhibitor SP600125 jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für 1 Stunde vorinkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen mit  $10^6$  CFU/ml *M. catarrhalis* infiziert. Nach 12 Stunden Infektionszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ per RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle eines einheitlichen Einsatzes an mRNA-Gesamtmenge wurde zeitgleich die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern durch RT-PCR bestimmt. Das sezernierte hBD-3-Protein wurde nach 24 Stunden Infektionszeit im zellfreien Überstand mit Hilfe eines spezifischen ELISA quantifiziert.

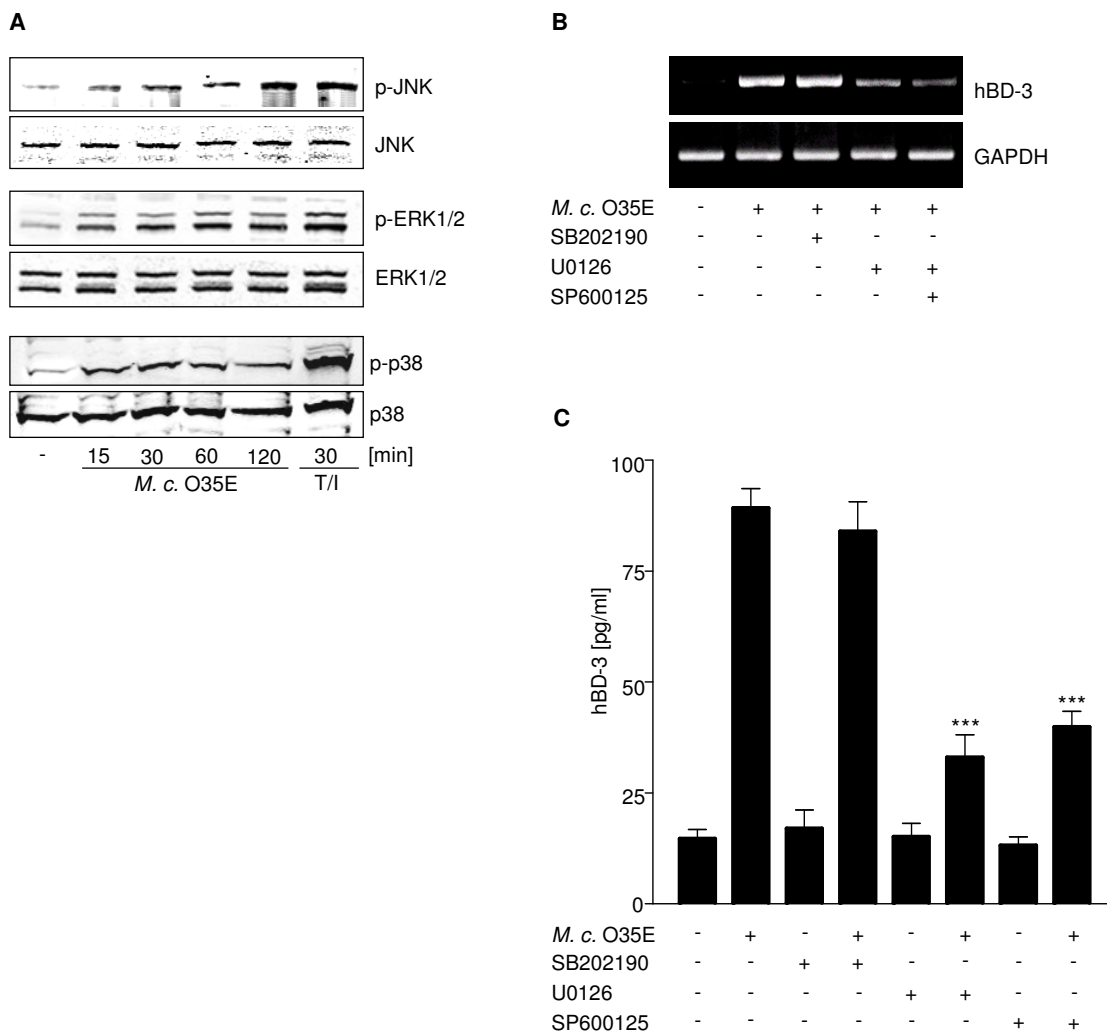
Die Abbildung 5.9A zeigt, dass bereits nach 15-minütiger Infektionszeit mit *M. catarrhalis* die Phosphorylierung der Kinasen JNK, ERK1/2 und p38 MAPK in BEAS-2B-Zellen erfolgte und sich die Expression dieser phosphorylierten MAPKs bis zum Ende der Infektionszeit von 120 Minuten noch weiter steigerte. Die Stimulation mit der Positivkontrolle TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (T/I) führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Phosphorylierung aller drei untersuchten MAPK in den Zellen.

Der Abbildung 5.9B ist zu entnehmen, dass jeweils die Hemmung von ERK1/2 und JNK zu einer deutlichen Reduktion der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-mRNA-Expression in BEAS-2B-Zellen führte. Dagegen zeigte die Inhibition von p38 MAPK keinen Effekt auf die *M. catarrhalis*-induzierte Expression der hBD-3-mRNA.

Aus der Abbildung 5.9C geht hervor, dass durch die jeweilige Hemmung von ERK1/2 und JNK die *M. catarrhalis*-induzierte Sekretion von hBD-3 auf Proteinebene signifikant

reduziert ( $p < 0,001$ ) wurde im Vergleich zur Induktion der hBD-3-Sekretion durch *M. catarrhalis*-Infektion ohne Inhibitoren. Die Hemmung von p38 MAPK hatte keinen signifikanten Einfluss auf die hBD-3-Produktion nach Infektion mit *M. catarrhalis* in BEAS-2B-Zellen verglichen zur *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Sekretion ohne Inhibitoren-Inkubation.

Insgesamt demonstrierten die Versuche, dass die Infektion von Bronchialepithel mit *M. catarrhalis* sowohl die JNK, ERK1/2 und p38 MAPK aktivierte, aber nur die Aktivierung der MAPKs JNK und ERK1/2 eine regulatorische Rolle in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Produktion spielte.



**Abbildung 5.9A–C: JNK und ERK1/2 vermitteln die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression**

BEAS-2B-Zellen wurden für 15, 30, 60 und 120 Minuten mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E ( $10^6$  CFU/ml) infiziert und für 30 Minuten als Positivkontrolle mit TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) (T/I) stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Gesamtproteinextrakt mittels spezifischer Antikörper im Western Blot auf die Phosphorylierung der MAPKs JNK, ERK1/2 und p38 untersucht (A). Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurde jeweilig die konstant exprimierte nicht-phosphorylierte Form der MAPK detektiert. Das gezeigte Western Blot-Ergebnis (A) repräsentiert ausgewählte Blots aus drei separaten Experimenten mit

gleichem Ergebnis. BEAS-2B-Zellen wurden 1 Stunde mit SB202190 (p38 MAPK-Inhibitor), U0126 (MEK1/2-Inhibitor zur Inhibition von ERK1/2-Aktivierung) und SP600125 (JNK-Inhibitor) (je 10  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend mit *M. catarrhalis* ( $10^6$  CFU/ml) infiziert. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt (B). Zur Kontrolle der gleichmäßig eingesetzten mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern per RT-PCR nachgewiesen. Das abgebildete Agarosegel zur Auswertung der RT-PCR (B) repräsentiert ein Resultat aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde in den zellfreien Überständen die hBD-3-Proteinkonzentration mittels spezifischem ELISA quantifiziert (C). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (C) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Proteinsekretion ohne Inhibitoren-Inkubation sind mit drei Sternen ( $p < 0,001$ ) markiert.

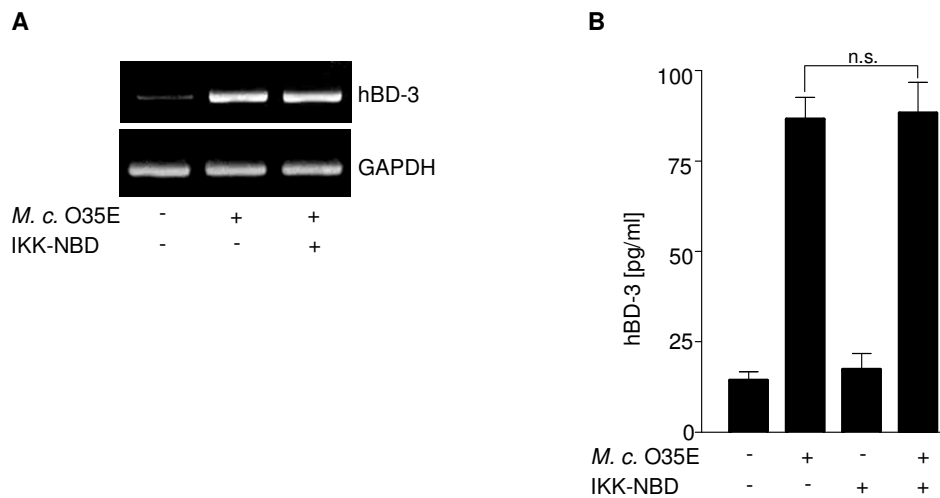
### **5.8 Die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression ist unabhängig von NF- $\kappa$ B, aber abhängig von AP-1**

Die Immunantwort auf Infektionen mit *M. catarrhalis* konnte in Verbindung mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B gebracht werden [72, 318, 319]. Im *hBD-3*-Promotor konnten unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 nachgewiesen werden, die beide die Expression von hBD-3 regulieren [232, 272]. Daher wurde abschließend untersucht, welche Rolle die beiden Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 für die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression einnehmen.

Zunächst wurde die Bedeutung von NF- $\kappa$ B analysiert. Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen vor der Infektion mit dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor IKK-NBD in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für 1 Stunde vorinkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen mit  $10^6$  CFU/ml *M. catarrhalis* infiziert. Nach 12 Stunden Infektionszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ mittels RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle eines einheitlichen Einsatzes an mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern per RT-PCR bestimmt. Das sezernierte hBD-3-Protein wurde nach 24 Stunden Infektionszeit im zellfreien Überstand mit Hilfe eines spezifischen ELISA quantifiziert.

Der Abbildung 5.10A ist zu entnehmen, dass die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B keinen Einfluss auf die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-mRNA-Expression hatte.

Die Abbildung 5.10B bestätigt auf Proteinebene die auf Genebene gemachten Beobachtungen und zeigt, dass sich die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Proteinsekretion bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung quantitativ nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) von der *M. catarrhalis*-stimulierten hBD-3-Produktion ohne Inhibition von NF- $\kappa$ B unterscheidet.

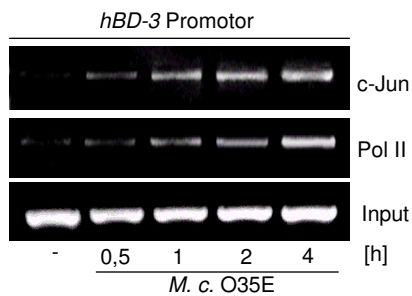


**Abbildung 5.10A und 5.10B: NF- $\kappa$ B hat keinen Einfluss auf die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Produktion**

BEAS-2B-Zellen wurden 1 Stunde mit NF- $\kappa$ B-Inhibitor IKK-NBD (10  $\mu$ M) vorinkubiert und daraufhin mit *M. catarrhalis* (10<sup>6</sup> CFU/ml) infiziert. Nach 12 Stunden Stimulationszeit wurde die hBD-3-mRNA-Expression mit spezifischen Primern semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt (A). Zur Kontrolle der gleichmäßig eingesetzten mRNA-Gesamtmenge wurde parallel die konstant exprimierte GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern per RT-PCR nachgewiesen. Das dargestellte RT-PCR-Ergebnis (A) repräsentiert ein Resultat aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde in den Zellkulturüberständen die hBD-3-Proteinkonzentration mittels spezifischem ELISA quantifiziert (B). Das dargestellte ELISA-Ergebnis (B) zeigt den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten, deren einzelne Werte jeweils als Duplikate angelegt waren. Statistisch nicht signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ) im Vergleich zur *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Proteinsekretion ohne IKK-NBD-Inkubation sind mit n. s. markiert.

Des Weiteren wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors c-Jun aus der AP-1-Familie für die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression untersucht. Mittels ChIP-Analyse wurde die Bindung der AP-1-Untereinheit c-Jun an den *hBD-3*-Promotor analysiert. Dafür wurden BEAS-2B-Zellen für 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 10<sup>6</sup> CFU/ml *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E infiziert, die Zelllysate mit spezifischem Antikörper gegen c-Jun präzipitiert und die gebundenen DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Als Nachweis stattfindender Transkription wurde parallel die Rekrutierung der Polymerase II (Pol II) an den *hBD-3*-Promotor nachgewiesen, indem die DNA-Proteinkomplexe mit spezifischem Antikörper gegen Pol II gebunden wurden und die entsprechenden DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-Primern in der PCR amplifiziert wurden. Zur Kontrolle für die gleichmäßige Beladung an Gesamt-DNA wurde die *hBD-3*-Promotor-DNA-Sequenz vor der Immunpräzipitation im Gesamtzelllysate mit spezifischen *hBD-3*-Promotor-Primern via PCR nachgewiesen (Input).

Die Abbildung 5.11 zeigt, dass nach 0,5 Stunden Infektionszeit mit *M. catarrhalis* eine erste Bindung von c-Jun an den *hBD-3*-Promotor erfolgte. Die Rekrutierung von c-Jun an den *hBD-3*-Promotor steigerte sich nach 1 Stunde Infektionszeit deutlich und hielt über den untersuchten Zeitraum an. Parallel konnte in ähnlichem Ausmaß die Bindung der Polymerase II an den *hBD-3*-Promotor gezeigt werden, wodurch eine stattfindende Gentranskription an dem Promotor bestätigt wurde.



**Abbildung 5.11: AP-1 reguliert die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Produktion**

BEAS-2B-Zellen wurden für 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E ( $10^6$  CFU/ml) infiziert. Mittels ChIP-Analyse wurden die Zelllysate mit spezifischem Antikörper gegen c-Jun präzipitiert und die gebundenen DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Zur Kontrolle einer stattfindenden Transkription wurde mit spezifischem Antikörper gegen Polymerase II (Pol II) präzipitiert und die gebundenen DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-Primern mittels PCR analysiert. Zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung an Gesamt-DNA wurde die *hBD-3*-Promotor-DNA-Sequenz vor Immunpräzipitation im Zelllysate mit *hBD-3*-Promotor-Primern durch PCR bestimmt (Input). Das dargestellte PCR-Ergebnis repräsentiert ein Resultat aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis.

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass AP-1 die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Expression vermittelte, wohingegen NF- $\kappa$ B keinen Einfluss auf die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Produktion hatte.

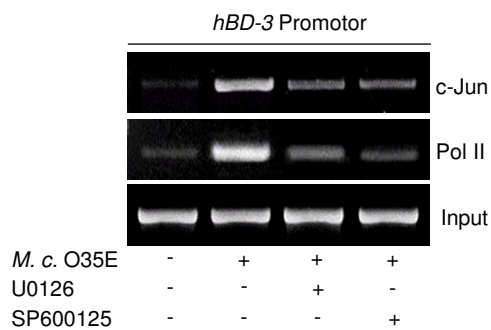
## 5.9 ERK1/2 und JNK regulieren die AP-1-Aktivierung für die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion

Da die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion, wie in Kapitel 5.7 nachgewiesen, von der ERK1/2- und JNK-Aktivierung abhängig war, sollte in einem nächsten Schritt die Bedeutung dieser MAPKs für die Rekrutierung von der AP-1-Untereinheit c-Jun an den *hBD-3*-Promotor analysiert werden. Die Bindung des Transkriptionsfaktors c-Jun an den *hBD-3*-Promotor wurde mittels ChIP untersucht. Dazu wurden BEAS-2B-Zellen mit MEK1/2-spezifischem Inhibitor U0126 als potenten Inhibitor von ERK1/2 und dem JNK-spezifischen-Inhibitor SP600125 jeweils in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  für 1 Stunde vorinkubiert und anschließend für 2 Stunden mit  $10^6$  CFU/ml *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E infiziert. Nach der Infektion wurden die Zelllysate mit spezifischem Antikörper gegen c-Jun präzipitiert und die gebundenen DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-spezifischen

Primern in der PCR amplifiziert. Zur Überprüfung stattfindender Transkription wurde simultan die Rekrutierung der Polymerase II (Pol II) an den *hBD-3*-Promotor nachgewiesen, indem die DNA-Proteinkomplexe mit spezifischem Antikörper gegen Pol II gebunden wurden und die entsprechenden DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-Primern in der PCR amplifiziert wurden. Zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung an Gesamt-DNA wurde die *hBD-3*-Promotor-DNA-Sequenz vor der Immunpräzipitation im Gesamtzelllysate mit spezifischen *hBD-3*-Promotor-Primern durch PCR analysiert (Input).

Aus der Abbildung 5.12 geht hervor, dass die Inhibition der MAPKs ERK1/2 und JNK zu einer deutlichen Verringerung der Bindung von c-Jun an den *hBD-3*-Promotor nach Infektion mit *M. catarrhalis* führte. Auch die Rekrutierung der Polymerase II an den *hBD-3*-Promotor nach der Stimulation mit *M. catarrhalis* war durch die Hemmung der MAPKs ERK1/2 und JNK deutlich geringer.

Zusammenfassend zeigten die Versuche, dass die MAPKs ERK1/2 und JNK direkt die AP-1-Aktivierung für die *M. catarrhalis*-stimulierte *hBD-3*-Produktion regulierten.



**Abbildung 5.12: ERK1/2 und JNK aktivieren die AP-1-Bindung an den *hBD-3*-Promotor nach Infektion mit *M. catarrhalis***

BEAS-2B-Zellen wurden 1 Stunde mit U0126 (MEK1/2-Inhibitor zur Inhibition von ERK1/2-Aktivierung) und SP600125 (JNK-Inhibitor) (je 10  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend für 2 Stunden mit *M. catarrhalis* ( $10^6$  CFU/ml) infiziert. Mittels ChIP-Analyse wurden die Zelllysate mit spezifischem Antikörper gegen c-Jun präzipitiert und die gebundenen DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Zur Kontrolle einer stattfindenden Transkription wurde mit spezifischem Antikörper gegen Polymerase II (Pol II) präzipitiert und die gebundenen DNA-Sequenzen mit *hBD-3*-Promotor-Primern mittels PCR analysiert. Zum Nachweis einer gleichmäßig eingesetzten Gesamt-DNA wurde die *hBD-3*-Promotor-DNA-Sequenz vor Immunpräzipitation im Zelllysate mit *hBD-3*-Promotor-Primern durch PCR bestimmt (Input). Das dargestellte PCR-Ergebnis ist eine repräsentative Auswahl von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit gleichem Ergebnis.

## 6 DISKUSSION

*M. catarrhalis* ist ein COPD-assoziiertes Erreger, der durch eine chronische Besiedlung der unteren Atemwege vermutlich die persistierende Inflammation der COPD mit aufrechterhält und durch akute Infektionen mit einem neuen *M. catarrhalis*-Bakterienstamm Exazerbationen der COPD auslöst [35, 39]. Hinsichtlich der weltweit steigenden Zunahme Antibiotika-resistenter *M. catarrhalis*-Stämme [79, 93] stellt die Erforschung körpereigener antimikrobieller Peptide (AMP) einen Ansatz in Richtung innovativer alternativer Behandlungsmethoden jenseits gängiger Antibiotika dar, von denen möglicherweise auch COPD-Patienten profitieren können. Bisher wurde die Aktivierung des respiratorischen Epithels bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* im Zusammenhang mit einer inflammatorischen Zytokinexpression beschrieben [72, 318, 319]. Zu einer effizienten angeborenen Immunabwehr zählt aber auch die Expression von humanen antimikrobiellen Peptiden. Dabei kommt dem hBD-3 eine besonders wichtige Funktion in der epithelialen Immunantwort zu, da es unter den humanen  $\beta$ -Defensinen die stärkste antimikrobielle Aktivität gegen ein umfangreiches Erregerspektrum aufweist und zudem auch salzunempfindlich antimikrobiell wirksam ist [223, 230]. Obgleich in den letzten Jahren eine hBD-3-Expression nach bakteriellen Infektionen in der Lunge nachgewiesen werden konnte [234], sind die Funktion und genauen Regulationsmechanismen der hBD-3-Expression in Bezug auf Infektionen mit *M. catarrhalis* im respiratorischen Epithel nicht untersucht worden und waren Gegenstand dieser Arbeit.

### 6.1 Das hBD-3 ist gegenüber *M. catarrhalis* antimikrobiell wirksam

Die in dieser Arbeit durchgeführten AMP-Empfindlichkeitstests zeigten erstmals, dass rekombinantes hBD-3 eine antimikrobielle Aktivität gegenüber den *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen O35E und ATCC 25238 besitzt. Dabei war das rekombinante hBD-3 in einer deutlich niedrigeren Konzentration nahezu genauso bakterizid wirksam gegenüber den *M. catarrhalis*-Wildtypstämmen wie das in der Therapie von *M. catarrhalis*-Infektionen zum Einsatz kommende Reserveantibiotikum Imipenem. Die Fähigkeit zur Bildung einer stabilen amphipathischen Dimer-Struktur und die hohe positive Nettoladung scheinen für die im Gegensatz zu den anderen  $\beta$ -Defensinen salzunempfindliche und für die von allen  $\beta$ -Defensinen am potentesten aktive antimikrobielle Wirkung des hBD-3 verantwortlich zu sein [223, 239]. Die antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-3 konnte somit bereits für eine Vielzahl verschiedenster Erreger nachgewiesen werden, wozu zahlreiche gram-positive und gram-negative Bakterien einschließlich nosokomialer multi-resistenter *Staphylococcus aureus*-, *Enterococcus faecium*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme sowie auch Pilze wie unterschiedliche *Candida*-Spezies dazugehören [230, 238, 240, 241]. Zudem weist das hBD-3 auch eine virostatistische Wirkung gegenüber dem Humanen

Immundefizienz-Virus (HIV) [242, 243], dem Influenza-Virus [244, 244], Herpes-simplex-Virus (HSV) [245] und Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) [246] auf. Der klassische Wirkmechanismus von antimikrobiellen Peptiden wird am besten gegenüber Bakterien beschrieben und beruht auf einer Wechselwirkung mit der bakteriellen Zellmembran, die eine Permeabilisierung hervorruft, woraufhin das Membranpotential zusammenbricht und schließlich zur Lyse der Bakterien führt [200, 202, 203]. An der initialen Bindung der AMP an die Bakterienzelle sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Peptiden und den negativ geladenen Bestandteilen der Bakterienmembran beteiligt [200, 202, 203]. Dabei konnte für das hBD-3 gezeigt werden, dass die Komposition der Membran-Lipidmatrix die antimikrobielle Aktivität von hBD-3 bestimmt. So wurde nachgewiesen, dass das polykationische hBD-3 Lipid-spezifische Interaktionen mit negativ geladenen LPS-Molekülen der gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* eingeht [320]. Ob hBD-3 parallel zu diesen Beobachtungen seine antimikrobielle Aktivität gegenüber *M. catarrhalis* in einem ersten Schritt auch durch die Bindung an die LPS-strukturverwandten, LOS-Moleküle von *M. catarrhalis* entfaltet, ist allerdings bisher nicht bekannt. Für den Prozess zur Membranpermeabilisierung existieren einige noch nicht vollständig geklärte Theorien. Eine gängige Theorie geht davon aus, dass sich die AMP aufgrund ihres amphipatischen Charakters in die zytoplasmatische Phospholipid-Doppelmembran der Bakterien einlagern und durch Zusammenlagerung mehrerer Peptide entweder nach dem *barrel-stave*-Modell Fassdauben-ähnliche Kanäle oder nach dem *toroidal-pore*-Modell Wurmloch- bzw. Torus-ähnliche Poren bilden [200, 204, 205]. Eine andere Theorie basiert auf dem *carpet*-Modell und beschreibt, dass die AMP die Bakterienmembran wie einen Teppich großflächig bedecken, bis sie nach Erreichen einer Schwellenkonzentration ungeordnet in die Membran eindringen, vorübergehend Poren formen können und letztlich unter Ausbildung von Mizellen die bakterielle Membranintegrität komplett aufheben [200, 206]. Für das hBD-3 konnte bisher in Abhängigkeit der Lipid-spezifischen Interaktionen und einer damit verbundenen Eindringtiefe in die Bakterienmembran ein *carpet*-ähnlicher Mechanismus zur Membranpermeabilisierung gezeigt werden [320]. Bei einigen AMP wurde neben der Interaktion mit der Bakterienmembran eine Interaktion mit intrazellulären Proteinen und Nukleinsäuren der Bakterienzelle einhergehend mit der Inhibition überlebenswichtiger Zellstoffwechselprozesse als antimikrobieller Wirkmechanismus beschrieben [200, 203]. Auch für hBD-3 wurde postuliert, dass es nach einer transienten Membranpermeabilisierung möglicherweise über die entstandenen Läsionen ins Bakterienzellinnere gelangt, um dort mit intrazellulären Zielstrukturen zu interagieren, was letztlich zum Untergang der Bakterienzelle führen könnte. Allerdings konnte hierfür bisher kein direkter Nachweis erbracht werden [320]. Die Daten dieser Arbeit ergaben bereits nach 0,5 Stunden einen antimikrobiellen Effekt von rekombinantem hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis* und lassen daher die Schlussfolgerung zu, dass das hBD-3 die untersuchten *M. catarrhalis*-Wildtypstämme O35E und ATCC 25238 eher durch schnelle



direkte dauerhafte Membranpermeabilisierung via Porenformation und/oder Auflösung der Membran in einzelne Mizellen tötet als über den komplex längeren Vorgang bei Eingriff in den intrazellulären Bakterienzellstoffwechsel.

## **6.2 *M. catarrhalis* induziert die hBD-3-Expression in respiratorischem Epithel**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass nach Stimulation mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E eine zeit- und dosisabhängige Expression von hBD-3 in primären Bronchialepithelzellen (PBEC), BEAS-2B-Zellen und A549-Zellen stattfand. Dabei zeigten die PBEC nach Infektion mit *M. catarrhalis* eine ca. 2,5-fach höhere hBD-3-Sekretion als die BEAS-2B-Zellen und eine ca. 1,3-fach höhere hBD-3-Produktion als die A549-Zellen. Ein unterschiedliches Reaktionsverhalten von primären Zellen im Vergleich zu etablierten Zelllinien wurde schon in anderen Zusammenhängen beschrieben [321] und spiegelt sich in dieser Arbeit somit in einer quantitativ höheren Expression von hBD-3 in primären Bronchialepithelzellen wider. Allerdings war die hBD-3-Sekretion nach der Stimulation mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E in allen drei verwendeten Zelltypen des respiratorischen Epithels qualitativ miteinander vergleichbar. Aus diesem Grunde wurden wegen der Empfindlichkeit und der Schwierigkeiten in der Gewinnung sowie Anzucht der primären Bronchialepithelzellen für die weiteren Versuche dieser Arbeit die etablierten Zelllinien humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und humane Typ II-Alveolarepithelzelllinie A549 verwendet. Zudem konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, dass die unterschiedlichen *M. catarrhalis*-Wildtypstämme O35E, ATCC 25238 und O46E keine signifikanten Stammes-spezifischen Unterschiede bezüglich der hBD-3-Produktion in Bronchialepithelzellen aufwiesen. Somit scheint die hBD-3-Freisetzung eine übliche Antwort von respiratorischen Epithelzellen auf eine Infektion mit *M. catarrhalis* zu sein. Diese Schlussfolgerung wird auch durch eine Studie von Ishimoto et al. unterstützt, aus der hervorging, dass Patienten mit einer bakteriellen Pneumonie eine erhöhte Konzentration von hBD-3 im Respirationstrakt und Serum aufzeigten [234]. Die Studie wies zudem parallel eine ausgeprägte antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-3 gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* nach. Da in dieser vorliegenden Arbeit wie bereits beschrieben ein deutlicher antimikrobieller Effekt von hBD-3 gegenüber dem Atemwegspathogen *M. catarrhalis* gezeigt wurde und da das hBD-3 darüber hinaus zahlreiche immunmodulatorische Funktionen ausübt [231, 247-249], kann davon ausgegangen werden, dass dieses humane  $\beta$ -Defensin für die Immunantwort bei Infektionen des Atemwegtraktes eine wichtige Rolle spielt.

### 6.3 Die Rolle der Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Produktion

Diese Arbeit ergab, dass die Stimulation von humanen Bronchialepithelzellen weder mit einer *M. catarrhalis* O35E-UspA1-defizienten Mutante noch mit einer *M. catarrhalis* O35E-UspA2-defizienten Mutante zu einer im Vergleich mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E veränderten hBD-3-Produktion führte. Somit hatten die *M. catarrhalis*-Oberflächenproteine UspA1 und UspA2 keinen Effekt auf die hBD-3-Expression. Allerdings zeigte die Infektion der Bronchialepithelzellen mit der *M. catarrhalis* O35E-LOS-defizienten Mutante eine signifikant erniedrigte hBD-3-Expression verglichen zur *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E-induzierten hBD-3-Sekretion. Umgekehrt konnte durch die Stimulation mit aufgereinigtem *M. catarrhalis*-spezifischem LOS die hBD-3-Produktion in humanen Bronchialepithelzellen induziert werden. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion vom Virulenzfaktor LOS abhängig ist. Interessanterweise führte die Stimulation mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E zu einer signifikant höheren hBD-3-Expression verglichen mit dem unbehandelten *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E. Diese Beobachtung verdeutlichte einerseits, dass die Viabilität des Erregers keine Rolle für die hBD-3-Expression spielte, aber auch andererseits, dass vor allem den hitzestabilen Bestandteilen von *M. catarrhalis* eine besondere Bedeutung für die hBD-3-Produktion zukam. Letztere Schlussfolgerung bestätigte somit abermals die Abhängigkeit der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Sekretion von dem LOS, dem hitzestabilen Hauptbestandteil der äußeren Membran von *M. catarrhalis*. Bislang konnte die Stimulation mit *M. catarrhalis*-spezifischem LOS mit der Induktion der Expression von interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1)) auf humanen THP-1 Monozyten sowie mit der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 aus humanen THP-1 Monozyten in Verbindung gebracht werden [317]. Darüber hinaus kommt dem *M. catarrhalis*-LOS eine entscheidende Rolle für die Adhäsion, Invasion und Komplementresistenz des Erregers zuteil [73, 125, 126]. Da die hBD-3-Expression durch Stimulation mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E gegenüber dem unbehandelten *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E jedoch deutlich höher ausfiel, ist es auch denkbar, dass im Rahmen der Hitzeinaktivierung abgesehen von LOS noch andere, bisher unbekannte, hitzestabile Komponenten wie Lipide, Polysaccharide oder hitzestabile Proteine bzw. Enzyme [322] des Erregers freigesetzt werden und an der Induktion der hBD-3-Expression beteiligt sind. Die Vermutung, dass noch andere Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* als dessen LOS die Expression von hBD-3 im Bronchialepithel induzieren, wird auch dadurch bekräftigt, dass nach der Infektion mit der *M. catarrhalis* O35E-LOS-defizienten Mutante die hBD-3-Sekretion zwar signifikant niedriger im Vergleich zum *M. catarrhalis* O35E-Wildtyp war, aber nicht bis auf den Basalwert sank. Es sollten daher diesen Hinweisen folgend zukünftig weiterführende Studien stattfinden, um noch andere Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* für ihre Bedeutung in der hBD-3-Sekretion im Bronchialepithel zu untersuchen. Eine weitere

denkbare Erklärung für die beobachtete, gesteigerte hBD-3-Sekretion nach Infektion mit hitzeinaktiviertem *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E im Vergleich zum lebenden, unbehandelten *M. catarrhalis*-Wildtypstamm O35E ist auch, dass letzterer möglicherweise via eines bisher unbekanntes, inhibitorischen Mechanismus aktiv die Induktion der hBD-3-Expression reduzieren kann, wohingegen dieser postulierte, inhibitorische Mechanismus durch die Hitzeinaktivierung des Erregers außer Kraft gesetzt wird. Bislang finden sich hierzu in der Literatur keine Angaben, so dass zur Unterstützung dieser Hypothese in Zukunft fortführende Analysen erhoben werden sollten.

#### **6.4 Die Bedeutung von TLRs und anderen Rezeptoren in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Expression**

Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wiesen eine vom *M. catarrhalis*-LOS abhängige hBD-3-Sekretion im respiratorischen Epithel nach. In der Literatur konnte bislang der TLR4 als Rezeptor für die Erkennung des *M. catarrhalis*-spezifischen LOS im Zusammenhang mit der Aktivierung von humanen THP-1 Monozyten zur Expression von ICAM-1 sowie den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 identifiziert werden [317]. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit in Transfektionsversuchen mit TLR4-siRNA gezeigt, dass die *M. catarrhalis*-LOS-induzierte hBD-3-Sekretion in pulmonalen Epithelzellen unabhängig vom TLR4 war. Stattdessen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels RNA-Interferenz-Versuchen nachgewiesen, dass die *M. catarrhalis*-LOS-vermittelte hBD-3-Produktion vom TLR2 abhängig war. Die Detektion des Erregers *M. catarrhalis* vom pulmonalen Epithel konnte bereits in vorangegangenen Studien mit dem TLR2 und einer konsekutiven inflammatorischen Zytokinsekretion in Verbindung gebracht werden [72]. *M. catarrhalis* exprimiert zahlreiche hochkonservierte mikrobielle molekulare Musterstrukturen (PAMPs) wie u. a. die Zellwandkomponenten Lipoproteine, die im Allgemeinen als TLR2-Liganden gelten [158]. Jedoch erfolgte bislang kein direkter Nachweis, ob diese PAMPs auch tatsächlich aufgereinigt aus dem Bakterium *M. catarrhalis* als typische TLR2-Agonisten fungieren. Dafür zeigte diese hier vorliegende Arbeit erstmals parallel, dass für die Detektion des *M. catarrhalis*-spezifischen LOS von pulmonalen Epithelzellen der TLR2 eine bedeutende Rolle spielte. Wie in einigen Arbeiten beschrieben, erkennt TLR2 auch atypische Formen des LPS, die von *Leptospira interrogans* [161], *Porphyromonas gingivalis* [162] und *Legionella pneumophila* [163] exprimiert werden. Dabei unterscheiden sich diese atypischen LPS-Formen von den klassischen LPS-Typen enterobakterieller gram-negativer Erreger vor allem im strukturellen Aufbau ihrer Lipid A-Komponente durch längere Fettsäure-Ketten und verschiedene Substituenten der Fettsäuren [163]. Das LOS ist mit LPS strukturverwandt. Dem LOS fehlt jedoch die lange variable O-spezifische Polysaccharidseitenkette mit den sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten, das sogenannte O-Antigen, welches für das LPS charakteristisch ist [64, 80, 123]. Ob das Lipid A des *M. catarrhalis*-LOS strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem Lipid A der atypischen LPS-Formen besitzt,

wodurch eine Detektion über TLR2 erklärt werden könnte, ist bisher unbekannt und müsste in nachfolgenden Untersuchungen ermittelt werden. Da das *M. catarrhalis*-LOS jedoch einer Studie zufolge von humanen THP-1 Monozyten über TLR4 erkannt wird [317] und aus dieser hier vorliegenden Arbeit hervorging, dass es vom pulmonalen Epithel von TLR2 detektiert wird, spielen möglicherweise zusätzlich in Abhängigkeit des TLR-Expressionsprofils auch zellspezifische Detektionsmechanismen eine Rolle. So ist der TLR4 im Gegensatz zur gewöhnlichen zellmembranständigen Lokalisation bei den Immunzellen wie z. B. den Monozyten bei den Atemwegs- und Alveolarepithelzellen vorrangig intrazellulär [172] und auf der basolateralen Membran lokalisiert [167]. Dagegen wurde TLR2 im Atemwegs- und Alveolarepithel zellmembranständig nachgewiesen [165-169] und scheint vermutlich dadurch eine bedeutendere Funktion als der TLR4 für extrazelluläre aerogene Erreger zu besitzen. Die Erkennung von verschiedenen Pathogenen durch TLR2 in unterschiedlichen Zelltypen als Induktion für die Sekretion von hBD-3 konnte zudem bereits in anderen Studien nachgewiesen werden [235, 267, 268] und steht damit in Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen.

Da die hBD-3-Sekretion in TLR2-siRNA-transfizierten Zellen nach Infektion mit *M. catarrhalis* zwar signifikant erniedrigt war, aber nicht gänzlich bis auf den Basalwert sank, muss davon ausgegangen werden, dass noch weitere TLRs bzw. allgemein PRRs oder andere Rezeptoren oder Mechanismen im Zusammenspiel mit TLR2 die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion im respiratorischen Epithel vermitteln. Kürzlich konnte auch die Aktivierung von TLR5 und TLR9 in Verbindung mit einer erhöhten hBD-3-Expression in Lungenepithelzellen gebracht werden [267]. Die Aktivierung von TLR9 durch *M. catarrhalis*-DNA (unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Motive der DNA) konnte zumindest in einem anderen Zusammenhang in B-Zellen bereits gezeigt werden [323]. Wohingegen eine TLR5-Aktivierung durch *M. catarrhalis* bzw. potenzielle TLR5-Agonisten aus *M. catarrhalis* stammend bisher in der Literatur nicht beschrieben wurden. Da TLR9 und TLR5 im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Produktion neben TLR2 auch von diesen TLRs abhängig sein könnte.

*M. catarrhalis* kommt hauptsächlich extrazellulär vor, ist aber zudem in der Lage in Epithelzellen der Atemwege und des lymphatischen Rachengewebes einzudringen und somit intrazellulär aufzutreten [72-74]. Folglich können an der Erkennung von *M. catarrhalis* auch im Zytosol lokalisierte PRRs beteiligt sein. So konnte nachgewiesen werden, dass die Infektion von Lungenepithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer NOD1-abhängigen inflammatorischen Immunantwort führte [72]. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass die hBD-3-Sekretion im Atemwegsepithel über NOD1-vermittelte Signalwege induziert werden konnte [270]. Ob NOD1 neben TLR2 auch für die *M. catarrhalis*-

induzierte hBD-3-Produktion eine Rolle spielt, wurde in dieser vorliegenden Arbeit nicht untersucht und müsste in nachfolgenden Studien adressiert werden.

Interessanterweise belegen mehrere Studien, dass neben der Stimulation von bestimmten PRRs außerdem die Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) für die Induktion der hBD-3-Expression von besonderer Bedeutung ist [233, 258, 260, 264, 266, 271]. Zusätzlich scheinen die EGFR- und TLR-abhängigen Signalwege bezüglich der hBD-3-Induktion auch in direktem Zusammenhang zu stehen. Dementsprechend zeigte kürzlich eine Studie, dass die durch den TLR4-Agonisten LPS verstärkt induzierte hBD-3-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomzellen über eine von TLR4 abhängige EGFR-Aktivierung vermittelt wird [257]. Auch der Nachweis, dass die durch den EGFR-Liganden TGF- $\alpha$  stimulierte hBD-3-Bildung in Keratinozyten noch zusätzlich durch die Kostimulation mit dem TLR5-Liganden Flagellin gesteigert wird, verdeutlicht, dass die EGFR- und TLR-aktivierten Signalwege in der hBD-3-Induktion möglicherweise synergistisch zusammenwirken [324]. Für dieses Zusammenwirken ist wahrscheinlich eine TLR-abhängige Transaktivierung von EGFR verantwortlich. Hinweise für einen solch existierenden Mechanismus lieferte eine Studie von Koff et al., die zeigte, dass die Stimulation verschiedenster TLRs in Bronchialepithel zur Aktivierung der Metalloprotease ADAM17 führte, die die Abspaltung von zellgebundenem EGFR-Liganden TGF- $\alpha$  bewirkte, was letztlich mit nachfolgender EGFR-Transaktivierung und der Induktion einer inflammatorischen Immunantwort einherging [325]. Auch in Verbindung mit der hBD-3-Bildung von Speiseröhrenepithelzellen nach Infektion mit *Candida albicans* konnte eine ADAM17-abhängige Freisetzung des EGFR-Agonisten TGF- $\alpha$  und die anschließende Transaktivierung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion nachgewiesen werden [266, 271]. Da der EGFR im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier gezeigte *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion das Ergebnis eines Zusammenspiels von TLR2 und EGFR ist.

## **6.5 Die Bedeutung von MAPKs und anderen Signalkinasen in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Expression**

Im Entzündungsprozess ist der intrazelluläre MAPK-Signalweg ein wichtiges Bindeglied, um Rezeptor-detektierte Signale ins Zellinnere zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren weiterzuleiten [184]. Die Aktivierung der MAPKs ERK1/2, JNK und p38 MAPK in Form ihrer Phosphorylierung konnte nach Infektion von Bronchialepithel mit *M. catarrhalis* in einer vorherigen Studie [318] und in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Trotz Aktivierung aller drei MAPKs durch *M. catarrhalis* führte nur die Inhibition von ERK1/2 und JNK im Rahmen dieser Arbeit zu einer Reduktion der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Sekretion im respiratorischen Epithel. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen konnte die regulatorische Funktion der MAPKs für die Induktion der hBD-3-Expression in

verschiedenen Zelltypen bereits in weiteren Studien gezeigt werden. Beispielsweise wurde beschrieben, dass nach Infektion von Keratinozyten mit *Staphylococcus aureus* oder durch dessen Zellwandbestandteil LTA die Induktion der hBD-3-Expression über die p38 MAPK reguliert wurde [235, 235]. Für die nach Legionellen- und Pneumokokkeninfektion [267, 268] sowie nach Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* [270] induzierte hBD-3-Expression im respiratorischen Epithel konnte eine Regulation über JNK gezeigt werden. Dagegen wurde beobachtet, dass die hBD-3-Expression in Magenepithelzellen nach Infektion mit *Helicobacter pylori* wie in dieser hier vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit von der Aktivität von ERK und JNK erfolgte [233]. Nach einer Infektion von Speiseröhrenzellen mit *Candida albicans* wurde gezeigt, dass die hBD-3-Bildung sowohl von den MAPKs ERK, JNK und p38 MAPK abhängig war [266, 271]. Interessanterweise wies eine Studie nach, dass an der Induktion der hBD-3-Produktion in oralen Epithelzellen nach Stimulation mit dem EGFR-Liganden EGF neben der Aktivierung von MAPKK MEK1/2 (Stimulator der MAPK ERK1/2) und p38 MAPK zusätzlich die Aktivierung der Signalkinasen PKC und PI3K beteiligt war [258]. Auch im Zusammenhang mit der Infektion von Bronchialepithel mit *M. catarrhalis* konnte eine Aktivierung von PKC [319] gezeigt werden, wohingegen die PI3K-Aktivität nach Infektion mit *M. catarrhalis*-Wildtyp O35E eher unbeeinflusst blieb [107]. Da die PKC und PI3K in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Signalkinasen, insbesondere die PKC, neben den MAPK ERK1/2 und JNK eine Rolle für die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion im Bronchialepithel spielen.

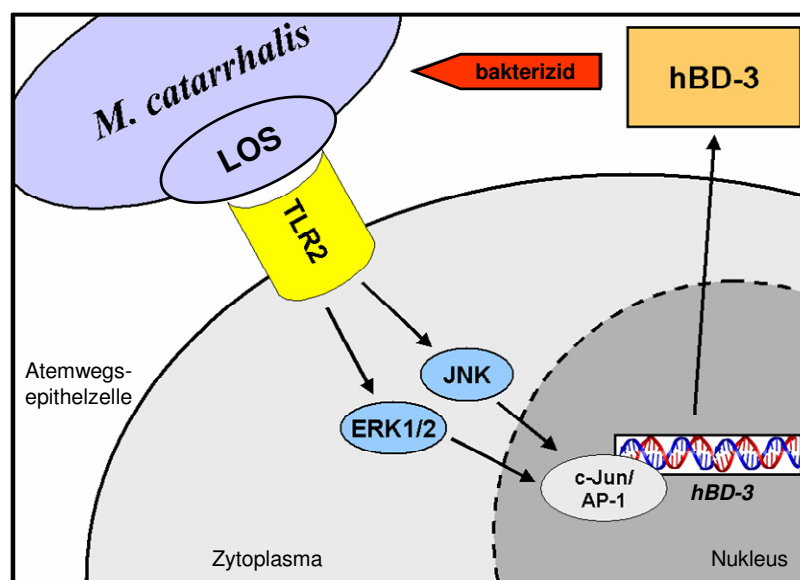
## **6.6 Die Funktion der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Expression**

Die Promotorregion des *hBD-3*-Gens weist zur Regulation der hBD-3-Expression unter anderem mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 [232] sowie im proximalen *hBD-3*-Promotorbereich eine Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B auf [272]. Im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivität keinen Einfluss auf die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion im respiratorischen Epithel hatte. Dagegen wurde festgestellt, dass nach Infektion von Bronchialepithel mit *M. catarrhalis* eine Rekrutierung der AP-1-Untereinheit c-Jun erfolgte. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien. So wurde die regulatorische Funktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B für die hBD-3-Expression bisher nur in Verbindung nach einer Stimulation mit den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  beschrieben [272]. Wohingegen in vorangegangenen *in vitro* Infektionsmodellen mit unterschiedlichen Zellen und verschiedenen pathogenen Erregern die hier erzielten Daten unterstützend eine vom Transkriptionsfaktor AP-1 abhängige Regulation der hBD-3-Expression nachgewiesen werden konnte [235, 266-268, 271]. Interessanterweise wurde die Infektion des Bronchialepithels mit *M. catarrhalis* und konsekutiver Zytokinsekretion bisher nur in Verbindung mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B

gebracht [72, 318, 319]. Die Daten der hier erhobenen Arbeit zeigten damit erstmals eine durch *M. catarrhalis*-Infektion ausgelöste Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Desweiteren konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Inhibition der Aktivierung der MAPKs ERK1/2 und JNK zu einer Verringerung der Rekrutierung der AP-1-Untereinheit c-Jun an den *hBD-3*-Promotor nach Infektion mit *M. catarrhalis* führte, wodurch deutlich wurde, dass diese MAPKs direkt an der Regulation der AP-1-Aktivierung für die *M. catarrhalis*-induzierte *hBD-3*-Sekretion beteiligt waren. Diese Ergebnisse gehen zugleich auch mit den Beobachtungen vorheriger Studien einher, die bestätigen konnten, dass die MAPKs den Transkriptionsfaktor AP-1 durch entsprechende Phosphorylierung zu aktivieren vermögen [194, 195].

## 6.7 Modell der *M. catarrhalis*-induzierten *hBD-3*-Sekretion im respiratorischen Epithel

Zusammengefasst ergaben die in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse, dass die Erkennung des *M. catarrhalis*-spezifischen LOS durch TLR2 die *hBD-3*-Expression in respiratorischem Epithel induzierte. In der intrazellulären Signaltransduktion zur Regulation der *hBD-3*-Bildung in Atemwegsepithelzellen nach *M. catarrhalis*-Infektion spielte des Weiteren die Aktivierung der MAPKs ERK1/2 und JNK sowie die durch diese MAPKs vermittelte Aktivierung der AP-1-Transkriptionsfaktoruntereinheit c-Jun eine wichtige Rolle. Zudem konnte gezeigt werden, dass das *hBD-3* eine ausgeprägte bakterizide Wirkung gegenüber *M. catarrhalis* aufwies. Der hier beschriebene Mechanismus ist modellhaft in der nachfolgenden Abbildung 6.1 veranschaulicht.



**Abbildung 6.1: Modell zur Regulation der *hBD-3*-Expression in humanem respiratorischem Epithel durch die Infektion mit *M. catarrhalis***

Die Erkennung des *M. catarrhalis*-spezifischen LOS durch TLR2 vermittelt im respiratorischen Epithel die *hBD-3*-Expression. Über die Aktivierung der MAPKs ERK1/2 und JNK sowie der AP-1-

---

Transkriptionsfaktoruntereinheit c-Jun wird die Transkription des hBD-3 reguliert, welches gegenüber *M. catarrhalis* antimikrobiell wirksam ist.

## 6.8 Mögliche Bedeutung von humanen $\beta$ -Defensinen in der COPD

COPD-Patienten weisen im unteren Respirationstrakt gehäuft eine bakterielle Besiedlung mit nicht-typisierbarem *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae* auf, die im Zusammenhang mit der Verstärkung der für COPD typischen chronischen Entzündungsreaktion in den unteren Atemwegen gebracht wird [35, 36]. Zudem sind akute bakterielle Infektionen der distalen Atemwege mit neuen Bakterienstämmen der oben genannten Erreger für die rezidivierenden Exazerbationen der COPD verantwortlich [35, 53, 54]. Die gesteigerte Empfänglichkeit für diese bakteriellen Infektionen bei COPD-Patienten ist bisher unzureichend geklärt, scheint aber neben einer unzureichenden mukoziliären Reinigungsfunktion mit einer Störung des angeborenen Immunsystems assoziiert zu sein [42]. Mittlerweile deuten unterschiedliche Beobachtungen darauf hin, dass Veränderungen und Störungen der Expression oder der Aktivität von humanen  $\beta$ -Defensinen zusätzlich mit der Pathogenese der COPD verknüpft zu sein scheinen. Epidemiologisch-genetische Untersuchungen belegten einen Zusammenhang zwischen bestimmten Einzelnukleotid-Polymorphismen im *hBD-1*-Gen und dem Auftreten von COPD [299, 300]. Jedoch sind die Auswirkungen dieser Polymorphismen auf die Expression und Aktivität der humanen  $\beta$ -Defensine bei der COPD bisher noch unbekannt [202]. Unabhängig von diesen genetischen Variationen wurde auf RNA-Ebene eine erhöhte hBD-1-Expression im Bronchialepithel von COPD-Patienten nachgewiesen, die mit der Abnahme der Lungenfunktion assoziiert ist [301]. Interessanterweise wurde zudem gezeigt, dass das Rauchen, der Hauptrisikofaktor für die Entstehung der COPD, die Induktion der Expression von hBD-2 im Atemwegsepithel bei respiratorischen Infektionen supprimiert [302]. Damit einhergehend wurden bei aktuellen aber auch ehemaligen Rauchern mit einer akuten Pneumonie nur geringe Konzentrationen von hBD-2 im Rachenspülwasser und Sputum gemessen [302]. Diese durch das Rauchen verursachte Hemmung einer Erreger-induzierten AMP-Expression spielt womöglich auch bei aktuell oder ehemals rauchenden COPD-Patienten eine Rolle und könnte teilweise den Abwehrdefekt erklären, der die Betroffenen für die chronisch bakterielle Besiedlung der Lunge und für die akuten Infektexazerbationen der COPD prädisponiert [302, 303]. Tatsächlich wurde erst kürzlich entdeckt, dass rauchende COPD-Patienten bereits eine erniedrigte basale hBD-2-Expression in den Epithelzellen der zentralen Atemwege aufweisen, die mit der Zunahme der Atemwegsobstruktion und der Anzahlhöhe der Zigaretten-Packungsjahre zusammenhängt sowie möglicherweise eine mikrobielle Absiedlung in die distalen Atemwege und Lunge begünstigen kann [304]. Ob insbesondere die oben mit hBD-2 beschriebenen Beobachtungen auch für das in dieser Arbeit untersuchte hBD-3 zutreffen, ist nicht bekannt und müsste in



weiterführenden Studien ermittelt werden. Da die hier vorliegende Arbeit ergab, dass das hBD-3 gegenüber *M. catarrhalis* deutlich antimikrobiell wirksam war, könnte eine Störung der hBD-3-Expression bei der COPD für die beobachtete chronische Besiedlung oder die akuten Infektexazerbationen der COPD mit diesem Erreger mitverantwortlich sein. Interessanterweise konnte in anderem Zusammenhang gezeigt werden, dass inflammatorische Zustände zu einer Veränderung des TLR-Zellexpressionsprofils führen können [326]. So wurde auch nachgewiesen, dass Alveolarmakrophagen von Rauchern und COPD-Patienten im Vergleich zur nichtrauchenden gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Expression des TLR2 aufweisen [327]. Zudem wird TLR4 im Atemwegsepithel von COPD-Patienten verglichen mit gesunden Probanden niedriger exprimiert, während für TLR2 kein verändertes Expressionsmuster im Atemwegsepithel von COPD-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden gezeigt wurde [328]. Zwar wiesen die in dieser Arbeit erhobenen Daten nach, dass die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Sekretion im respiratorischen Epithel unabhängig vom TLR4, aber abhängig vom TLR2 erfolgte, jedoch wurde nicht ausgeschlossen, dass noch weitere PRRs im Zusammenspiel mit TLR2 an der hBD-3-Expression nach Infektion mit *M. catarrhalis* beteiligt waren. Da in den Transfektionsversuchen mit TLR2-siRNA die *M. catarrhalis*-induzierte hBD-3-Bildung nicht gänzlich bis auf den Basalwert sank, kann allerdings sehr wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass noch andere PRRs eine Rolle in der *M. catarrhalis*-induzierten hBD-3-Sekretion spielen. Somit könnte eine veränderte Expression von weiteren PRRs (außer des TLR4) im respiratorischen Epithel COPD-Erkrankter möglicherweise eine gestörte hBD-3-Sekretion nach Infektion mit *M. catarrhalis* verursachen, was wiederum die beobachtete Kolonisierung und die Infektexazerbation mit diesem Erreger begünstigen würde. Das Expressionsprofil von weiteren PRRs im respiratorischen Epithel von COPD-Betroffenen ist bisher jedoch noch unbekannt und müsste in weiterführenden Studien zur Unterstützung obiger These untersucht werden.

## **6.9 Ausblick – Antimikrobielle Peptide in der Therapie von Infektionen**

Nicht nur die zunehmende Antibiotikaresistenz von *M. catarrhalis* bzw. insgesamt von verschiedensten Erregern, sondern auch das gehäufte Auftreten multiresistenter Pathogene insbesondere bei immunsupprimierten Tumor-, Transplantations- oder HIV-Patienten macht die Erforschung neuer Therapiemethoden erforderlich. In diesem Zusammenhang werden vor allem die antimikrobiellen Peptide (AMP) aufgrund ihres breit gefächerten Erregerspektrums und ihrer zahlreichen immunmodulatorischen Funktionen als innovative Antibiotika diskutiert [329, 330]. Eine Vielzahl der in den Epithelien exprimierten AMP ist induzierbar [137]. Somit wäre perspektivisch denkbar, dass vermehrt Medikamente hergestellt werden, die möglicherweise gezielt Rezeptor-vermittelt die körpereigene Expression von bestimmten epithelialen AMP stimulieren und auf diese Weise die chemische Barriere auf den Epithelien steigern. Die gezielte Induktion der

endogenen AMP könnte damit zu einer bisher noch selten angewandten Methode zur Prophylaxe und Therapie von Infektionen werden [329]. Bislang konnte für die zwei Makrolidantibiotika Erythromycin und Azithromycin, die auch für die Therapie von Infektionen mit *M. catarrhalis* eingesetzt werden können, gezeigt werden, dass sie abgesehen von der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese auch die Expression von hBD-1 und hBD-2 in Atemwegsepithelzellen induzieren [331]. Die Induktion dieser Defensinexpression ereignete sich schon mit Antibiotikakonzentrationen, die jedoch allein keine bakterio-statische Wirksamkeit auf Pathogene hatten [331]. Im Hinblick auf diesen Wirkmechanismus könnten somit bereits gängige Antibiotika zur Steigerung der Induktion der AMP-Expression weiterentwickelt werden, die bei Einsatz in niedrigerer Dosierung auch die Nebenwirkungswahrscheinlichkeit deutlich minimieren. Zusätzlich ergaben Studien, dass die hormonell aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, die Cathelizidin-Expression im Bronchialepithel von gesunden Testpersonen und CF-Patienten zu induzieren vermag [332]. In der Behandlung von Tuberkulose konnten bereits erfolgreiche Daten im Zusammenhang mit einer Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe erhoben werden [333, 334]. In Anbetracht dessen könnten Vitamin D<sub>3</sub>-Analoge als AMP-Induktoren in Zukunft eine besondere Rolle in der therapeutischen Anwendung von weiteren respiratorischen Infektionen zuteil werden.

Abgesehen von der gesteuerten Induktion der endogenen AMP-Expression könnten synthetische Derivate der AMP auch direkt als Therapeutika angewendet werden. Mittlerweile durchlaufen mehrere synthetische Tier-assoziierte und humane AMP-Derivate die unterschiedlichen klinischen Studienphasen zur Beurteilung der Therapieanwendung bei Infektionen [329, 330]. So befindet sich beispielsweise von den humanen AMP derzeit das Histatin 5-Analogon PAC113 (Pacgen Biopharmaceuticals) in der klinischen Testphase II zur Behandlung der oralen Candidose [329, 335]. Die bisherigen Ergebnisse zum Einsatz synthetischer AMP-Derivate sind insgesamt sehr vielversprechend und könnten damit einen wesentlichen Beitrag in der Therapie insbesondere von Infektionen mit multiresistenten Pathogenen leisten [329, 330].

---

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004;23:932-46.
2. GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Revised 2011. <http://www.goldcopd.org/>. 2011.
3. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 2007;30:993-1013.
4. Vogelmeier C, Buhl R, Criege CP, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin. *Pneumologie* 2007;61:e1-40.
5. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009;33:1165-85.
6. Macintyre NR. Spirometry for the diagnosis and management of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 2009;54:1050-7.
7. Criege CP, Berdel D, Heise D, et al. Recommendations on spirometry by Deutsche Atemwegsliga. *Pneumologie* 2006;60:576-84.
8. Gillissen A, Glaab T, Buhl R. Clinical value of forced expiratory volume in 1 s (FEV1) in chronic obstructive pulmonary disease. *Med Klin (Munich)* 2009;104:119-24.
9. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 2004;364:613-20.
10. WHO. World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: WHO. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/). 2008.
11. Hurd SS. International efforts directed at attacking the problem of COPD. *Chest* 2000;117:336S-8S.
12. WHO. World Health Organization. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). <http://www.who.int/respiratory/copd/en>. 2007.
13. Geldmacher H, Biller H, Herbst A, et al. The prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Germany. Results of the BOLD study. *Dtsch Med Wochenschr* 2008;133:2609-14.
14. Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, et al. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006;27:188-207.
15. Andreas S, Batra A, Behr J, et al. Guidelines for smoking cessation in patients with COPD issued by the Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin. *Pneumologie* 2008;62:255-72.
16. Nowak D, Dietrich ES, Oberender P, et al. Cost-of-illness Study for the Treatment of COPD in Germany. *Pneumologie* 2004;58:837-44.
17. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007;370:765-73.
18. Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, et al. Not 15 but 50% of smokers develop COPD?--Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med* 2003;97:115-22.
19. Silverman EK, Sandhaus RA. Clinical practice. Alpha1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 2009;360:2749-57.
20. Silverman M, Kuehni CE. Early lung development and COPD. *Lancet* 2007;370:717-9.
21. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672-88.
22. Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med* 2004;350:2635-7.
23. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004;56:515-48.
24. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:183-92.
25. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006;61:448-54.
26. MacNee W. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. *BMJ* 2006;332:1202-4.
27. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364:709-21.
28. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:258-66.

29. Glaab T, Hohlfeld JM, Jorres RA, Krug N, Welte T. Pathomechanisms in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Med Klin (Munich)* 2006;101:951-6.
30. Jend HH. Lehrsammlung radiologischer Bilder aus der Lungenheilkunde. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). <http://www.mevis-research.de/~hhj/Lunge/SammlCOPD.html>. 2006.
31. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006;7:53.
32. Sharafkhaneh A, Hanania NA, Kim V. Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:475-7.
33. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:50-60.
34. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009;360:2445-54.
35. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:2355-65.
36. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:991-8.
37. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:336-63.
38. Tumkaya M, Atis S, Ozge C, Delialioglu N, Polat G, Kanik A. Relationship between airway colonization, inflammation and exacerbation frequency in COPD. *Respir Med* 2007;101:729-37.
39. 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;172:195-9.
40. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-53.
41. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002;57:759-64.
42. Sethi S, Mallia P, Johnston SL. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease II. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:532-4.
43. Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1090-5.
44. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:343-8.
45. Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax* 2000;55:12-8.
46. Anzueto A, Sethi S, Martinez FJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:554-64.
47. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847-52.
48. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman SP, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005;60:925-31.
49. Andersson F, Borg S, Jansson SA, et al. The costs of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Med* 2002;96:700-8.
50. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1418-22.
51. Sethi S, Wrona C, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF. Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:491-7.
52. Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman MS, Mauch H, Lode H. Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest* 1998;113:1542-8.
53. Sethi S, Sethi R, Eschberger K, et al. Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:356-61.
54. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002;347:465-71.

55. Soler N, Agusti C, Angrill J, Puig DIB, Torres A. Bronchoscopic validation of the significance of sputum purulence in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007;62:29-35.
56. Hays JP. *Moraxella catarrhalis*: a mini review. *J Pediatr Infect Dis* 2009;4:211-20.
57. Verduin CM, Hol C, Fleer A, van DH, van BA. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:125-44.
58. Berk SL. From *Micrococcus* to *Moraxella*. The reemergence of *Branhamella catarrhalis*. *Arch Intern Med* 1990;150:2254-7.
59. Seifert O. Sammlung Klinischer Vorträge. Verlag Breitkopf und Härtel, Leipzig 1882;240:21.
60. Pfeiffer R. *Mikrokokkus catarrhalis*, in: Frosch P., Kolle W., Die Mikrokokken, in: Flügge C. (ed.), *Die Mikroorganismen*. Verlag von Vogel, Leipzig 1896;2:154-5.
61. Dunn RA, Gordon MH. Remarks on the clinical and bacteriological aspects of an epidemic simulating influenza. *BMJ* 1905;2:421-7.
62. Ghon A, Pfeiffer H. Der *Micrococcus catarrhalis* (R. Pfeiffer) als Krankheitserreger. *Z Klin Med* 1902;44:263-81.
63. Gordon JE. The gram-negative cocci in "colds" and influenza. *Influenza studies VII*. *J Infect Dis* 1921;29:462-94.
64. Karalus R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect* 2000;2:547-59.
65. Enright MC, McKenzie H. *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*--clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *J Med Microbiol* 1997;46:360-71.
66. Catlin BW. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:293-320.
67. Holland DF. Generic index of the commoner forms of bacteria. *J Bacteriol* 1920;5:215-26.
68. Berger U, Paepcke E. Untersuchungen über die asaccharolytischen Neisserien des menschlichen Nasopharynx. *Z Hyg Infekt -Kr* 1962;148:269-81.
69. Henriksen SD, Bovre K. The taxonomy of the genera *Moraxella* and *Neisseria*. *J Gen Microbiol* 1968;51:387-92.
70. Catlin BW. Transfer of the organism named *Neisseria catarrhalis* to *Branhamella* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1970;20:155-9.
71. Ehrhard I. *Moraxella catarrhalis*, in: Darai G, Handermann M., Sonntag H.-G., Tidona C. A., Zöller L., *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2009;3:544-7.
72. 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 response. *Cell Microbiol* 2007;9:694-707.
73. Spaniol V, Heiniger N, Troller R, Aebi C. Outer membrane protein UspA1 and lipooligosaccharide are involved in invasion of human epithelial cells by *Moraxella catarrhalis*. *Microbes Infect* 2008;10:3-11.
74. Heiniger N, Spaniol V, Troller R, Vischer M, Aebi C. A reservoir of *Moraxella catarrhalis* in human pharyngeal lymphoid tissue. *J Infect Dis* 2007;196:1080-7.
75. Slevogt H, Tiwari KN, Schmeck B, et al. Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Med Microbiol Immunol* 2006;195:73-83.
76. Berger U. Reduktion von Nitrat und Nitrit durch *Neisseria*. *Z Hyg Infekt -Kr* 1961;148:45-50.
77. AAP. American Academy of Pediatrics. *Moraxella catarrhalis* Infections, in: Pickering LK, ed. *Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases*, 28th ed. <http://aapredbook.aappublications.org/cgi/content/full/2009/1/3.82>. 2009.
78. Hays JP. The genus *Moraxella*, in: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., *The Prokaryotes, Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer Verlag, New York 2006;6:958-87.
79. Paykel JM. *Moraxella* (*branhamella*) *catarrhalis* infections. *Primary Care Update for OB/GYNS* 2002;9:33-5.
80. de Vries SP, Bootsma HJ, Hays JP, Hermans PW. Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;73:389-406, Table.
81. Perez Vidakovics ML, Riesbeck K. Virulence mechanisms of *Moraxella* in the pathogenesis of infection. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22:279-85.
82. Faden H, Harabuchi Y, Hong JJ. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media. *J Infect Dis* 1994;169:1312-7.

83. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis* 1997;175:1440-5.
84. Howell TH. Recent advances in the treatment of chronic bronchitis. *Med World* 1951;73:478-81.
85. May JR. The bacteriology of chronic bronchitis. *Lancet* 1953;265:534-7.
86. Faden H. The microbiologic and immunologic basis for recurrent otitis media in children. *Eur J Pediatr* 2001;160:407-13.
87. Murphy TF, Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis* 2009;49:124-31.
88. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med* 2007;357:1487-95.
89. Gwaltney JM, Jr., Scheld WM, Sande MA, Sydnor A. The microbial etiology and antimicrobial therapy of adults with acute community-acquired sinusitis: a fifteen-year experience at the University of Virginia and review of other selected studies. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:457-61.
90. Schalen L. Acute laryngitis in adults: diagnosis, etiology, treatment. *Acta Otolaryngol Suppl* 1988;449:31.
91. Tamang MD, Dey S, Makaju RK, Jha BK, Shivananda PG, Bhramadatan KN. Prevalence of *Moraxella catarrhalis* infections of the lower respiratory tract in elderly patients. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2005;3:39-44.
92. Cook PP, Hecht DW, Snyderman DR. Nosocomial *Branhamella catarrhalis* in a paediatric intensive care unit: risk factors for disease. *J Hosp Infect* 1989;13:299-307.
93. McGregor K, Chang BJ, Mee BJ, Riley TV. *Moraxella catarrhalis*: clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:219-34.
94. Wallace RJ, Jr., Steingrube VA, Nash DR, et al. BRO beta-lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* subgenus *Moraxella*, including evidence for chromosomal beta-lactamase transfer by conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens*, and *M. lacunata*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1845-54.
95. Hoban D, Felmingham D. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2002;50 Suppl S1:49-59.
96. Höffken G, Lorenz J, Kern W, et al. Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany. *Pneumologie* 2009;63:e1-68.
97. Martinez G, Ahmed K, Watanabe K, Tao M, Nagatake T. Changes in antimicrobial susceptibility to *Moraxella catarrhalis* over a ten-year period. *J Infect Chemother* 1998;4:139-41.
98. McMichael JC. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* 2000;19 Suppl 1:S101-S107.
99. Murphy TF. Vaccine development for *Moraxella catarrhalis*: rationale, approaches and challenges. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:655-8.
100. Svanborg C, Bergsten G, Fischer H, et al. Adhesion, signal transduction and mucosal inflammation, in: Wilson M., *Bacterial adhesion to host tissues: Mechanisms and consequences*. Cambridge University Press 2002;1:223-322.
101. Luke NR, Jurgisek JA, Bakaletz LO, Campagnari AA. Contribution of *Moraxella catarrhalis* type IV pili to nasopharyngeal colonization and biofilm formation. *Infect Immun* 2007;75:5559-64.
102. Dersch P. Invasion. A bacterial survival strategy. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2002;45:577-82.
103. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;11:1034-43.
104. Attia AS, Ram S, Rice PA, Hansen EJ. Binding of vitronectin by the *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein interferes with late stages of the complement cascade. *Infect Immun* 2006;74:1597-611.
105. Nordström T, Blom AM, Forsgren A, Riesbeck K. The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Immunol* 2004;173:4598-606.
106. Nordström T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K. Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. *J Immunol* 2005;175:3628-36.
107. Slevogt H, Zabel S, Opitz B, et al. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol* 2008;9:1270-8.

108. Jendholm J, Samuelsson M, Cardell LO, Forsgren A, Riesbeck K. Moraxella catarrhalis-dependent tonsillar B cell activation does not lead to apoptosis but to vigorous proliferation resulting in nonspecific IgM production. *J Leukoc Biol* 2008;83:1370-8.
109. Campagnari AA, Shanks KL, Dyer DW. Growth of Moraxella catarrhalis with human transferrin and lactoferrin: expression of iron-repressible proteins without siderophore production. *Infect Immun* 1994;62:4909-14.
110. N'guessan PD, Vigelahn M, Bachmann S, et al. The UspA1 protein of Moraxella catarrhalis induces CEACAM-1-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells. *J Infect Dis* 2007;195:1651-60.
111. Manolov T, Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K. Moraxella-dependent alpha 1-antichymotrypsin neutralization: a unique virulence mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:609-17.
112. Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, et al. Phenotypic effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on Moraxella catarrhalis 035E. *Infect Immun* 1998;66:3113-9.
113. McMichael JC, Fiske MJ, Fredenburg RA, et al. Isolation and characterization of two proteins from Moraxella catarrhalis that bear a common epitope. *Infect Immun* 1998;66:4374-81.
114. Brooks MJ, Sedillo JL, Wagner N, et al. Moraxella catarrhalis binding to host cellular receptors is mediated by sequence-specific determinants not conserved among all UspA1 protein variants. *Infect Immun* 2008;76:5322-9.
115. Tan TT, Nordstrom T, Forsgren A, Riesbeck K. The respiratory pathogen Moraxella catarrhalis adheres to epithelial cells by interacting with fibronectin through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Infect Dis* 2005;192:1029-38.
116. Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K. The respiratory pathogen moraxella catarrhalis binds to laminin via ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Infect Dis* 2006;194:493-7.
117. Hill DJ, Virji M. A novel cell-binding mechanism of Moraxella catarrhalis ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* 2003;48:117-29.
118. Hill DJ, Edwards AM, Rowe HA, Virji M. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM)-binding recombinant polypeptide confers protection against infection by respiratory and urogenital pathogens. *Mol Microbiol* 2005;55:1515-27.
119. Pearson MM, Laurence CA, Guinn SE, Hansen EJ. Biofilm formation by Moraxella catarrhalis in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin. *Infect Immun* 2006;74:1588-96.
120. Attia AS, Lafontaine ER, Latimer JL, Aebi C, Syrogiannopoulos GA, Hansen EJ. The UspA2 protein of Moraxella catarrhalis is directly involved in the expression of serum resistance. *Infect Immun* 2005;73:2400-10.
121. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994;8:217-25.
122. Schromm AB, Seydel U. Endotoxine und Sepsis, in: Wacha H., Infektiologie heute - Zeit zum Umdenken. Zuckschwerdt Verlag, Germering/München 1999;109-23.
123. Holme T, Rahman M, Jansson PE, Widmalm G. The lipopolysaccharide of moraxella catarrhalis structural relationships and antigenic properties. *Eur J Biochem* 1999;265:524-9.
124. Vaneechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, Van den Abeele AM. Serological typing of Branhamella catarrhalis strains on the basis of lipopolysaccharide antigens. *J Clin Microbiol* 1990;28:182-7.
125. Peng D, Hong W, Choudhury BP, Carlson RW, Gu XX. Moraxella catarrhalis bacterium without endotoxin, a potential vaccine candidate. *Infect Immun* 2005;73:7569-77.
126. Akgul G, Erturk A, Turkoz M, et al. Role of lipooligosaccharide in the attachment of Moraxella catarrhalis to human pharyngeal epithelial cells. *Microbiol Immunol* 2005;49:931-5.
127. Mak TW, Saunders ME. Primer to the Immune Response: Academic Cell Update Edition, 2 Edn Academic Press/Elsevier, 2010.
128. Neumann J. Immunbiologie: Eine Einführung, 1 Edn Springer-Verlag, Berlin, 2008.
129. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
130. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
131. Cooper MD, Herrin BR. How did our complex immune system evolve? *Nat Rev Immunol* 2010;10:2-3.
132. Cruvinel WM, Mesquita D, Jr., Araujo JA, et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol* 2010;50:434-61.
133. Mesquita JD, Araujo JA, Catelan TT, et al. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol* 2010;50:552-80.
134. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009;21:317-37.

135. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
136. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 2007;76:447-80.
137. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 2009;30:131-41.
138. Radtke AL, O'Riordan MX. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 2006;8:1720-9.
139. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291-5.
140. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
141. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004;23:327-33.
142. Gomez MI, Prince A. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatr Pulmonol* 2008;43:11-9.
143. Mayer AK, Dalpke AH. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 2007;55:353-62.
144. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttrop N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res* 2006;7:97.
145. Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, Dickey BF. Inducible innate resistance of lung epithelium to infection. *Annu Rev Physiol* 2010;72:413-35.
146. Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:711-20.
147. Blander JM. Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors. *Ann Rheum Dis* 2008;67 Suppl 3:iii44-iii49.
148. Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009;214:562-75.
149. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:123-8.
150. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 2011;240:92-104.
151. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol* 2011;12:121-8.
152. Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 2007;37:3311-8.
153. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985;42:779-89.
154. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
155. Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* 2002;168:1542-6.
156. Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 2008;9:165-78.
157. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
158. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
159. Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost* 2009;102:1103-9.
160. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 2008;3:352-63.
161. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2:346-52.
162. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001;69:1477-82.
163. Girard R, Pedron T, Uematsu S, et al. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci* 2003;116:293-302.



- 
164. Liang S, Wang M, Tapping RI, et al. Ganglioside GD1a is an essential coreceptor for Toll-like receptor 2 signaling in response to the B subunit of type IIb enterotoxin. *J Biol Chem* 2007;282:7532-42.
  165. Becker S, Dailey L, Soukup JM, Silbajoris R, Devlin RB. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:45-52.
  166. Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 2003;171:6820-6.
  167. Muir A, Soong G, Sokol S, et al. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:777-83.
  168. Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, et al. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:241-5.
  169. Droemmann D, Goldmann T, Branscheid D, et al. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 2003;119:103-8.
  170. Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood* 2007;109:1574-83.
  171. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145-51.
  172. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem* 2004;279:2712-8.
  173. Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS One* 2011;6:e21827.
  174. MacRedmond R, Greene C, Taggart CC, McElvaney N, O'Neill S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir Res* 2005;6:116.
  175. Jia HP, Kline JN, Penisten A, et al. Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L428-L437.
  176. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 2000;275:29731-6.
  177. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, Pfeifer M. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand J Immunol* 2002;56:294-302.
  178. Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, et al. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem* 2003;278:53035-44.
  179. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353-64.
  180. Arbibe L, Mira JP, Teusch N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 2000;1:533-40.
  181. Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* 2009;85:966-77.
  182. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* 2000;19:3325-36.
  183. Loegering DJ, Lennartz MR. Protein kinase C and toll-like receptor signaling. *Enzyme Res* 2011;2011:537821.
  184. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
  185. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 2005;118:3569-72.
  186. 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;68:320-44.
  187. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 2003;206:1107-15.
  188. Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 2010;49:1-9.
  189. Angel P, Imagawa M, Chiu R, et al. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 1987;49:729-39.
  190. Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987;325:368-72.
  191. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002;4:E131-E136.
-

192. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004;117:5965-73.
193. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:240-6.
194. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:859-68.
195. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* 1996;74:589-607.
196. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-16.
197. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280-8.
198. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a000034.
199. Sorensen OE, Borregaard N, Cole AM. Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib Microbiol* 2008;15:61-77.
200. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238-50.
201. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000;1:141-50.
202. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 2009;15:2377-92.
203. Harder J, Glaser R, Schroder JM. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res* 2007;13:317-38.
204. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1999;1462:1-10.
205. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 2001;81:1475-85.
206. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002;66:236-48.
207. Beisswenger C, Bals R. Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem Immunol Allergy* 2005;86:55-71.
208. Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;306:27-66.
209. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human  $\alpha$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18631-5.
210. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 2010;5:99-113.
211. Barlow PG, Li Y, Wilkinson TS, et al. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J Leukoc Biol* 2006;80:509-20.
212. Chamorro CI, Weber G, Gronberg A, Pivarcsi A, Stahle M. The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2009;129:937-44.
213. Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M. Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. *Int Immunol* 2008;20:543-53.
214. Lau YE, Bowdish DM, Cosseau C, Hancock RE, Davidson DJ. Apoptosis of airway epithelial cells: human serum sensitive induction by the cathelicidin LL-37. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:399-409.
215. Mader JS, Marcet-Palacios M, Hancock RE, Bleackley RC. The human cathelicidin, LL-37, induces granzyme-mediated apoptosis in cytotoxic T lymphocytes. *Exp Cell Res* 2011;317:531-8.
216. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003;62 Suppl 2:ii17-ii21.
217. De Smet K., Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005;27:1337-47.
218. Troxler RF, Offner GD, Xu T, Vanderspek JC, Oppenheim FG. Structural relationship between human salivary histatins. *J Dent Res* 1990;69:2-6.
219. Bevins CL. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochem Soc Trans* 2006;34:263-6.
220. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998;152:1247-58.
221. Spencer JD, Hains DS, Porter E, et al. Human alpha defensin 5 expression in the human kidney and urinary tract. *PLoS One* 2012;7:e31712.

- 
222. Frye M, Bargon J, Dauletbaev N, Weber A, Wagner TO, Gropp R. Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells. *J Clin Pathol* 2000;53:770-3.
223. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1294-313.
224. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, et al. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2129-33.
225. Hiemstra PS. The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp Lung Res* 2007;33:537-42.
226. Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14961-6.
227. Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002;106:517-25.
228. Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, et al. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J* 2004;18:1306-8.
229. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007;127:594-604.
230. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001;276:5707-13.
231. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001;306:257-64.
232. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 2001;263:211-8.
233. 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;281:11637-48.
234. Ishimoto H, Mukae H, Date Y, et al. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J* 2006;27:253-60.
235. Menzies BE, Kenoyer A. Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun* 2006;74:6847-54.
236. Kraus D, Deschner J, Jager A, et al. Human beta-defensins differently affect proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblast-like MG63 cells. *J Cell Physiol* 2012;227:994-1003.
237. Varoga D, Pufe T, Harder J, et al. Human beta-defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis Rheum* 2005;52:1736-45.
238. Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1499-512.
239. Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, et al. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2002;277:8279-89.
240. Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res* 2005;84:445-50.
241. Maisetta G, Batoni G, Esin S, et al. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:806-9.
242. Quinones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 2003;17:F39-F48.
243. Weinberg A, Quinones-Mateu ME, Lederman MM. Role of human beta-defensins in HIV infection. *Adv Dent Res* 2006;19:42-8.
244. Leikina E, Delanoe-Ayari H, Melikov K, et al. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat Immunol* 2005;6:995-1001.
245. Hazrati E, Galen B, Lu W, et al. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 2006;177:8658-66.
-

- 
246. Basu M, Kota S, Banerjee AK, Bose S. Role of human beta defensin 3 during type I interferon mediated antiviral response against vesicular stomatitis virus. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res* 2010;2:23-32.
247. Jin G, Kawsar HI, Hirsch SA, et al. An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis. *PLoS One* 2010;5:e10993.
248. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002;23:291-6.
249. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol* 2007;37:434-44.
250. Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol* 2010;184:3526-34.
251. Funderburg NT, Jadlowsky JK, Lederman MM, Feng Z, Weinberg A, Sieg SF. The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human beta-defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor-kappaB signalling patterns in human monocytes. *Immunology* 2011;134:151-60.
252. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 2005;175:1776-84.
253. Pingel LC, Kohlgraf KG, Hansen CJ, et al. Human beta-defensin 3 binds to hemagglutinin B (rHagB), a non-fimbrial adhesin from *Porphyromonas gingivalis*, and attenuates a pro-inflammatory cytokine response. *Immunol Cell Biol* 2008;86:643-9.
254. Semple F, Webb S, Li HN, et al. Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 2010;40:1073-8.
255. Mburu YK, Abe K, Ferris LK, Sarkar SN, Ferris RL. Human beta-defensin 3 promotes NF-kappaB-mediated CCR7 expression and anti-apoptotic signals in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 2011;32:168-74.
256. Winter J, Pantelis A, Reich R, et al. Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *Cancer Invest* 2011;29:196-201.
257. Shuyi Y, Feng W, Jing T, et al. Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:616-25.
258. Kawsar HI, Weinberg A, Hirsch SA, et al. Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: potential role in macrophage trafficking. *Oral Oncol* 2009;45:696-702.
259. Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2004;137:379-85.
260. Sorensen OE, Thapa DR, Roupe KM, et al. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 2006;116:1878-85.
261. Kesting MR, Loeffelbein DJ, Hasler RJ, et al. Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2009;27:575-81.
262. Shnitsar VM, Lisovskiy IL, Soldatkina MA, et al. Human beta-defensin 3 (hBD-3) expression in A431 cell line and human vulval tumors. *Exp Oncol* 2004;26:328-30.
263. Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 2004;123:522-9.
264. Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005;174:4870-9.
265. Li J, Zhang B, Zhong LL. Expression of human beta-defensin-3 induced by lipopolysaccharide in human bronchial epithelial cells. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2009;11:577-80.
266. Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, et al. The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of *Candida esophagitis*. *BMC Immunol* 2009;10:36.
267. Scharf S, Vardarova K, Lang F, et al. *Legionella pneumophila* induces human beta defensin-3 in pulmonary cells. *Respir Res* 2010;11:93.
268. Scharf S, Zahiten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttrop N, N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human beta-defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res* 2012;38:100-10.
269. Ji S, Shin JE, Kim YS, Oh JE, Min BM, Choi Y. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human beta-defensins by *fusobacterium nucleatum* in gingival epithelial cells. *Infect Immun* 2009;77:1044-52.
-

- 
270. Moranta D, Regueiro V, March C, et al. Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun* 2010;78:1135-46.
  271. Pahl R, Brunke G, Steubesand N, et al. IL-1beta and ADAM17 are central regulators of beta-defensin expression in Candida esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G547-G553.
  272. Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, et al. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* 2007;179:984-92.
  273. Ishikawa T, Kanda N, Hau CS, Tada Y, Watanabe S. Histamine induces human beta-defensin-3 production in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2009;56:121-7.
  274. Kanda N, Ishikawa T, Watanabe S. Prostaglandin D2 induces the production of human beta-defensin-3 in human keratinocytes. *Biochem Pharmacol* 2010;79:982-9.
  275. Nomura I, Goleva E, Howell MD, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003;171:3262-9.
  276. Sperandio B, Regnault B, Guo J, et al. Virulent Shigella flexneri subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J Exp Med* 2008;205:1121-32.
  277. Morampudi V, Braun MY, D'Souza S. Modulation of early beta-defensin-2 production as a mechanism developed by type I Toxoplasma gondii to evade human intestinal immunity. *Infect Immun* 2011;79:2043-50.
  278. Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* 2002;360:1144-9.
  279. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002;347:1151-60.
  280. Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 2006;24:341-8.
  281. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449:564-9.
  282. Yamasaki K, Di NA, Bardan A, et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 2007;13:975-80.
  283. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:406-15.
  284. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-64.
  285. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18129-34.
  286. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731-4.
  287. Wehkamp J, Wang G, Kubler I, et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007;179:3109-18.
  288. van Es JH, Jay P, Gregorieff A, et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 2005;7:381-6.
  289. Koslowski MJ, Kubler I, Chamaillard M, et al. Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One* 2009;4:e4496.
  290. Schaubert J, Rieger D, Weiler F, et al. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:615-21.
  291. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:215-23.
  292. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006;79:439-48.
  293. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999;103:303-7.
  294. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996;85:229-36.
  295. Chen CI, Schaller-Bals S, Paul KP, Wahn U, Bals R. Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004;3:45-50.
  296. Taggart CC, Greene CM, Smith SG, et al. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol* 2003;171:931-7.
-

- 
297. Soong LB, Ganz T, Ellison A, Caughey GH. Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* 1997;46:98-102.
  298. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 1999;103:1113-7.
  299. Hu RC, Xu YJ, Zhang ZX, Ni W, Chen SX. Correlation of HDEFB1 polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Chinese Han population. *Chin Med J (Engl )* 2004;117:1637-41.
  300. Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, Keicho N. Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:17-22.
  301. Andresen E, Gunther G, Bullwinkel J, Lange C, Heine H. Increased expression of beta-defensin 1 (DEFB1) in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2011;6:e21898.
  302. Herr C, Beisswenger C, Hess C, et al. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax* 2009;64:144-9.
  303. Bals R, Hiemstra PS. Antimicrobial peptides in COPD--basic biology and therapeutic applications. *Curr Drug Targets* 2006;7:743-50.
  304. Pace E, Ferraro M, Minervini MI, et al. Beta defensin-2 is reduced in central but not in distal airways of smoker COPD patients. *PLoS One* 2012;7:e33601.
  305. Donald CD, Sun CQ, Lim SD, et al. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* 2003;83:501-5.
  306. Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, et al. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:660-3.
  307. Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, et al. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:8542-9.
  308. Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T. High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:2103-7.
  309. Coffelt SB, Waterman RS, Florez L, et al. Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Int J Cancer* 2008;122:1030-9.
  310. Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, et al. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int J Cancer* 2005;114:713-9.
  311. von Haussen J., Koczulla R, Shaykhiev R, et al. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer* 2008;59:12-23.
  312. 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;48:1904-9.
  313. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-23.
  314. 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;17:62-70.
  315. Aebi C, Maciver I, Latimer JL, et al. A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect Immun* 1997;65:4367-77.
  316. Schierholz JM, Beuth J, Pulverer G. Adherent bacteria and activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:158-60.
  317. Xie H, Gu XX. *Moraxella catarrhalis* lipooligosaccharide selectively upregulates ICAM-1 expression on human monocytes and stimulates adjacent naive monocytes to produce TNF-alpha through cellular cross-talk. *Cell Microbiol* 2008;10:1453-67.
  318. Slevogt H, Schmeck B, Jonatat 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;290:L818-L826.
  319. Slevogt H, Maqami L, Vardarowa K, et al. Differential regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced interleukin-8 response by protein kinase C isoforms. *Eur Respir J* 2008;31:725-35.
  320. Böhlting A, Hagge SO, Roes S, et al. Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3. *Biochemistry* 2006;45:5663-70.
  321. Wansley EK, Dillon PJ, Gainey MD, Tam J, Cramer SD, Parks GD. Growth sensitivity of a recombinant simian virus 5 P/V mutant to type I interferon differs between tumor cell lines and normal primary cells. *Virology* 2005;335:131-44.
-

322. Maeno N, Yoshiie K, Matayoshi S, et al. A heat-stable component of *Bartonella henselae* upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression on vascular endothelial cells. *Scand J Immunol* 2002;55:366-72.
323. Jendholm J, Morgelin M, Perez Vidakovic ML, et al. Superantigen- and TLR-dependent activation of tonsillar B cells after receptor-mediated endocytosis. *J Immunol* 2009;182:4713-20.
324. Miller LS, Sorensen OE, Liu PT, et al. TGF- $\alpha$  regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol* 2005;174:6137-43.
325. 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;294:L1068-L1075.
326. Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, et al. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn Pathol* 2009;4:12.
327. Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005;6:68.
328. MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, McElvaney NG, O'Neill SJ. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke. *Respir Res* 2007;8:84.
329. Lazarev VN, Govorun VM. Antimicrobial peptides and their use in medicine. *Appl Biochem Microbiol* 2010;46:803-14.
330. Oyston PC, Fox MA, Richards SJ, Clark GC. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol* 2009;58:977-87.
331. Ishizawa K, Suzuki T, Yamaya M, et al. Erythromycin increases bactericidal activity of surface liquid in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L565-L573.
332. Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Cyst Fibros* 2007;6:403-10.
333. Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 2007;179:2060-3.
334. White JH. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun* 2008;76:3837-43.
335. Steintraesser L, Kraneburg U, Jacobsen F, Al-Benna S. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology* 2011;216:322-33.

## 8 ANHANG

### 8.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit in verschiedenster Weise beigetragen haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Hortense Slevogt für die Bereitstellung des sehr interessanten und aktuellen Themas, die herausragend engagierte fachliche und persönliche Betreuung sowie stets konstruktive und geduldige Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Ein Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Philippe Dje N`Guessan für die Kobetreuung dieser Arbeit sowie die wertvollen Ratschläge und zahlreichen Anregungen während meiner experimentellen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Norbert Suttrop möchte ich dafür danken, dass ich die Möglichkeit erhielt, diese Arbeit in seinem Forschungslabor in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité umsetzen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Forschungsförderung der Charité für die Vergabe des Promotionsstipendiums.

Herrn Prof. Dr. Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, danke ich für die Bereitstellung der *M. catarrhalis*-Wildtypstämme O35E und O46E sowie der *M. catarrhalis*-Mutanten O35E.1 und O35E.2.

Herrn Prof. Dr. Christoph Aebi, Universität Bern, danke ich für die Zuverfügungstellung der *M. catarrhalis* O35E-LOS-defizienten Mutante O35E.lpxA und des aufgereinigten *M. catarrhalis*-LOS.

Bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Jacqueline Hellwig, Frauke Schreiber, Doris Stoll und Annika Kühn bedanke ich mich recht herzlich für ihre technische Unterstützung, ihre Geduld und die Organisation des Laboralltages.

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Austausch sowie die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit danken.

Mein größter Dank gebührt jedoch meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, die mich stets vorbehaltlos in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und immer für mich da waren. Vielen herzlichen Dank!



## **8.2 Lebenslauf**

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



## 8.3 Publikationen

### 8.3.1 Konferenzvortrag

**Steiner T**, N'Guessan PD, Scharf S, Opitz B, Schmeck B, Eitel J, Hansen E, Aebi C, Suttorp N, Slevogt H. *Moraxella catarrhalis*-induced human beta-defensin-3 expression in human pulmonary epithelial cells. 19<sup>th</sup> European Students Conference (ESC), Berlin, 29.–3. Oktober 2008.

Verleihung des Wettbewerbspreises für den zweitbesten wissenschaftlichen Vortrag.

### 8.3.2 Posterpräsentationen

Slevogt H, **Steiner T**, Scharf S, Eitel J, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. Die Rolle und Mechanismen der *Moraxella catarrhalis*-induzierten beta-Defensin-3-Expression in humanen pulmonalen Epithelzellen. 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologen und Beatmungsmedizin e. V. (DGP), Lübeck, 9.–12. April 2008.

N'Guessan PD, **Steiner T**, Scharf S, Haarmann H, Opitz B, Eitel J, Hippenstiel S, Suttorp N, Slevogt H. Role and regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced beta-defensin-3 expression in human pulmonary epithelial cells. 18<sup>th</sup> European respiratory society (ERS), Berlin, 4.–8. Oktober 2008.

N'Guessan PD, Haarmann H, **Steiner T**, Suttorp N, Slevogt S. The *Moraxella catarrhalis*-induced inflammatory response of pulmonary epithelial cells is mediated by activation of EGFR. 18<sup>th</sup> European respiratory society (ERS), Berlin, 4.–8. Oktober 2008.

Verleihung des Posterpreises.

N'Guessan PD, Haarmann H, **Steiner T**, Suttorp N, Slevogt S. The *Moraxella catarrhalis*-induced inflammatory response is mediated by activation of epidermal growth factor receptor in pulmonary epithelial cells. American Thoracic Society (ATS), San Diego, California, USA, 15.–20. Mai 2009.

### 8.3.3 Originalarbeiten in Vorbereitung

Slevogt H, **Steiner T**, Scharf S, Haarmann H, Opitz B, Eitel J, Suttorp N, N'Guessan PD. Role and regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced human beta-defensin-3 expression in human pulmonary epithelial cells. In Präparation.

N'Guessan PD, Haarmann H, **Steiner T**, Weimann A, Suttorp N, Slevogt S. The *Moraxella catarrhalis* induced inflammatory response of pulmonary epithelial cells is mediated by activation of EGFR. In Präparation.

#### 8.4 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Tamara Alice Steiner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung des humanen  $\beta$ -Defensin-3 für die Infektion von humanem respiratorischem Epithel mit *Moraxella catarrhalis*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift (Tamara Steiner)